REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSIGNEMENT SEPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté de **T**echnologie

Mémoire de fin d'études de Master

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Caractérisation physicochimique et biologique des biomolécules extraites à partir d'une plante à usage médical

Présenté par

HALLOUANE Fatiha

SAIFI Wissem

Proposé et dirigé par

HACHACHE Naima

ZOUAMBIA Yamina

Promotion 2024

ملخص

في هذا العمل، كنا مهتمين بتثمين الكتلة الحيوية الوفيرة جدًا في الجزائر وهي اللزاز من خلال استخلاص جزيئاتها الحيوية النشطة وتقييم خصائصها الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية. تم إجراء الاستخلاص بطريقة النقع باستخدام مذيبين: الماء (100%) وخليط الماء/الإيثانول (50/50%). كشف التحليل النوعي للمستخلصات، من خلال تفاعلات محددة، عن وجود البوليفينول والعفص الغالي وجليكوسيدات القلب والسابونين. بالنسبة للتحليل الكمي للمركبات الفينولية، أتاحت طريقة فولان-كواكالتو تسجيل اجمالي محتوى البوليفينول بمقدار 471.43 ملج/جم و محتوى ثلاثي كلوريد الاليمنيوم أعطى محتوى فلافونويد قدره 28.57 ملج/جم في مستخلص الماء % 100 اضهرت المستخلصات الهيدوايثانولية فعالية متوسطة مضادة للجراثيم ضد الاشريكية القولونية، العصوية الرقيقة، المكورات العنقودية الذهبية والمكورات العنقودية البشروية. بالاضافه الى ذلك اظهرت المستخلصات التي تم الحصول عليها نشاط انحلالي منخفض للغايه مع معدل انحلال دموي يتراوح من 3.75%الى 4.82 %،مما يميزها بعدم وجود خطر السمية الخلوية .اخيرا تم استخدام مستخلصات اللزاز كعامل متعدد الوظائف (الترطيب والتنعيم وما إلى ذلك) في تركيب شامبو ومص طبيعي للشعر.

الكلمات المفتاحية: اوراق اللزاز، الاستخلاص، البوليفينول، الأنشطة البيولوجية، التركيب شامبو ومصل.

Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la valorisation d'une biomasse très abondante en Algérie qui est le Daphné Garou par extraction de ses biomolécules actives et l'évaluation de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. L'extraction s'est réalisée par macération, en utilisant deux solvants : l'eau (100%) et un mélange eau/éthanol (50/50 %). L'analyse qualitative des extraits, via des réactions spécifiques, a révélé la présence de polyphénols, de tannins galliques, de glycosides cardiaques et de saponines. Pour l'analyse quantitative des composés phénoliques, la méthode de Folin-Ciocalteu a permis d'enregistrer une teneur en polyphénols totaux de 471.43 mg EAG/g, et celle du trichlorure d'aluminium à donner une teneur en flavonoïdes de 28.57mg ERU/g dans l'extrait d'eau (100 %). Les extraits hydro-éthanolique ont montré une activité antibactérienne modérée contre *Escherichia* coli, *Bacillus* Subtilis, *Staphylococcus* Aureus et *Staphylococcus* Epidermidis. En outre, les extraits obtenus marquent une activité hémolytique très faible avec un taux d'hémolyse allant de 3.75% à 4.82 % ce qui les caractérise par l'absence de risque de cytotoxicité. Enfin, les extraits du Daphné Garou ont été utilisés comme agent multifonctionnel (hydratant, lissant…) dans la formulation d'un shampoing et un sérum naturels pour cheveux.

Mots clés : Les feuilles Daphné Garou, extraction, polyphénols, activités biologiques, formulation de shampoing et sérum.

Abstract

In this work, we were interested en the valorization of a very abundant biomass in Algeria which is flax-leaved Daphn by extraction of its active biomolecules and the evaluation of their physicochemical and biological properties. The extraction was carried out by maceration, using two solvents: water (100%) and a water/ethanol mixture (50/50%). Qualitative analysis of the extracts, via specific reactions, revealed the presence of polyphenols, gallic tannins, cardiac glycosides and saponins. For the quantitative analysis of phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu method made it possible to record a total polyphenol content of 471.43 mg EAG/g, and that of aluminum trichloride gave a flavonoid content of 28.57 mg ERU/ g in water extract (100%). The hydro-ethanolic extracts showed moderate antibacterial activity against *Escherichia* coli, *Bacillus* Subtilis, *Staphylococcus* Aureus and *Staphylococcus* Epidermidis. In addition, the extracts obtained show very low hemolytic activity with a hemolysis rate ranging from 3.75% to 4.82%, which characterizes them by the absence of risk of cytotoxicity. Finally, flax-leaved Daphn extracts have been used as a multifunctional agent (moisturizing, smoothing, etc.) in the formulation of a natural shampoo and serum for hair.

Key words: Flax-leaved Daphn leaves, extraction, polyphenols, biological activities, formulation of shampoo and serum.

REMERCIMENTS

Nous remercions tout d'abord 'Allah'' le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Nous remercions vivement notre promotrice Dr. HACHACHE.N pour les connaissances qu'elle nous a transmises durant notre formation en génie des procédés 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.

Nos remerciements s'adressent en particulier à notre Co-promotrice Dr. ZOUAMBIA.Y qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous a accordé, nous a permis de réaliser ce travail.

Nos remerciements vont aux membres du jury la présidente Dr MAACHOU.H et l'examinatrice Dr KHALADI.R

Nous remercions Mme BENHAOUA.M pour son aide dans notre travail expérimental.

Nous remercions le personnel de groupe SIDAL pour sa coopération dans la conduite de l'activité anti bactérienne dans le département microbiologique

Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont aidées, de près ou de loin, à l'achèvement de ce travail Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude
Merci

DEDICACES



*A l'aide d'**ALLAH** tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la Flamme de mon coeur, ma vie et mon bonheur : **Maman** 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 Mon cher **père** qui m'a appris les sens de la persévérance tout Au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses Encouragement*

*A mon mari **Adem** qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mon mémoire.*

*A ma chère sœur **Fella** et ses enfants **Aroua, Bouchra, Alaa et Farah***

*A mes chères frères **Nacer et Amine***

A toute ma famille et mes amies

*A mon binôme **Fatiha** avec qui j'ai partagé des moments de stress et de folie durant cette année.*

A tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à me remonter le moral et me soutenir dans les moments difficiles.

Merci d'être toujours là pour moi.

Wissem

DEDICACES





Celui qui a dit que j'étais elle "Il l'a eu"

Le voyage n'a pas été court et n'aurait pas dû l'être.

Ni le rêve n'était proche ni la route pleine d'installations.

Mais je l'ai fait et je l'ai eu.

الحمدلله, grâce auxquels aujourd'hui j'attends un rêve tant attendu et il est devenu une réalité dont je suis fier.

*À mon ange Immaculé, et ma force après الله, mon premier et éternel soutien "**Maman**" Je te dédie cette réalisation, qui sans tes sacrifices n'aurait pas existé, je suis reconnaissant que الله t'ait choisi pour moi parmi les êtres humains, Ô bon soutien et compensation. À ceux qui m'ont soutenu et m'ont donné gratuitement **"Mon père"**.*

*À ceux qui ont dit: "سنشد عضدك باخيك"..."**Ayoub**".*

*À celui qui m'a donné sans relâche, "**Razika**", Que الله te garde comme mon soutien.*

*À ceux qui ont cru en mes capacités, à ceux qui me rappellent ma force et se tiennent derrière moi **"Hadjer"**.*

*A mon binôme **"wissem "** avec qui j'ai partagé des moments de stress et de folie durant cette année.*

Merci à toute ma famille et mes amis... à tous ceux qui m'ont soutenu dans les moments difficiles.

Fatiha

TABLE DES MATIERES

Résumé

Remerciement

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

Introduction générale……...…1

I.1.Généralité sur la famille des Thyméleacées 3

I.1.1. Répartition des Thyméleacées dans le monde 3

I.1.2 Genre Daphné..... 4

I.2.Daphné Garou : ***Daphné gnidium L*****, Lazzaz** 4

I.2.1.Description du Daphné Garou 5

I.2.1.1.Noms vernaculaires 5

I.2.1.2.Description botanique 6

I.2.1.3.Taxonomie..... 8

I.2.2.Composition et intérêt médicinal du Daphné Garou 9

I.2.2.1.Composition chimiques..... 9

I.2.2.2. Intérêt médicinal en générale 11

I.2.3.Propriétés pharmacologiques..... 12

I.2.3.1.Activité antibactérienne 12

I.2.3.2.Activité antioxydante 13

I.2.3.3.Activité anti tumorale 13

I.2.3.4.Activité anti-inflammatoire 13

I.2.3.5.Activité antifongique 14

I.2.3.6.Activité hémolytique..... 14

I.2.4.Investigation toxicologique 14
I.2.4.1.Toxicité de l'espèce 14
I.2.4.2.Toxicité aiguë de Daphne 15
II.1 Classification des métabolites secondaire 16
II.1.1. polyphénols 17
II.1.1.1.Classification 17
II.1.1.3. Propriétés physicochimiques des composés phénoliques 24
II.1.1.4. Propriétés biologiques 24
II.1.2. Les terpénoïdes et les stéroïdes 25
II.1.3. Les alcaloïdes 25
III.1.Matériel et produits 27
III.2.Préparation et caractérisation physicochimique de DG 28
III.2.1.Séchage de la matière végétale 29
III.2.2.Détermination de la teneur en eau 29
III.2.3.Broyage et tamisage de la matière première 30
III.3.Extraction des composés phénoliques 32
III.3.1.Protocol expérimental 32
III.3.2.Caractérisation des extraits 35
III.3.2.1.Caractéristiques organoleptiques 35
III.4.2.2.Détermination de l'acidité des extraits 35
III.3.2.3.Détermination de conductivité 36
III.4.Analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques 36
III.4.1.Analyse qualitative 36
III.4.1.1.Recherche des polyphénols 37
III.4.1.2.Recherche des tannins gallique 37
III.4.1.3.Recherche de glycosides 38
III.4.1.4.Recherche des saponines 38

III.4.2.Analyse quantitative 40

III.4.2.1.Dosage des phénols totaux 40

III.4.2.2.Dosage des flavonoïdes totaux 46

III.5.Activité antioxydante 50

III.5.1.Principe 50

III.5.2.Méthode expérimentale 51

III.5.3.Résultats et discussion 53

III.6.Activité antibactérienne 53

III.6.1. Mode opératoire 53

III.6.2.Résultats et discussion 54

III.7. Activité anti-inflammatoire 57

III.7.1. Protocole expérimental 58

III.7.1.1.Préparation de la suspension des globules rouges 58

III.7.1.2. Evaluation de l'activité hémolytique 59

III.7.1.3. Effet des extraits sur la stabilité des membranes des globules rouges (activité anti-inflammatoire) 61

III.8.2.Résultats et discussion 61

III.8.Formulation d'un shampooing et sérum à base des extraits de DG 62

III.8.1.Protocol expérimental de la formulation 62

III.8.2. Caractères organoleptiques du shampooing et du sérum 63

III.8.3. Caractérisation physicochimique du shampooing et du sérum 63

Conclusion générale…..……..……67

Annexe

Référence bibliographique

Liste des figures

Figure I.1. Carte de répartition mondiale des Thyméléacées…….....4

Figure I.2. *Daphné gnidium.L*……...…….……5

Figure I.3. Feuille de *Daphne gniduim*……..6

Figure I.4. Tiges de *Daphne gniduim L* ……....7

Figure I.5. Inflorescence et fleur de *Daphne gnidium L* ……..7

Figure I.6. Fruits de *Daphne gnidiumL* ……8

Figure I.7. Squelette carbonée des coumarines(a) et des flavonoïdes (b) …….9

Figure I.8. Structure des principaux composés trouvés dans les extraits de *Daphne gnidium* ……..….10

Figure I.9. Propriétés pharmacologiques…….....12

Figure II.1. Structure chimique des polyphénols …….…….……...…17

Figure II.2. Différents familles de polyphénols……...……18

Figure II.3. Structure de l'acide phénolique…….19

Figure II.4. Structure de l’acide benzoïque, acide gallique, acide vanillique……..19

Figure II.5. Structure de l’acide cinnamique,acide caféique et l’acide férulique……20

Figure II.6. Structure chimique des flavonoïdes ……...…….21

Figure II.7. Structure chimique des tanins……. 21

Figure II.8. Structure chimique des motifs quinoniques…… 22

Figure II.9. Structure chimique des coumarines …….23

Figure II.10. Structure chimique des saponines …….24

Figure II.11. Structure d'alcaloïdes ……26

Figure III.1. Matières végétales dans l'Etuve ……..……..29

Figure III.2. Matières végétales séchées ……29

Figure III.3. Poudre de DG ……..……..….30

Figure III.4. Tamiseuse (Appareil utilisé pour le tamisage de la poudre de DG)……...31

Figure III.5. Variation de la masse en fonction de diamètre ……..…31

Figure III.6. Distribution granulométrique de la poudre de DG ……..….32

Figure III.7. Méthode de macération …….……..……..33

Figure III.8. Appareillage utilisé pour la macération (l'extraction dans le bain-marie) ...….33

Figure III.9. Filtration sous vide après l'extration …….34

Figure III.10. Centrifugation des solutions ……34

Figure III.11. Extraits obtenus (flacons) ……34

Figure III.12. PH-mètre utilisé ……...35

Figure III.13. Conductimètre utilisé ……...36

Figure III.14. Perchlorure ferrique (FeCL3 ,10%) …….....37

Figure III.15. Recherche des saponines …….39

Figure III.16. Résultats de la recherche des saponines …….…….39

Figure III.17. Dilution des extraits …….41

Figure III.18. Structure chimique de l'acide Gallique ……..……..41

Figure III.19. Solutions préparées……..……42

Figure III.20. Solutions préparées de l'acide gallique……42

Figure III.21. Différentes préparations pour dosage des polyphénols totaux…….43

Figure III.22. Coloration des solutions avant et après 15 minutes……..…43

Figure III.23. Lecture de l'absorbante à l'aide d'un spectrophotomètre UV……...44

Figure III.24. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le solvant eau……...44

Figure III.25. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le solvant eau/éthanol (50%,50%)……...….45

Figure III.26. Structure chimique de la Quercétine……..……..46

Figure III.27. Masse des produits……47

Figure III.28. Solutions préparées……..…….47

Figure III.29. Solutions diluées de Quercétine……...…48

Figure III.30. Coloration des solutions avant et après 30 minutes…….……48

Figure III.31. Courbe d'étalonnage de Quercétine pour le solvant eau……..49

Figure III.32. Courbe d'étalonnage de Quercétine pour le solvant eau/éthanol (50%,50%)..49

Figure III.33. Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl)…….50

Figure III.34. Solutions prépare de l'extrait……....51

Figure III.35. Solution méthanoïque de DPPH……...……51

Figure III.36. Solutions méthanoïque préparé…….52

Figure III.37. Coloration des solutions avant et après 30 minutes……..52

Figure III.38. Test d'antibiogramme…….……..54

Figure III.39. Sang utilisé……58

Figure III.40. Récupération des globules rouges……...…..59

Figure III.41. Dosage de l'activité hémolytique…….60

Figure III.42. Shampoing et le sérum formulé……..……..62

Figure III.43. Emballage de shampoing et le sérum……..…….…….63

Figure III.44. Test de viscosité sur le shampoing formulée……..……..66

Figure III.45. Test de viscosité sur le sérum formulée……....66

Liste des tableaux

Tableau I.1. Noms vernaculaires daphné Garou ……..……..5

Tableau I.2. Taxonomie daphné Garou…….……8

Tableau III.1. Matériels et produits.……..……..28

Tableau III.2. Caractéristiques de la poudre de DG……..…….…….30

Tableau III.3. Distribution granulométrique de la poudre de DG…….…..31

Tableau III.4. Caractéristiques organoleptiques des extraits…….……..35

Tableau III.5. pH des extraits obtenus…….…..….36

Tableau III.6. Conductivité des extraits obtenus…….……36

Tableau III.7. Recherche des polyphénols ……....37

Tableau III.8. Recherche des tannins gallique ……..….38

Tableau III.9. Recherche de glycosides cardiaques …….…..38

Tableau III.10. Résultats de la recherche des saponines…….……40

Tableau III.11. Résultat de l'activité antibactérienne…….……55

Tableau III.12. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire……....57

Tableau III.13. Résultats de l'activité anti-inflammatoire et hémolytique de l'extrait……...61

Tableau III.14. Caractère organoleptique de shampoing…..…..……63

Tableau III.15. Résultats des tests physicochimiques de shampoing……..……...……64

Tableau III.26. Résultats des tests physicochimiques de sérum ...…….65

Abréviations

DGL	Daphné Gniduim.L
DG	Daphné gareu
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PPT	Polyphénols totaux
T	Température
t	Temps
mg EAG/g	Milligramme Equivalent acide gallique par gramme
S/L	Solide / liquide
V	Volume
C	Concentration
pH	Potentiel d'hydrogène
g	Gramme
mL	Millilitre
mgERu/g	Milligramme Equivalent rutine par gramme
TF	Teneur en flavonoïdes
AG	Acide gallique
UV	Ultraviolet
min	Minute
S	Second
$FeCl_3$	Chlorure ferrique
$AlCl_3$	Trichlorure d'aluminium
Na_2CO_3	Carbonate de sodium
K	Facteur de dilution

GR	Globule rouge
NaCl	Chlorure de sodium
Vs	Volume de l'échantillon
PBS	Tampon phosphate saline
TE	Teneur en eau
rpm	Rotation par minute
Pa	Pascal
μm	Micromètre
μL	Microlitre
%	Pourcentage
Ms	Milli siemens
Nm	Nanomètre
Mm	Millimètre
Cm	Centimètre
D	Diamètre
RFC	Réactif de Folin-Ciocalteu
°C	Degré Celsius
Dp	Diamètre des particules

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisait les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (Krief 2003).

Selon (Sofowora 2010), une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais. Selon l'OMS, environ 80 % de la population mondiale dépend essentiellement de la médecine traditionnelle et l'utilisation d'extraits végétaux associées principalement au traitement traditionnel (Beverly et Sudarsanam 2011) ; (Hosseinzadeh, Jafarikukhdan et al. 2015). En effet les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurale et urbaine en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent (Badiaga 2011). La teneur en principes actifs d'une plante médicinale varie avec l'organe considéré, mais aussi avec l'âge de la plante, l'époque de l'année et l'heure de la journée. Il y a donc une grande variabilité dont il faut tenir compte pour récolter au moment le plus opportun (Beloued 2005).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme model pour les composés Pharmaceutique actifs (Madjida 2002).

En Algérie, l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été faits aux l'IXème siècle par Ishà-Ben-Amran et Abdallah Ben-Lounès, mais la plus grande production de livres a été réalisée au XVIIème et au XVIIIème siècle. Même pendant le colonialisme français de 1830 à1962 ; les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces médicinales. En 1942, Fourment et Roque ont publié un livre de 200 espèces végétales d'intérêts médicinales. La plupart d'entre elles sont du Nord d'Algérie et seulement 6 espèces sont localisées au Sahara (MIMOUNI 2021).

Dans le même contexte notre étude a été proposée dans le but de mettre en valeur la plante *Daphné gnidium L,* récolté de la région d'ouzera, en contribuant à l'extraction de ses

biomolécules actives et en évaluant les propriétés physico-chimiques et médicinales des extraits obtenus.

Pour ce faire, notre mémoire est structuré en trois chapitres

- Le premier chapitre porte sur la plante *Daphné gnidium L*, abordant spécifiquement sa description botanique, sa composition chimique, ses propriétés physico-chimiques, ainsi que ses propriétés pharmacologiques et investigation toxicologique
- 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 contient :
    - La présentation du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction
    - La caractérisation physicochimique des extraits du *Daphné gnidium L* et l'Analyse qualitative et quantitative des extraits obtenus
    - La recherche de leurs activités antioxydant, antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire
    - La production d'un shampoing et d'un sérum

Chapitre I :
Daphné Garou

Les plantes représentent une source incroyablement riche en composés phytochimiques, ayant un grand intérêt pharmaceutique et n'ayant pas d'impact négatif sur l'environnement. Elles apparaissent comme une ressource peu chère et renouvelable (Aouadhi 2010)

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 (Dor 2017). Ces plantes sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Moreau, 2003). Donc la valeur d'une plante médicinale dépend de sa richesse plus ou moins grande en un ou plusieurs principes actifs (Djidda and Nait Chalal 2020)

Nous avons sélectionné la plante Daphné Garou, connue sous le nom arabe commun de Lazzaz, pour examiner les propriétés physicochimiques et biologique de ses extraits dans le cadre de notre travail.

I.1.Généralité sur la famille des Thyméleacées

Les Thymelaeaceaes sont une petite famille de dicotylédones, appartenant au Magnoliopsida (Amari 2015) composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres (Mekhelfi and Zaiter 2016).

Plus connue en France sous le nom de daphnacées ; cette famille réunit des arbustes, des arbrisseaux, rarement des herbacés et des lianes. Le 1er prix d'AUGUSTIN_PYRAMUS DE CANDOLLE a été décerné au prof MEISNER DE BALE en 1851 pour sa monographie des thyméléacées paru en 1857 dans le tome XIV du prodrome. (Chahrazed, Kawther et al. 2022).

En étymologie, les thymélées doivent leur nom générique à une espèce dont les feuilles ressemblent à celles du thym et le fruit ressemble à une petite « olive » du mot grec « elaia ». (Beniston 1984).

I.1.1. Répartition des Thyméleacées dans le monde

Les thyméleacées représentent la famille la plus cosmopolite de l'ordre des malvales. Nous la rencontrons dans l'ancien monde, en Afrique du sud, en Australie et en Europe et elle

est abondante en région méditerranéenne**.** Assez commune dans le littoral atlantique. En plus dans l'étage méditerranéen et collinéen atlantique jusqu'à 800m, et en Afrique du nord (Algérie, Tunisie, Maroc). (Chahrazed, Kawther et al. 2022). (Figure I.1)

En Europe occidentale, les Thymelaeaceae sont représentées par une dizaine d'espèces appartenant aux genres Thymelaea et Daphne (Ferrari 2002). Les membres de la famille des Thyméleacées sont répandus surtout dans l'hémisphère sud et dans les climats tropicaux et tempérés voire dans les zones arides pour quelques espèces et sont absents seulement dans les régions aux climats froids (Gueriani et Boudraf 2018).

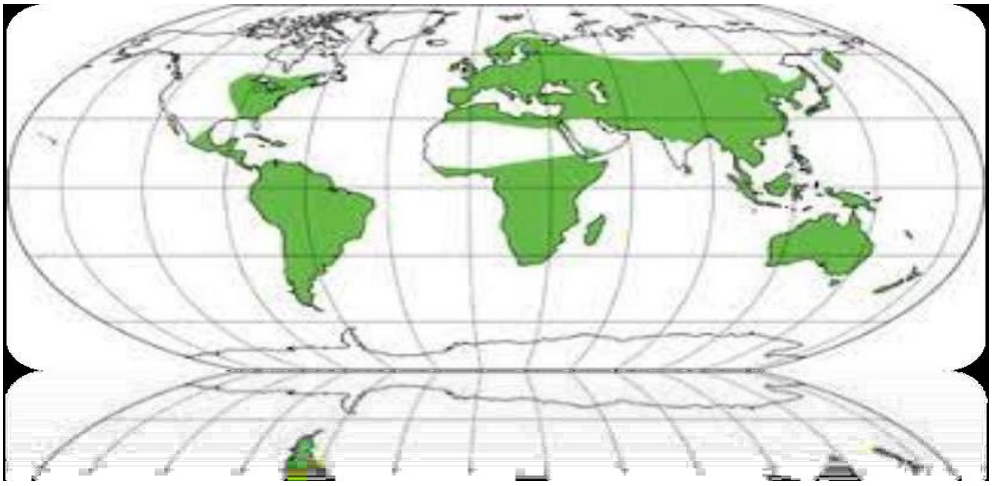


Figure I.1. Carte de répartition mondiale des Thyméléacées (Ouzlifi, 2015)

I.1.2. Genre Daphné

Parmi les principaux genres de Thymélaeaceae, nous avons le genre Daphne avec environ 70 espèces. Ce sont des arbustes ou arbrisseaux connues par leurs fleurs odorantes et leurs baies toxiques (BENAICHA and YAHIAOUO 2022).

Les trois Daphne les plus répandues sont

1) *Daphne mezereum (L)* (Bois gentil).
2) *Daphne laureola (L*) (La lauréole).
3) *Daphne gnidium (L)* (Le garou) (Ramdani, Lograda et al. 2015).

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

Le daphné garou est une espèce appartenant à la famille des *Thyméléacées* (Figure I.2) C'est une petite famille de dicotylédones composée de presque1200 espèces réparties en 67 genres.

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.2. *Daphné gnidium.L*

I.2.1. Description du Daphné Garou

I.2.1.1. Noms vernaculaires

Tableau.I.1. Noms vernaculaires Daphné Garou

Nom français	Garou, Daphné Garou, Thyméle, Saint Bois
Nom anglais	Flax-leaved (Spurge Flax) Daphn
Nom scientifique	*Daphne guidinum L*
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 tige dressée, ramifiée. À feuilles persistantes, lancéolées-linéaires**.** Larges de 5-7mm au plus, cupsidées, très denses ou ovales-oblongues, aiguës, glanduleuses dessous et terminées par une petite pointe. Type Biologique est nanophanérophytes (2 à 4 m), formation végétale est nanophanérophytaie. Ses rameaux sont minces très feuillés et pubérulents au sommet. C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, existe dans tout le Tell de l'Algérie. La floraison va d'octobre à mars, c'est une plante entomogame (Ladhari, Ladhari et al. 2011) ; (EL FENNOUNI 2012).

- ✓ Les Feuilles **:** sont persistantes pendant un an, sessiles alternes et sans stipules, longues de 2 à 4 cm sur 3 à 7 mm, lancéolées à linéaires ; terminées en pointe ; entières et uninerves. De couleur un peu glauque ; luisante en dessus, pales en dessous. ; subcoriaces et glabres. Elles laissent une cicatrice apparente après leur chute (Ouzlifi 2015). (Figure I.3)



Figure I.3. Feuille de *Daphne gniduim L*

- ✓ Les Tiges : sont des rameaux cylindriques et lisses, à jeunes branches mollement pubescentes, et dressée, ramifié (Ghichi, Aissani et al. 2003). (Figure I.4)



Figure I.4. Tiges de *Daphne gniduim L*

- ✓ Inflorescence : indéfinie sous forme de racème (grappe terminale) irrégulièrement globuleuse à pyramidale, formée de 10 à 60 fleurs sur une longueur de 5 à 10 cm (Mohammedi 2013). (Figure I.5)



Figure I.5. Inflorescence et fleur de *Daphne gnidium L*

- ✓ Fruit : est une baie nue ovoïde de 5 à 8 mm, d'abord vertes, redevenant rouge vive puis Oranger à épicarpe brillant en murissant avec une seule graine (Mohammedi 2013). (Figure I.6)



Figure I.6. Fruits de *Daphne gnidium L*

I.2.1.3. Taxonomie (Miara, Hammou et al. 2013).

Tableau I.2. Taxonomie daphné Garou

Règne	Plante
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosiddae
Ordre	Malvales
Sous ordre	Myrtales
Famille	thymelaeaceae
Genre	Daphne
Espèce	*Daphne gnidium L*

I.2.2. Composition et intérêt médicinal du Daphné Garou

I.2.2.1. Compositions chimiques

Le groupe chimique majoritaire de D. gnidium est représenté par les coumarines (LAHAG Lemya 2019), mais il renferme encore des polyphénols, des flavonoïdes, de faible quantité de tanins (Harizi, Chaabane et al. 2011), les ditèrpenoides, les terpènes et des lignines (Chaabane, Boubaker et al. 2012). (Figure I.7)

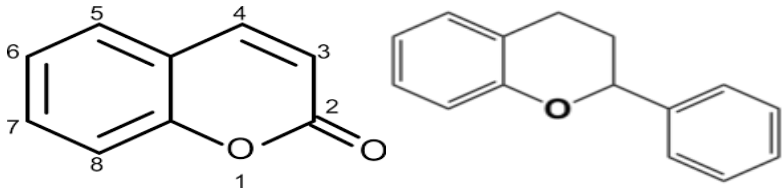


Figure I.7. Squelette carbonée des coumarines(a) et des flavonoïdes (b)

- 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, alors que les feuilles ont donné de la daphnétine, de la daphnine, de l'acétylumbelliférone, de la daphnorétine, lutéoline, lutéoline 7- O-glucoside et side-tocophérol. (Deiana, Rosa et al. 2003)

(Nowik 2005) ont rapporté que les différentes espèces de Daphne renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézérétine (graines). Les structures des composés sont rapportées dans la figure I.8.

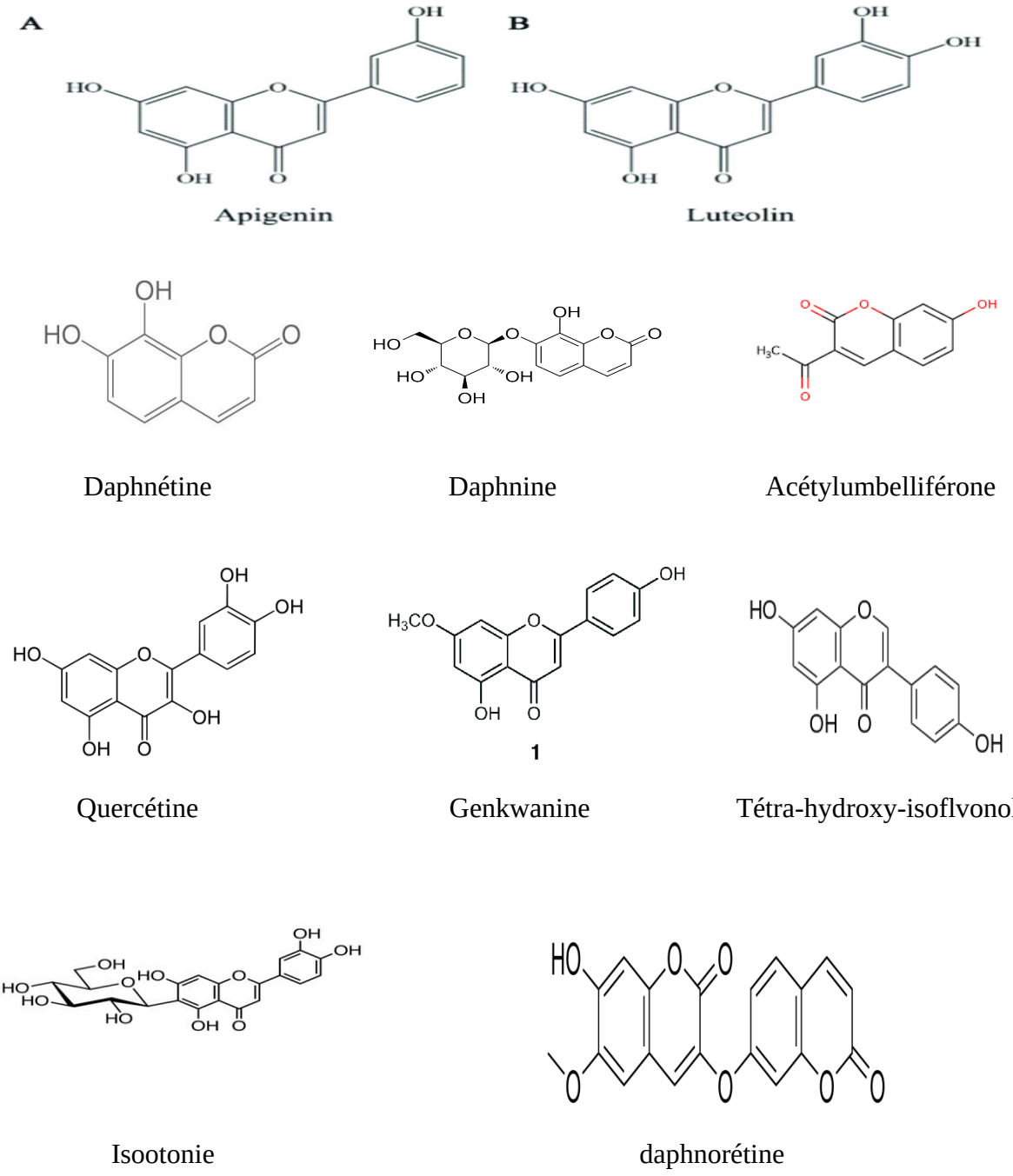


Figure I.8. Structure des principaux composés trouvés dans les extraits de *Daphne gnidium L* (Deiana, Roza et al. 2003, Vidal, Potterat et al. 2012)

I.2.2.2. Intérêt médicinal en générale

Anciennement, l'écorce du *Daphne gnidium L* était utilisé sous forme de pommade aux propriétés épispastiques, irritant la peau, provocant la formation d'ampoules ; pour soigner des maladies de la peau tel la lèpre, syphilis, les furoncles. Traditionnellement, il a été utilisé comme purgatif drastique pour traiter la constipation. (Lahsissene, Kahouadji et al. 2009). Encore qu'elle provoque assez souvent L'apparition de cloques sur la peau. (Lahmar, Lahoula et al. 2008)

L'écorce du garou contient : Daphnine, huile volatile, résine acre, cire, matières colorante jaune, matières azotées, extractif, acide malique, sels. C'est aux matières résineuses et oléagineuses quelle doit ses propriétés. Les fruits contiennent du diterpène et de la mezereine, substance résineuse irritante non détruite par la dessiccation. On trouve aussi du mucilage, des protéines et un principe amer. Les graines sont riches on huile de mezereum. Les feuilles, séchées et pulvérisées, sont associées au henné, dans le traitement des cheveux (croissance, assouplissement et dégraissage). (EL FENNOUNI 2012).

- En phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides et la sclérose en plaque (Mustapha Mahmoud, Fawzia et al. 2016).

- Dans les traditions populaires, Le garou était cloué par les bergers pour éloigner à la fois les puces et les sorcières, Les rameaux minces étaient utilisés comme aiguilles à tricoter. Au Maroc, les femmes utilisent les feuilles du garou pour lisser les cheveux et aussi contre la gale par friction sur le corps (Ouzlifi 2015)

- Dans la pharmacopée traditionnelle, il était utilisé pour ses propriétés antiseptiques, insecticides, dépuratives, cicatrisantes, sudorifiques et abortives. Le Garou possède des effets cytotoxique, antioxydant et antimicrobien (Ladhari, Omezzine et al. 2011). Autre fois, on en faisait des pommades, du papier de la plus haute qualité, des taffetas ... (Ouzlifi 2015).

I.2.3. Propriétés pharmacologiques

Les extraits et les huiles essentielles de *D. gnidium L* ont une activité antiproliférative, insecticide, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique et antioxydante, grâce à sa richesse en composés naturels tels que les coumarines, les flavonoïdes…, etc (Ladhari, Omezzine et al. 2011). Qui sont décrits en détail ci-dessous.

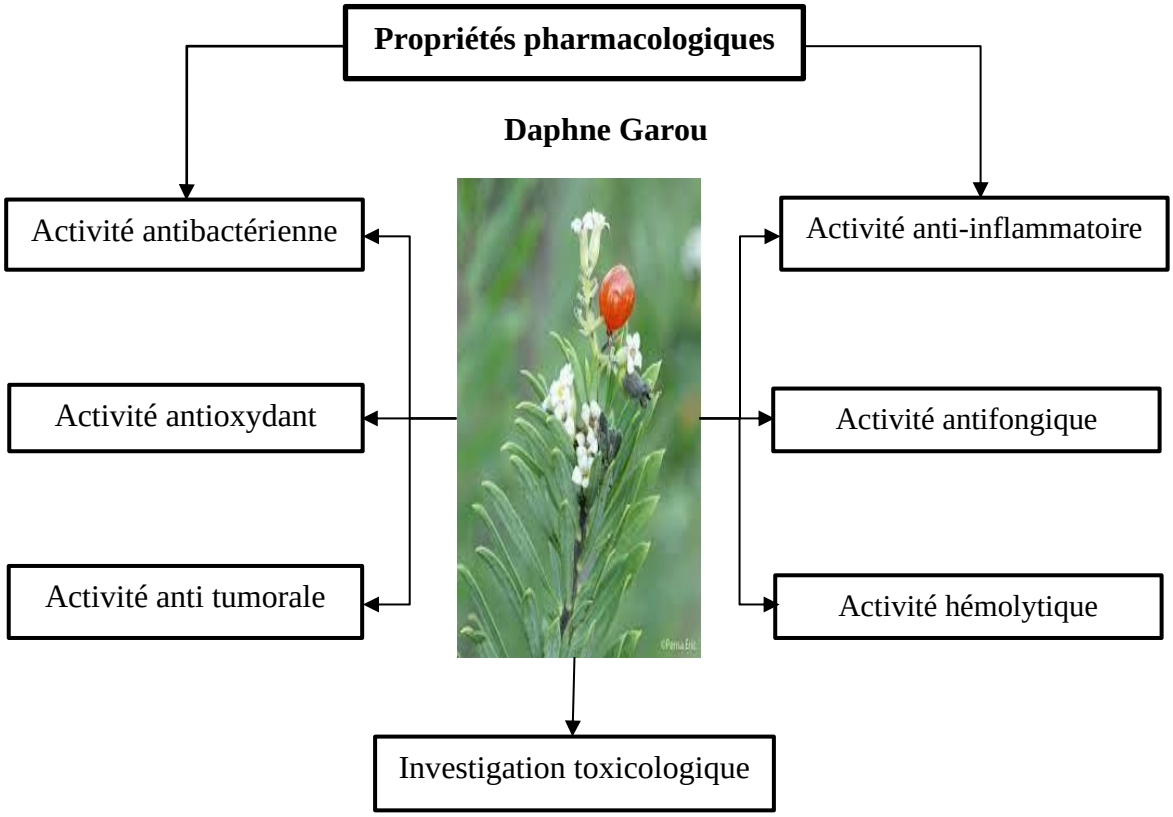


Figure I.9. Propriétés pharmacologiques (Ladhari et al, 2011)

I.2.3.1. Activité antibactérienne

La première étude réalisée sur le D. gnidium est celle de (Sajia, Tomaino et al. 1998), a montré que le teste in vivo des extraits méthanoliques obtenu à partir de feuilles de D. gnidium possèdent une bonne activité antibactérienne et antimycosique et une bonne tolérabilité cutanée, alors que l'extrait d'écorce induit des lésions cutanées photochimiques. La chose qui est confirmée par (Cottiglia, Casu et al. 2005), sur les extrait de tige de D. gnidiume, après une identification par chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression (HPLC) de différents composés constituants l'extrait méthanolique, de nature coumariniques (daphnétine, daphnine, acétylumbelliférone et daphnorétine) et

flavonoïdes (lutéoline, orientine, isoorientine, apigénine-7- O- glucoside, genkwanine, 5- O-β-D -primeverosyl genkwanine, et 2,5,7,4-tétrahy-droxyisoflavanol), présentent une forte activité antibactérienne et antimycotique contre Bacillus lentus et Escherichia coli. D'autres germes bactériens ont été testés par la même équipe de recherche en 2002, avec les extraits de dichlorométhane obtenu à partir de feuilles de *D. gnidium L*. avec une activité antibactérienne modérée contre Staphylococcus aureus et Bacillus cereus. Cependant, il n'a montré aucune activité cytotoxique contre les cellules KB. Cette activité antibactérienne est due à la présence d'un nouveau coumarinolignoïde. (Cottiglia, Casu et al. 2005)

I.2.3.2. Activité antioxydante

L'activité antioxydant du *D.gnidium L* a été exploré par plusieurs équipes de recherches telle que celle de (Deiana, Roza et al. 2003), sur les extraits méthanoliques des feuilles et des tiges de *D. gnidium L* et leur capacité de protéger l'acide linoléique contre l'attaque des radicaux *Daphne gnidium L*. (Deiana, Roza et al. 2003)

I.2.3.3. Activité anti tumorale

Une autre étude a démontré que l'extrait aqueux de feuilles de *D. gnidium L* présentait un effet antiprolifératif (anti tumoraux) et immunomodulateurs contre la lignée cellulaire de mélanome B16-F10. Cet extrait améliore la prolifération lymphocytaire, augmente de l'activité cytotoxique des NK et des CTL, et induit la phagocytose par les macrophages qui sont responsables de la réponse cellulaire non spécifique et augmente l'activité lysosomale dans les macrophages péritonéaux. Cet extrait contient la daphnétine et la lutéoline-7-glucoside qui sont sans danger et n'a pas d'effets secondaires. (Chaabane, Mokdad-Bzeouich et al. 2016)

I.2.3.4. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits organiques de *D. gnidium L* provenant des racines et des feuilles (Maroc et Tunisie, respectivement) a été évaluée in vitro (Chaouki, Leger et al. 2009), (Harizi, Chaabane et al. 2011). Ont testé l'effet anti-inflammatoire des extraits d'hexane, de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de méthanol des racines de *D. gnidium L* 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, Chaabane et al. 2011) ont évalué l'activité anti-inflammatoire in vitro des feuilles de *D. gnidium L* 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.

I.2.3.5. Activité antifongique

L'effet antifongique des extraits de *D. gnidium L* a été signalé contre des souches fongiques dans de nombreux travaux. (Mohammedi end Atik 2013) 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 L* parties aériennes (Maroc), a été également évaluée contre des isolats fongiques. (Essouaadi, Bentata et al. 2015).

I.2.3.6. 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 (Silva, Cortez et al. 2004). Dans ce contexte, les chercheurs ont mené des recherches in vitro pour évaluer l'effet hémolytique de *D. gnidium L* sur les érythrocytes humains (groupes sanguins O) de volontaires en bonne santé. L'extrait méthanolique des feuilles de *D. gnidium L* (Algérie) a montré une hémolyse de 7,060 % à 500 µg/mL (Zohra and Fawzia 2014). Cette activité a également été confirmée in vitro par (Ameni, Baghiani 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.

I.2.4. Investigation toxicologique

I.2.4.1. Toxicité de l'espèce

Toutes les parties de la plante sont toxiques par leurs feuilles et leurs fruits. Le contact de la sève avec la peau peut causer chez certaines personnes des dermatites, 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. (BENIACHA and YAHIAOUI 2022)

L'ingestion des fruits déclenche une ulcération du tube digestif et le contact des écorces avec la peau ou les muqueuses provoquent une irritation importante (MOHAMMEDI and ATIK 2012)

La toxicité des thyméléacées est bien établie pour les êtres humains, aussi bien que pour de nombreuses espèces animales. Les graines et les écorces de différentes espèces de Daphne renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines). 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).

I.2.4.2. Toxicité aiguë de Daphne

A. Chez l'homme : Au cours des intoxications provoquées par ces fruits, les symptômes les plus fréquents sont
   - Irritation rénale avec hématurie et protéinurie. En cas d'action externe, une rougeur type érysipèle de la peau et de la muqueuse buccale avec formation des vésicules apparait.10 à12 baies chez l'adulte et seulement 6 baies chez l'enfant sont considérées comme létales (Reichl, Benecke et al. 2010)
   - Irritation intense voire ulcération des muqueuses « bouche, œsophage » avec salivation et impression de soif intense.

B. Chez l'animal

La toxicité pour les animaux domestiques constitue un sérieux problème dans l'industrie du bétail particulièrement dans le sud de l'Afrique et en Australie, ces animaux ont développé dans des symptômes similaires, de faiblesse progressive. (Ferrari 2002)

Chapitre II :

Métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. Les métabolites secondaires, en contraste avec les métabolites primaires, sont des substances présentes dans un organisme qui ne participent pas directement aux processus fondamentaux de la cellule vivante. Ils regroupent plusieurs milliers de molécules différentes chez les végétaux, telles que les polyphénols, les terpènes, les stérols et les alcaloïdes, et se distinguent généralement par leurs concentrations faibles dans les tissus végétaux. (Bourgaud 2013)

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.1. Classification des métabolites secondaire

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine. Quelques exemples représentatifs sont présentés ci-après, grâce à une revue des ouvrages de (Bruneton 1999).

Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. (Abderrazak and Joël 2007)

II.1.1. Polyphénols

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). (Hennebelle Sahbaz et al. 2004) (Figure II.1)

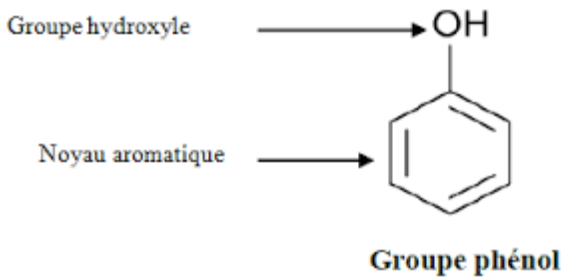


Figure II.1. Structure chimique des polyphénols

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 2008).

II.1.1.1. Classification

Les composés phénoliques prennent en compte, à la fois des éléments structuraux et l'origine biogénétique des composés. Ils se caractérisent par la présence d'un noyau benzénique, portant un groupement hydroxyle libre ou engagé dans une fonction ester, éther ou hétéroside. Le ou les noyaux aromatiques peuvent être synthétisés soit par la voie du shikimate, soit par celle de l'acétate, ce qui permet de différencier deux classes de composés phénoliques, les non flavonoïdes (acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les stilbènes et les tannins hydrolysables) et les flavonoïdes. (Chira, Suh et al. 2008)

Les composés phénoliques (ou polyphénols) représentent un groupe de métabolites secondaires complexe comportant plusieurs familles. (Figure II.2)

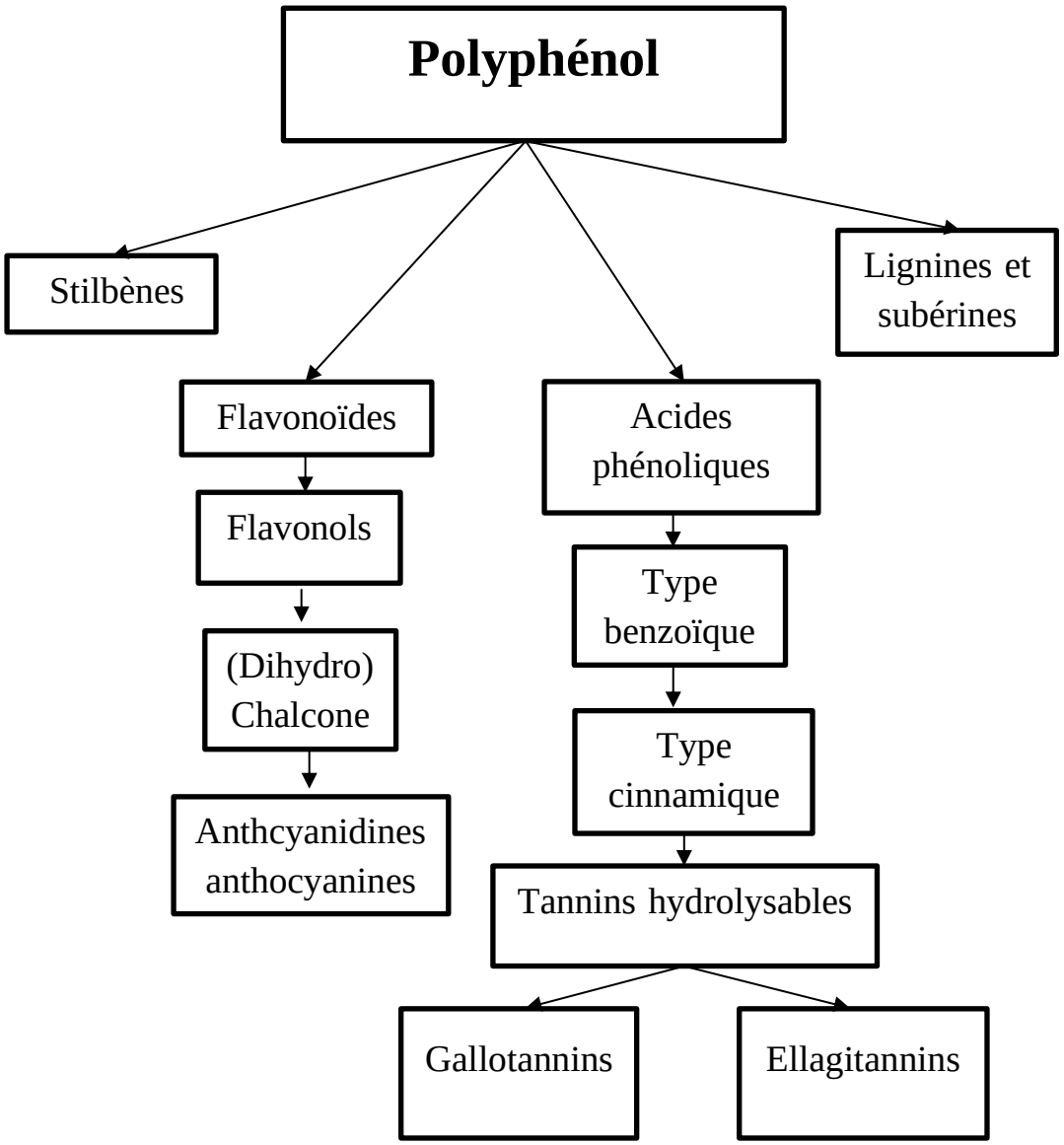


Figure II.2. Différentes familles de polyphénols (collin and Crouzet 2011)

a. Polyphénol simple

Les phénols simples sont rares dans la nature (catéchol, phloroglucinol.)

a.1. Acides phénoliques

Ces composés organiques contiennent au minimum une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. (Figure II.3). Ils sont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Bruneton 2008).

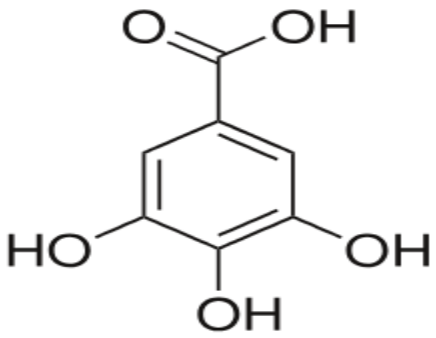


Figure II.3. Structure de l'acide phénolique

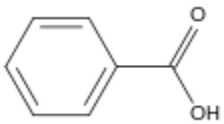
a.2. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides (Bruneton, 2008) ; (Skerget, Kotnik et al. 2005)

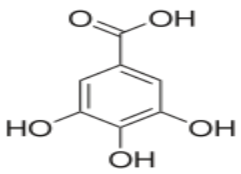
Les acides hydroxybenzoïque dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1. Ces hydroxyles phénoliques OH peuvent ensuite être méthylés.

Exemples :

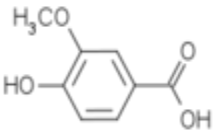
- Acide gallique élément constitutif des tanins hydroxylables
- Acide vanillique dont l'aldéhyde, la vanilline est bien connue comme l'arôme naturel de vanille



Acide benzoïque
(non phénolique)



Acide gallique



Acide vanillique

Figure II.4. Structure de l'acide benzoïque, acide gallique, acide vanillique

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, Scalbert et al. 2004).

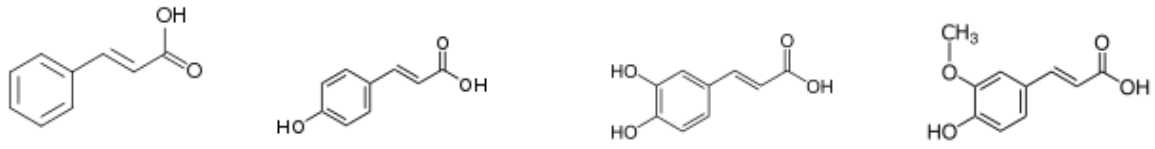
a.3. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)

Ces composés présentent une distribution étendue, étant rarement trouvés sous forme libre. Ils sont généralement estérifiés (Skerget, kotnik et al. 2005) et peuvent aussi subir des amidifications ou des combinaisons avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols comme l'acide quinique.

Les dérivés de l'acide cinnamique, les acides hydroxycinnamiques ont une structure de base de type C6-C3. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes. Les hydroxyles phénoliques OH de ces dérivés peuvent aussi être méthylés (-O-CH3).

Exemples :

- Acide paracoumarique, dont les lactones, les coumarines, sont largement distribuées dans tout le règne végétal
- Acide férulique
- Acide sinapique
- Acide caféique 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). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) et dans le café. Dans les plantes, ces acides-phénols sont souvent sous forme d'esters d'alcools aliphatiques ou d'esters de l'acide quinique de l'acide rosmarinique ou de glycosides. (Manach et al. 2004)



Acide cinnamique (non phénolique) Acide paracoumarique Acide caféique Acide férulique

Figure II.5. Structure de l'acide cinnamique, acide caféique et l'acide férulique

a.4 Les Flavonoïdes

Les Flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois

des feuilles. Tous les flavonoïdes plus de 4 000 ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural à savoir l'enchainement 2- phénylchromane. (Bruneton 1999)

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 (Ghedira 2005). (Figure II.6)

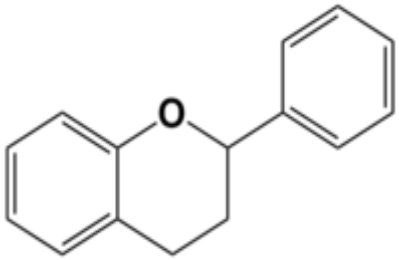


Figure II.6. Structure chimique des flavonoïdes

Ils se répartissent en plusieurs classes : flavones (Apigénine,Luteoline), flavonols (Quercétrine, Kaempférol, Myricétine et Catéchine), flavanones (Naringénine), dihydroflavonols, flavanes, flavanonols, flavan-3-ols (Epicatéchine), flavylium, chalcones, aurones et anthocyanines (Pélargonidine, cyanidine et péonidine), les chalcones (Butéine et phlorétine) et les isoflavonoïdes (Isoflavones, roténoïdes) et les coumaranochromones. (Beunton 2009) voir l'annex

b. Polyphénols complexes

b.1. Tannins

Les tanins sont une famille de composés polyphénoliques qui ont la capacité de se complexer à des protéines, ce qui induit leur précipitation. (Figure II.7)



Figure II.7. Structure chimique des tanins

Leur masse moléculaire est comprise entre 500 et 3000 PM (Atefeibu 2002).Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques. Ils sont constitués soit de polyol (ou polyalcool ou glycol, caractérisé par des groupes hydroxyle) (glucose le plus souvent) ou de catéchine ou de triterpénoïde auquel sont attachés des unités galloyles (ou leurs dérivés) ou soit d'oligomères ou polymères de flavanols. On distingue, habituellement, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que parleur origine biogénique : tanins hydrolysables, tanins galliques condensés (Beunton 2008).

b.2. 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). 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 2008). (Figure II. 8)

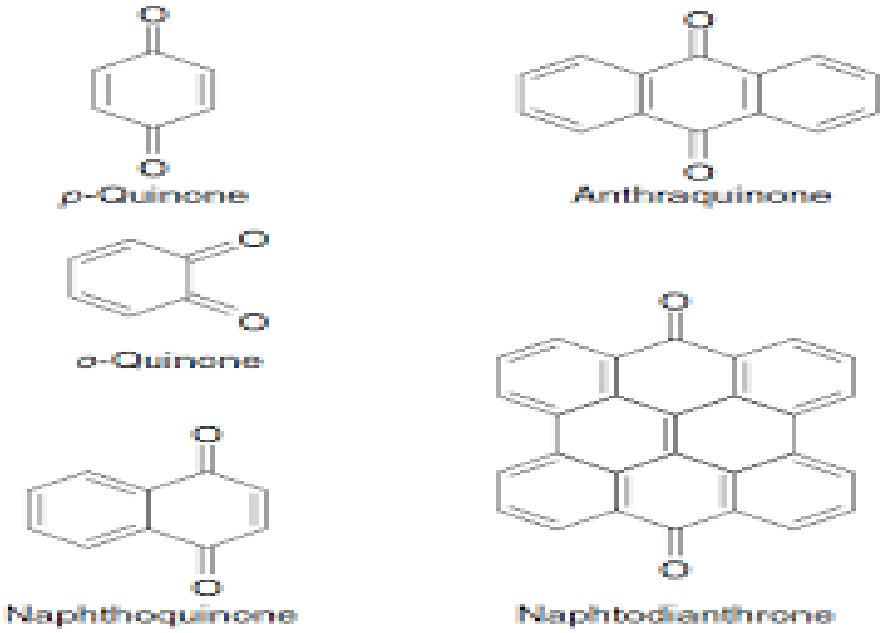


Figure II.8. Structure chimique des motifs quinoniques

b.3. Coumarines

Les coumarines Présentes dans la nombreux végétaux, Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme état les

lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (Beunton 2008), elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide coumarique (FigureII.9).

Il existe quatre principaux sous-types de coumarines : les coumarines simples, les furanocoumarines et les pyranocoumarines et les coumarines à substitution pyrone. (Jain and Joshi 2012).

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 coeur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées, et produite en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexine. (Vivas, Vivas de Gaulejac 2001).

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).

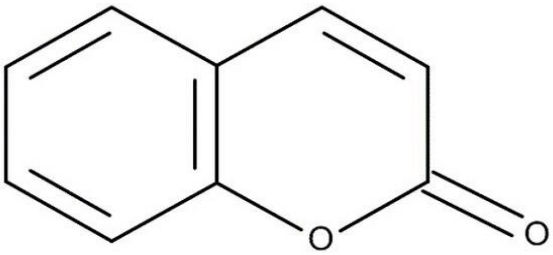


Figure II.9. Structure chimique des coumarines

b.4. Saponines

Les saponines sont très fréquentes dans les plantes médicinales. D'un point de vue chimique, elles se caractérisent également par la présence d'un radical glucide (glucose, lactose) associé à un radical aglycone. Sa principale propriété physique est la forte réduction de la tension superficielle de l'eau. Toutes les saponines sont très moussantes et font d'excellents émulsifiants. (Fricker-Hidalgo, Cimon et al. 2013) (Figure.II.10)

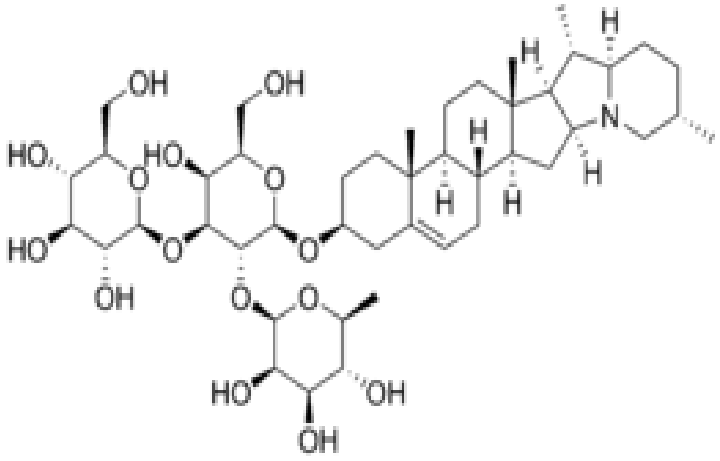


Figure II.10. Structure chimique des saponines

II.1.1.3. Propriétés physicochimiques des composés phénoliques

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).

II.1.1.4. Propriétés biologiques

Depuis des siècles, certaines plantes et épices ont été intégrées à la pharmacopée traditionnelle asiatique, mais ce n'est que récemment que la recherche scientifique a validé les propriétés médicinales attribuées aux polyphénols. Il a été établi que les flavonoïdes qui présentent des activités anti-inflammatoires, antiallergiques, hépatoprotectrices, antithrombotiques, antivirales et anticancéreuses.

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).

II.1.2. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène), les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Comme les dérivés des acides gras, tels les acétogénines, les terpènes ont pour origine biosynthétique l'acétyl CoA ou le malonyl CoA. Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques des végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou encore des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent chez les animaux. Cependant, l'extrême diversité des terpénoïdes chez les végétaux contraste avec le petit nombre détecté chez les animaux

Le nombre d'unités isoprèniques définit les différentes classes de terpènes : monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterterpènes (C25), triterpènes (C30) et tétraterpènes (C40). Les terpènes simples en C10 et C15 sont certainement apparus tardivement au cours de l'évolution et caractérisent les plantes vasculaires ayant développé des appareils sécréteurs (Krief 2003)

II.1.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle, éventuellement reproductibles par voie synthétique, le plus souvent végétale, azotés, plus ou moins basique (Beunton, 2009).On estime à plus de 10.000 alcaloïdes différents isolés à partir de sources végétales, animales ou microbiennes **(**Badiaga, 2011).Les alcaloïdes sont utilisés dans le traitement de l'asthme bronchique et comme médicament analgésique et antiallergique (L'éphédrine, isolée d*'Ephedra sinica*), ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (La berbérine, isolée de *Berberis vulgaris*), et sont utile dans le traitement

de la maladie d'Alzheimer (la galanthamine agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la cholinesterase) **(Mauro, 2006)** . (Figure II.11)

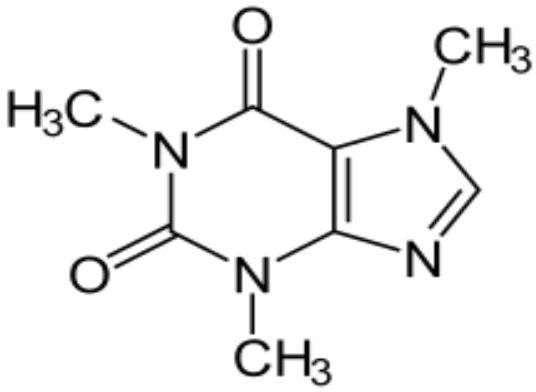


Figure II.11. Structure d'alcaloïdes

Chapitre III :

Partie expérimentale

Ce travail, qui a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie de la faculté de technologie de l'université de Médéa et laboratoire microbiologie de groupe SAIDAL – Médéa- 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, et anti-inflammatoire ;
- Formulation d'un shampoing et sérum à base des extraits obtenus ;

III.1. Matériels et produits

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

Tableau.III.1. Matériels et produits.

Produits	Matériels
• Ethanol (96% labo KHIAT) • Méthanol (96% labo KHIAT) • Eau distillée • Folin-Ciocalteu • Bicarbonate de sodium Na_2CO_3 (100% pure) • Rutine hydraté (pureté ≥94%) • Chlorure d'aluminium ALCL3(20-30%) • Acide gallique Sigma (97.5-102.5%) • Acide sulfurique H_2SO_4 95% (MERCK) • Perchlorure ferrique $FeCl_3$ (40%) • DPPH Sigma (0.5%) • Bleu de méthylène (2%) • Chlorure de sodium NaCl (0.9%) • Solution tampon phosphatée (PBS) • Eau physiologique • Milieu culture Mueller-Hinton • Sang (A+)	• Plaque chauffante et barreau magnétique. • Centrifugeuse. • Etuve. • Spectrophotomètre Uv-vis Cintra 303 Shimadzu GBC V4074 • SCAN 1200®, version 8.6.5.0. • 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 Pétri. • Ecouvillons. • Disque en papier absorbant de diamètre 9mm. • Pince.

III.1.1. Matériel et produits biologiques

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

Les souches bactériennes utilisées, fournies par SAIDAL, sont : *Escherichia* coli, *Bacillus* Subtilis, *Staphulococcus* Aureus *et Staphylococcus* Epidermidis.

III.2. Préparation et caractérisation physicochimique de DG

III.2.1. Séchage de la matière végétale

Les feuilles de DG 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 plante conservée ont été lavées avec l'eau distillée et séchées pendant 24 heures à température 40°C dans l'étuve (Figure.III.1)



Figure III.1. Matières végétales dans l'Etuve.

Les feuilles de DG séchées sont présentées dans la figure III.2.

Avant le séchage Après le séchage



Figure III.2. Matières végétales séchées.

III.2.2. Détermination de la teneur en eau

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

$$TE\ (\%) = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \qquad \text{(III.1)}$$

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 6.424% .Ce résultat, Montre que les feuilles de DG présentent une teneur en eau assez importante d'où l'intérêt du séchage avant extraction afin d'obtenir des rendements appréciables.

III.2.3. Broyage et tamisage de la matière première

Après le séchage, les feuilles DG ont été broyées (Figure III.3.). La poudre obtenue est préservée à l'abri de l'air et humidité.



Figure III.3. Poudre de DG.

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

Tableau III.2. Caractéristiques de la poudre de DG.

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 and Bendi-ouis 2008). L'appareil utilisé est montré dans la figure III.4 (Tamiseuse vibrante), et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III.3 et les figures III.5 et III.6.



Figure III.4. Tamiseuse (Appareil utilisé pour le tamisage de la poudre de DG).

Tableau III.3. Distribution granulométrique de la poudre de DG.

Diamètre	$45\mu m$	$63\mu m$	$125\mu m$	$250\mu m$	$500\mu m$	$1mm$	$2mm$	$4mm$
La masse (g)	1.337	3.571	22.044	41.564	39.681	0.094	0	0

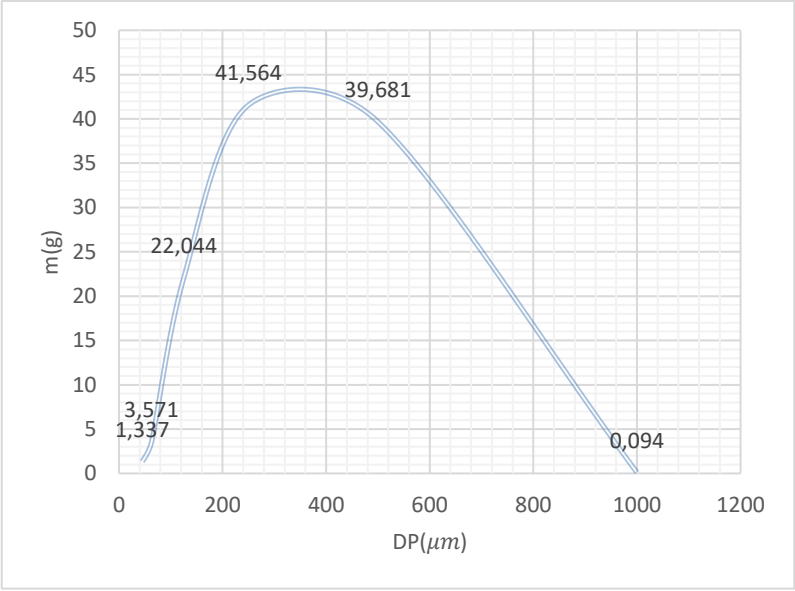


Figure III.5. Variation de la masse en fonction de diamètre.

A partir de cette courbe, on remarque qu'une grande quantité de poudre de DG se trouve dans des diamètres à l'intervalle de 250 μm et 500 μm.

D'après la figure III.6, la distribution granulométrique de la poudre de DG est une courbe gaussienne avec un diamètre moyen des particules de 500μm et 250μm.



Figure III.6. Distribution granulométrique de la poudre de DG.

III.3. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols à partir de la matière végétale (feuille DG) est faite en utilisant une extraction solide/liquide par macération. En générale, le choix du solvant dépend de la nature des composés à extraire et de leur solubilité dans le solvant choisi. Dans notre étude nous avons procédé à l'extraction des polyphénols par une macération en utilisant un mélange binaire 50/50 % (eau /éthanol) et l'eau distillée 100%. On a choisi ces solvants à l'aide des recherches précédente du mémoire de master de (HACEB et KLOUCHI, 2022)

III.3.1. Protocol expérimental

Nous avons opté pour le protocole décrit par (Romaní, Fischer et al. 2006) avec quelques modifications :

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

- Rapport masse de la poudre /solvant d'extraction : S/L=1/35 (Figure III.7.)



Figure III.7. Méthode de macération

- Durée d'extraction : 120 min.
- Température : ambiante (25°C). (Figure III.8.)



Figure III.8. L'appareillage utilisé pour la macération (l'extraction dans le bain-marie).

- Le mélange a été ensuite filtré en utilisant une filtration sous vide (Figure III.9.)



Figure III.9. Filtration sous vide après l'extraction.

- Le filtrat a été centrifugé pendant 10 mn à 4000t/mn (Figure III.10.).

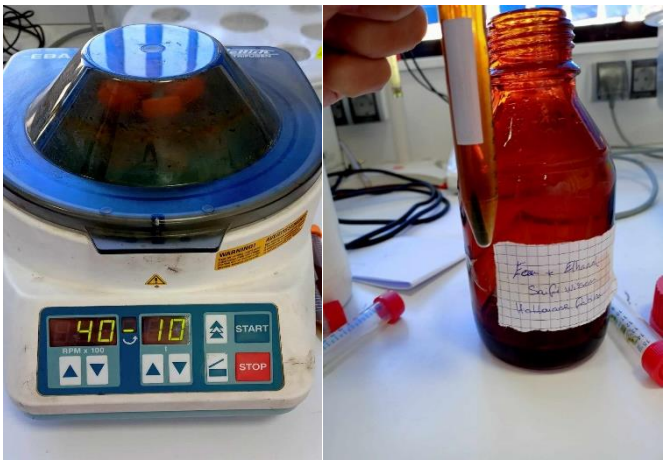


Figure III.10. Centrifugation des solutions.

- Les extraits ont été conservés à 4°C et à l'abri de la lumière dans des flacons teintés (Figure III.11.).



Figure III.11. Extraits obtenus (flacons).

III.3.2. Caractérisation des extraits

III.3.2.1. Caractéristiques organoleptiques

L'aspect, l'odeur et la couleur des extrais obtenus sont résumés dans le tableau III.4.

Tableau III.4. Caractéristiques organoleptiques des extraits.

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

III.4.2.2. Détermination de l'acidité des extraits

Le pH des deux extraits a été mesuré à l'aide d'un pH- mètre de type JENWAY (Figure III.12.). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.5.



Figure III.12. PH-mètre utilisé.

Tableau III.5. PH des extraits obtenus.

Extrait	pH
Eau (500μm)	6.4
Eau/ éthanol (500μm)	5.7
Eau (250μm)	6.5
Eau/ éthanol (250μm)	5.9

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

III.3.2.3. Détermination de conductivité

La conductivité des différents extraits a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type de BANTE (Figure III.13). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.6.



Figure III.13. Conductimètre utilisé.

Tableau III.6. Conductivité des extraits obtenus.

Extrait	Conductivité (ms/cm)
Eau (500μm)	4.50
Eau/ éthanol (500μm)	0.81
Eau (250μm)	4.28
Eau/ éthanol (250μm)	0.82

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

III.4. Analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques

III.4.1. Analyse qualitative

Dans cette partie de notre travail, nous avons réalisé plusieurs tests qualitatifs sur les extraits de DG en se basant sur des études antérieurs (Mazari, Bendimerad et al. 2010) ;(Rajeshwar and Lalitha 2013); (Yam, Ang et al. 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.

III.4.1.1. Recherche des polyphénols

Pour détecter la présence des polyphénols, quelques gouttes de perchlorure ferrique ($FeCl_3$,10%) ont été ajoutées à 2 mL d'extrait (Figure III.14.)

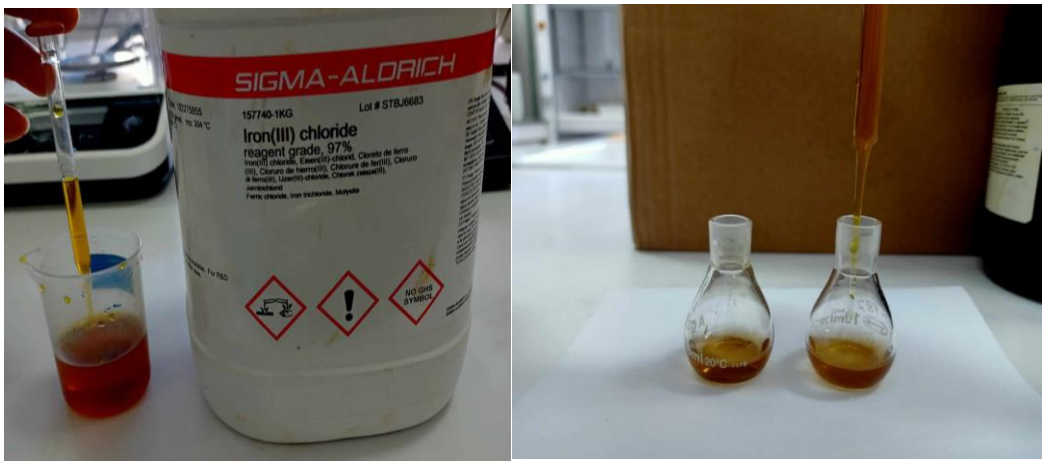
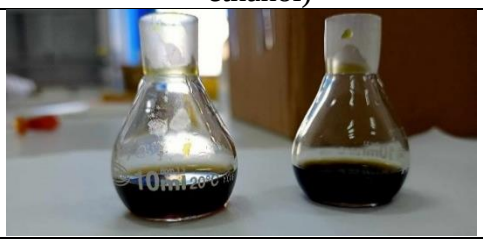


Figure III.14. Perchlorure ferrique ($FeCl_3$,10%).

Nous avons remarqué la formation d'un précipité noir-verdarte intense (Tableau III.7.) qui est le signe de la présence des polyphénols d'après Rajeshwar (Rajeshwar and Lalitha 2013).

Tableau III.7. Recherche des polyphénols.

Pour l'extrait 250μm (l'eau et l'eau + éthanol)	Pour l'extrait 500μm (l'eau et l'eau + éthanol)
	

III.4.1.2. 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 distillée. L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence de tanins galliques. (Tableau III.8.)

Tableau III.8. Recherche des tannins gallique.

Pour l'extrait 250μm (l'eau et l'eau + éthanol)	Pour l'extrait 500μm (l'eau et l'eau + éthanol)
	

Nous avons justifié que la présence des tanins galliques suggère la capacité de notre plante à jouer un rôle majeur en tant qu'agent antimicrobien et antioxydant. (Tepe, Sokmon et al. 2006)

III.4.1.3. Recherche de glycosides

La recherche des glycosides a été effectuée en utilisant le test décrit par (Yam, Ang et al. 2009). 1 mL de l'extrait a été mélangé à 2 mL de chloroforme. Ensuite 1 mL de H_2SO_4 a été ajouté. L'apparition d'une couleur brune-rougeâtre montre la présence des glycosides cardiaques. (Tableau III.9).

Tableau III.9. Recherche de glycosides cardiaques :

Pour l'extrait 250μm (l'eau et l'eau + éthanol)	Pour l'extrait 500μm (l'eau et l'eau +éthanol)
	

Nous avons remarqué une apparition de la couleur brune-rougeâtre (Tableau III.9.) qui est le signe de la présence des glycosides cardiaques d'après (Rajeshwar and Lalitha 2013) .

III.4.1.4. Recherche des saponines

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 (Figure III.15).

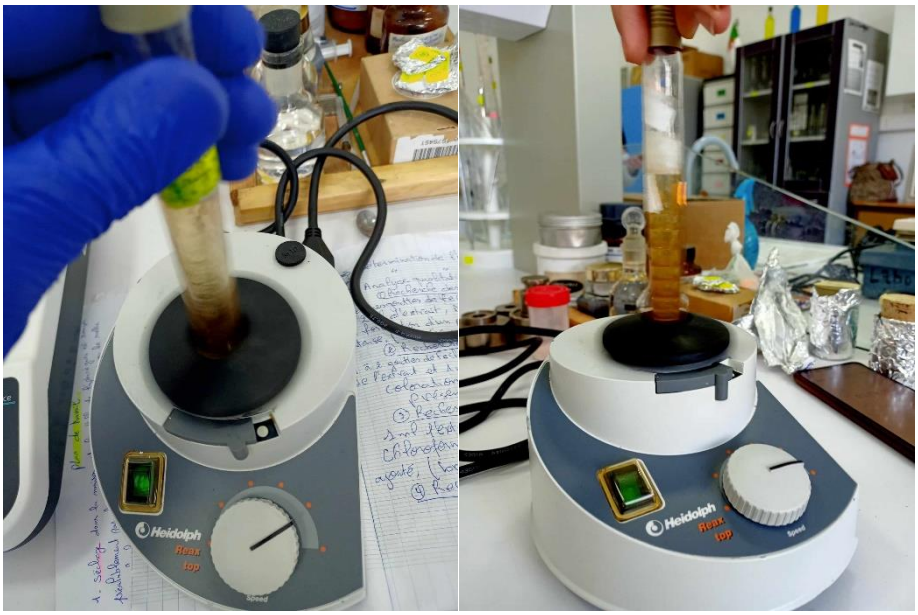


Figure III.15. Recherche des saponines.

- Laisser au repos 5 min.
- Mesurer la hauteur de la mousse par une règle.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure III.16 et le tableau III.10.

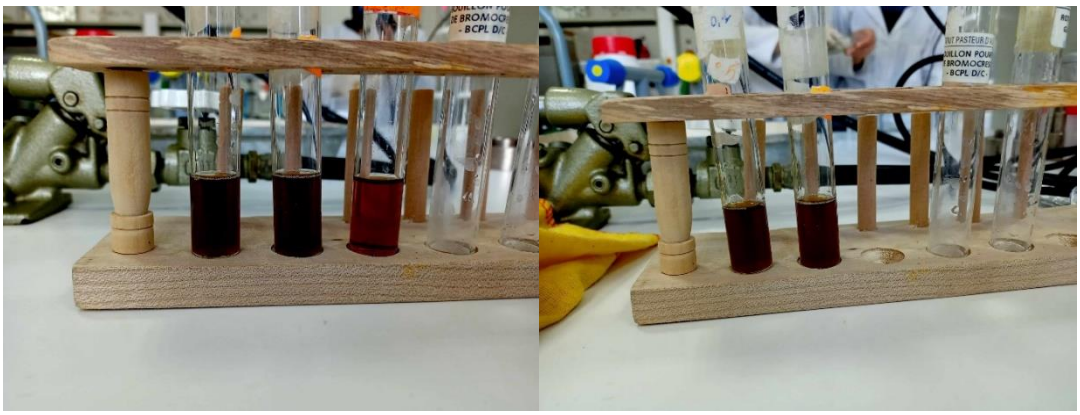


Figure III.16. Résultats de la recherche des saponines.

Tableau III.10. Résultats de la recherche des saponines.

Extrait	Hauteur (mm)
Eau 250μm	1
Eau/éthanol 250μm	0
Eau 500μm	1
Eau/éthanol 500μm	0

Nous remarquons la formation de la mousse dans l'extrait de l'eau alors qu'aucune mousse n'a été observée dans les autres extraits obtenus par le mélange binaire eau/éthanol. Ces résultats signifient la présence des saponines dans les feuilles de daphné garou. Cependant, ils ont plus d'affinité à l'eau.

L'importance de mesurer la hauteur de la mousse dans nos extraits a pour but de connaitre la quantité des saponines

III.4.2. Analyse quantitative

III.4.2.1. Dosage des phénols totaux

a. Principe

Le dosage des phénols totaux se fait â l'aide du Réactif de Folin-Ciocalteu (RFC), qui en présence de polyphénols et en milieu alcalin se réduit en oxyde de tungstène et de molybdène donnant une couleur bleue (Singleton, Orthofer et al. 1999).

Les composés phénoliques réagissent en milieu basique (pH ~ 10) avec le RFC, en effet, dans ces conditions, la dissociation d'un proton phénolique mène à un anion phénolate qui est capable de réduire le RFC par des réactions réversibles impliquant le transfert d'un ou de deux électrons. Cette réaction conduit â la formation d'espèces chimiques de couleur bleue, probablement le complexe $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$.

Le RFC pouvant être réduit par beaucoup de composés non phénoliques (par exemple la vitamine C, le Cu (I), etc.), ce réactif n'est donc pas spécifique aux composés phénoliques (Singleton, Orthofer et al. 1999) .

Le composé phénolique standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique. Les teneurs des phénols totaux sont calculés à l'aide de l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

b. Méthode expérimentale

- ✓ Un volume de l'extrait éthanol/eau (50%/50%) (250μm -500μm) de 0.5 mL est dilué 200 fois dans le mélange éthanol/eau (50%/50%). (Figure III.17)
- ✓ Un volume de l'extrait eau (250μm -500μm) de 0.5 mL est dilué dans l'eau (100%) pour donner une dilution de 200 fois. (Figure III.17)

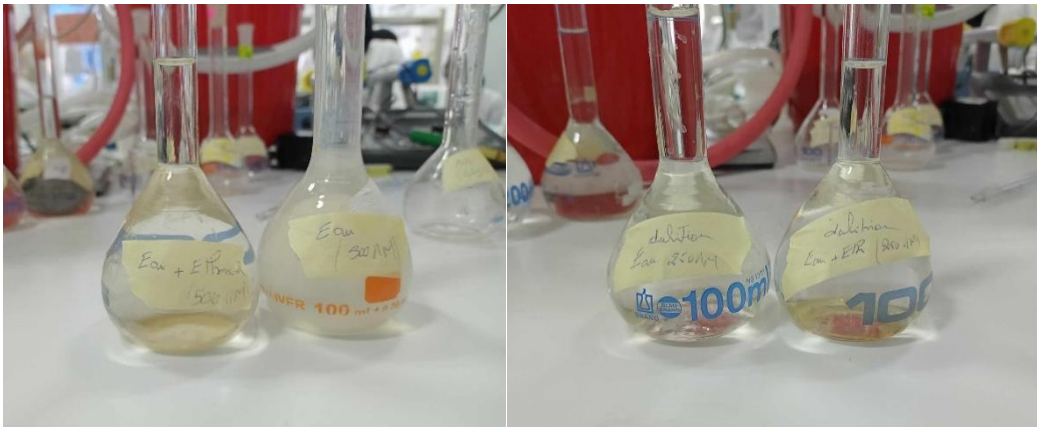


Figure III.17. Dilution des extraits

- ✓ Le réactif Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10 dans de l'eau ultra pure)
- ✓ La solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (1M) 2 mL par tube.
- ✓ La teneur en phénols totaux est exprimée par rapport à un composé référence qui est l'acide gallique, dont la structure est représentée sur la figure III.18.

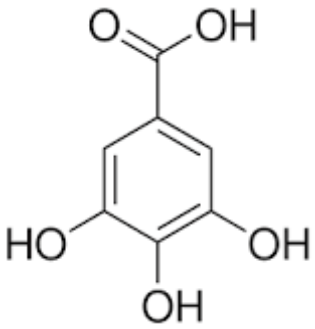


Figure III.18. Structure chimique de l'acide Gallique.

Comment préparer la solution de l'acide gallique ?

On à la solution concentrée (C= 0.5g/L)

Dans une fiole de 200 mL on ajoute 0,1 g de l'acide gallique puis on ajoute 10 mL d'éthanol et complété par l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge. (Figure III.19).



Figure III.19. Solutions préparées.

Pour cela, une gamme étalon de cet acide a été réalisée avec 4 niveaux de concentrations (0.1 ; 0.2 ; 0.3 ; 0.4 g/L) (Figure III.20), puis la courbe d'étalonnage donnant la variation de l'absorbance à 750 nm en fonction de la concentration a été tracée.



Figure III.20. Différentes concentrations préparées de l'acide gallique.

D'après la méthode décrite par (Pourmorad, Hosseinimehr et al. 2006), une prise d'essai de 0.5 mL d'une solution diluée (eau – eau/éthanol (50%/50%)) est mélangée avec 2.5 mL de réactif Folin- Ciocalteu (dilué à 1/10 dans de l'eau ultra pure) et 2 mL de carbonate sodium Na_2CO_3 (1M).

Le mélange est agité puis laissé pendant 15 minutes à l'obscurité et à la température ambiante. Les différentes préparations obtenues sont présentées dans la figure III.21.

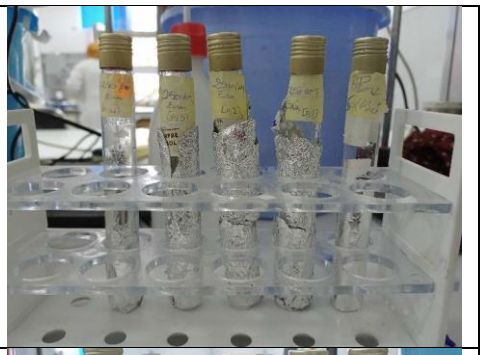
Pour le solvant eau (100%)	
Pour le solvant eau/éthanol (50%,50%)	

Figure III.21. Différentes préparations pour dosage des polyphénols totaux

A la fin de la réaction, la solution obtenue présente une coloration bleu foncé (figure III.22) dont on mesure l'absorbance à la longueur d'onde 750 nm.

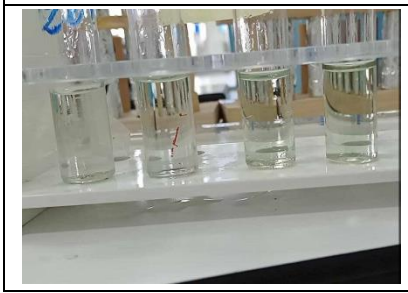
Avant	Après
	

Figure III.22. Coloration des solutions avant et après 15 minutes.

Après 15 minutes, on remarque un changement progressif dans la couleur des solutions, et cela résulte du changement des concentrations des solutions, nous en concluons que l'intensité de la couleur est directement proportionnelle à l'intensité de la concentration d'acide gallique.

La lecture de l'absorbante a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/vis de marque UVmimi-1240**.** (Figure III.23)



Figure III.23. Lecture de l'absorbante à l'aide d'un spectrophotomètre UV.

Les teneurs en phénols totaux des différents extraits ont été déterminées directement à partir de la courbe d'étalonnage (Figure III.24.25) qui présente un coefficient de régression proche de 1.

c. Résultats et discussion

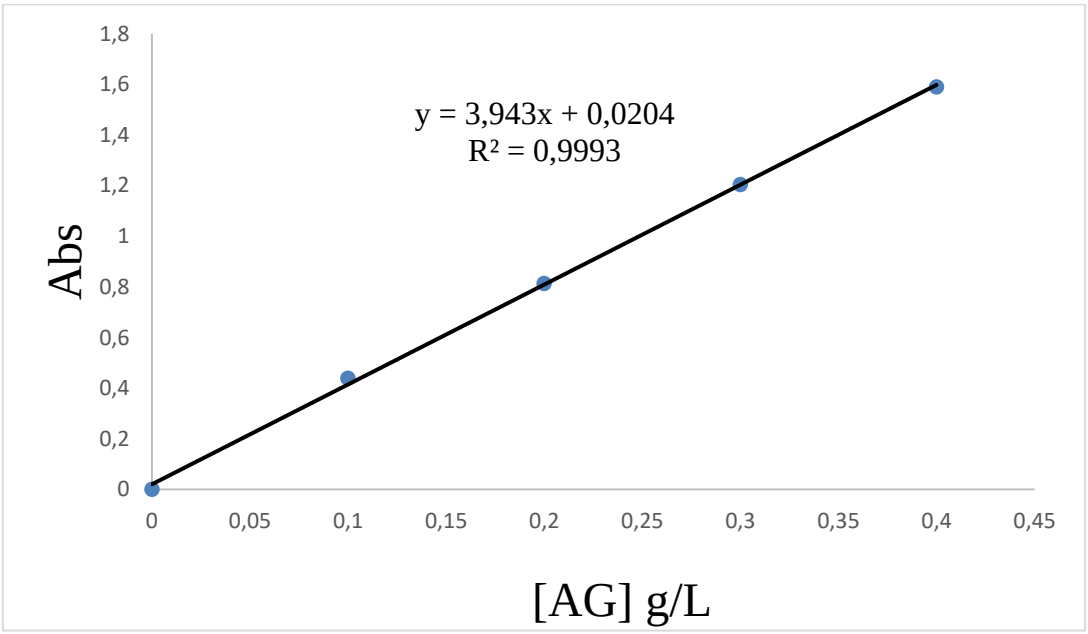


Figure III.24. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique Pour le solvant eau.

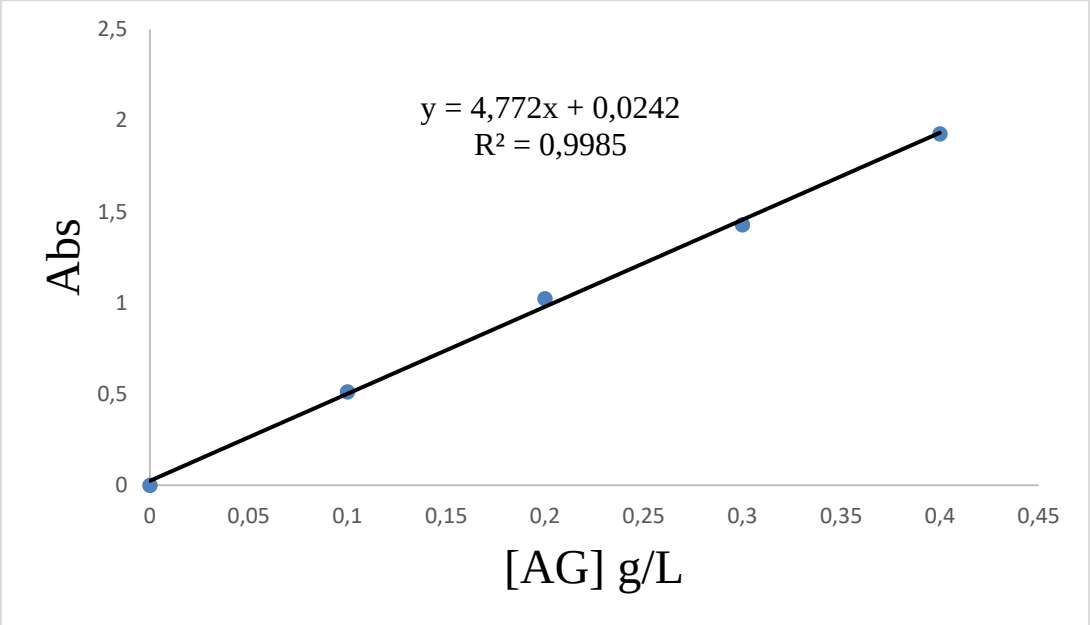


Figure III.25. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique Pour le solvant eau/éthanol (50%/50%).

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

$$TPP = \frac{V_S \times C \times K}{m_p} \qquad \text{(III.2)}$$

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

m_p : masse d'échantillon en (g)

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions varient entre 92.86 et 471.43 mg EAG/g. La teneur la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait d'eau $500\mu m$, avec une teneur de 471.43 mg EAG/g**,** par rapport aux extraits eau/éthanol ($250\mu m$ / $500\mu m$) et l'eau $250\mu m$, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de 142.86 et 92.86 mg EAG/g respectivement.

D’après ces résultats, on déduit que le contenu phénolique dans les extraits examinés, dépend de la polarité du solvant utilisé pour l’extraction.

III.4.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

a. Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium $AlC1_3$. En effet, il a été démontré que ce réactif forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols.

Par ailleurs $A1C1_3$ peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes.

Chang et al ont montré que les complexes formés par l'$AlCl_3$ avec 15 composés flavonoliques références présentent une absorption maximale à des longueurs d'onde variant entre 415 et 440 nm. La teneur des flavonoïdes totaux peut être calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage d'un flavonoïde pris comme référence. (Chang, Huang et al. 2007)

Nous avons choisi de réaliser le dosage à l'aide d'un composé standard, à savoir la quercétine. Ce dernier appartient à la classe des flavonols, sa structure chimique est présentée dans la Figure III.25.

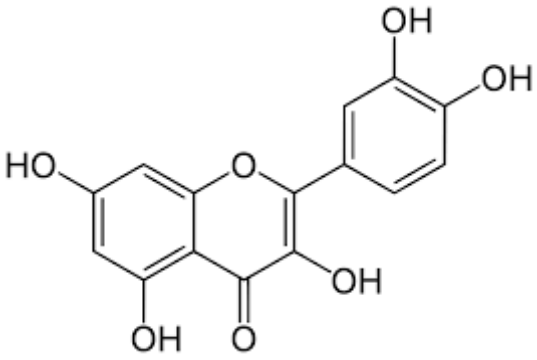


Figure III.26. Structure chimique de la Quercétine.

b. Méthode expérimentale

- ✓ ($AlCl_3$, 6H2O) (10%) ⟶ 1 mg dans 10 mL d’eau ultra pure. **(**Figure III.27.28)
- ✓ L’acétate de sodium (1M) (Figure III.27.28)
- ✓ On à la solution concentrée de Quercétine 0.5g/L. **(**Figure III.27.28)

Dans une fiole de 200 mL on ajoute 0,1 g de Quercétine puis on ajoute 10 mL d'éthanol et complété par l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge. (Figure III.27.28).

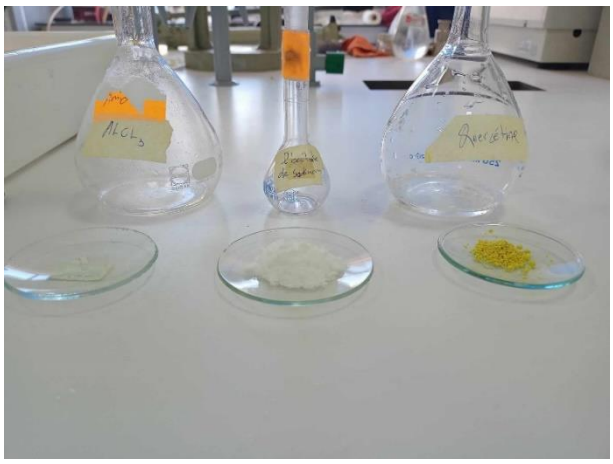


Figure III.27. Masse des produits.



Figure III.28. Solutions préparées.

- ✓ Pour cela, une gamme étalon de Quercétine a été réalisée avec 4 niveaux de concentrations (0.1 ; 0.2 ; 0.3 ; 0.4 g/L). (Figure III.29)



Figure III.29. Solutions diluées de Quercétine.

- ✓ Les flavonoïdes totaux ont été déterminés suivant la méthode décrite par (Pourmorad et al. 2006) avec quelques modifications. Ainsi à 0.5 mL de l'extrait. On ajoute 1.5 mL de méthanol, 0.1 mL d'($AlCl_3$, 6H20) à 10%, 0.1 mL d'acétate de sodium (1M) et 2.8 mL d'eau ultra pure. Le mélange est agité vigoureusement puis laisser pendant 30 minutes à l'obscurité. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 430 nm. La courbe d'étalonnage de la quercétine a été réalisée dans les mêmes conditions avec 4 niveaux de concentration (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 g/L).

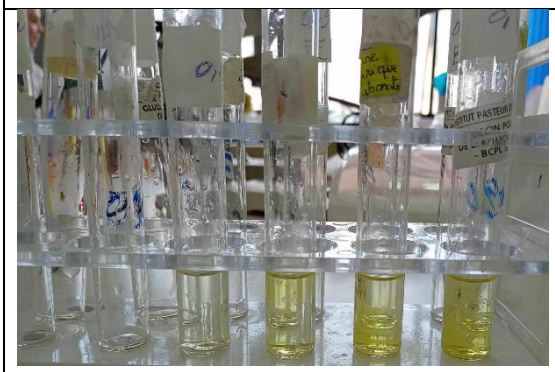
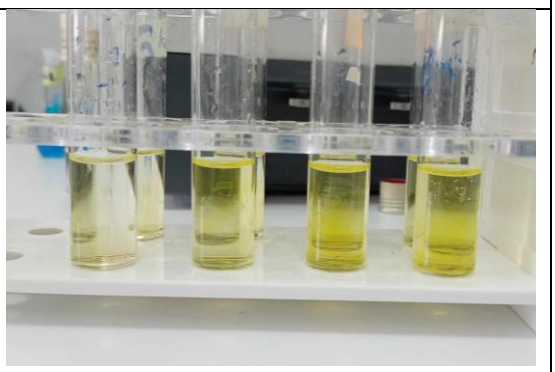
Avant	Après
	

Figure III.30. Coloration des solutions avant et après 30 minutes.

- ✓ Après 30 minutes, On remarque un léger changement dans la couleur des solutions. (Figure III.30)
- ✓ La lecture de l'absorbante a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV/vis de marque UVmimi-1240.

✓ La courbe d'étalonnage présente un coefficient de régression proche de 1 (Les figures III.31.32).

c. Les résultats et la discussion

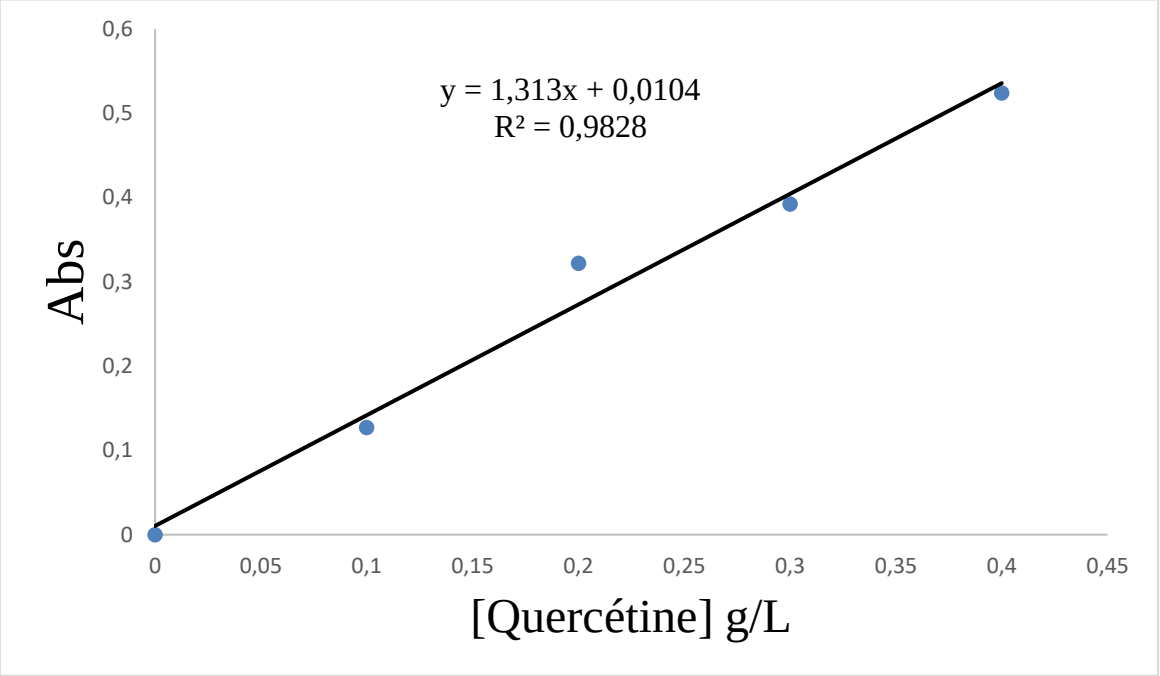


Figure III.31. Courbe d'étalonnage Quercétine pour le solvant eau.

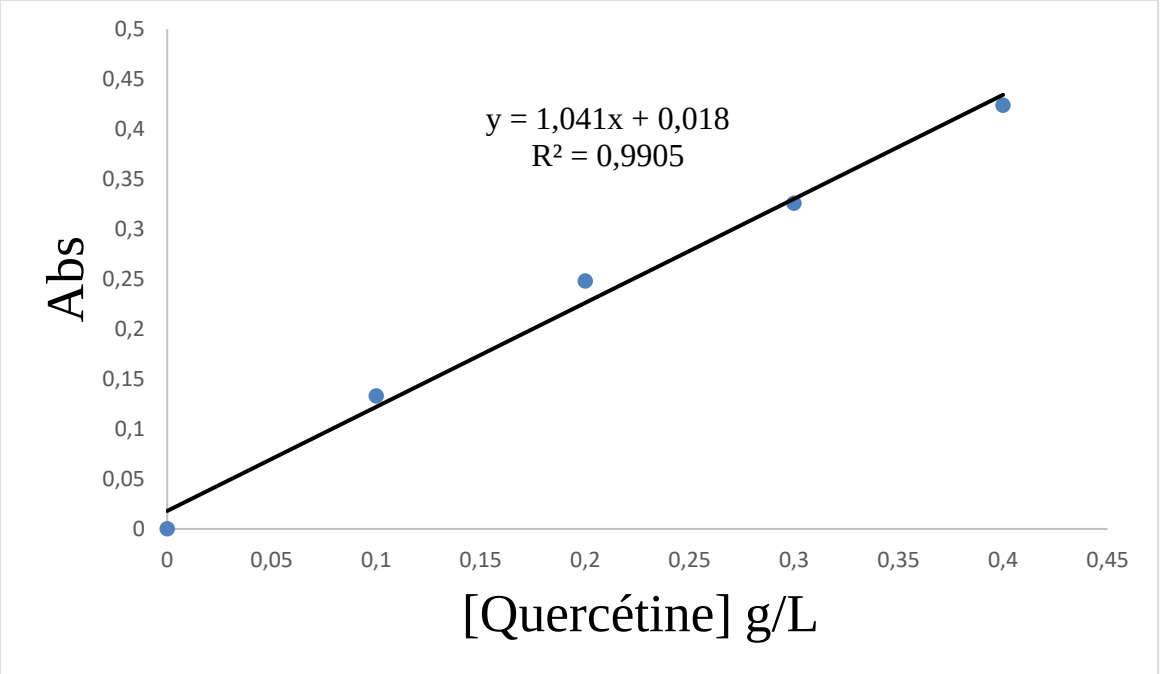


Figure III.32. Courbe d'étalonnage de Quercétine pour le solvant eau/éthanol (50%,50%).

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

$$TF = \frac{V_S \times C \times K}{m_p} \qquad \text{(III.3.)}$$

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

m_p : Masse de l'échantillon (g)

Les résultats montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait d'eau 500 μm enregistre un maximum de flavonoïdes (285.71 mg EQ/g), suivi par les autres extraits qui renferment des teneurs plus faibles (14.29 mg EQ/g).

La teneur des flavonoïdes dans les extraits de la plante, dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits. (Marco 1968)

III.5. Activité antioxydante

III.5.1. Principe

La réduction du radical libre DPPH° (2,2'-diphenyle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure III.33) (Maataoui, Hmyene et al. 2006).

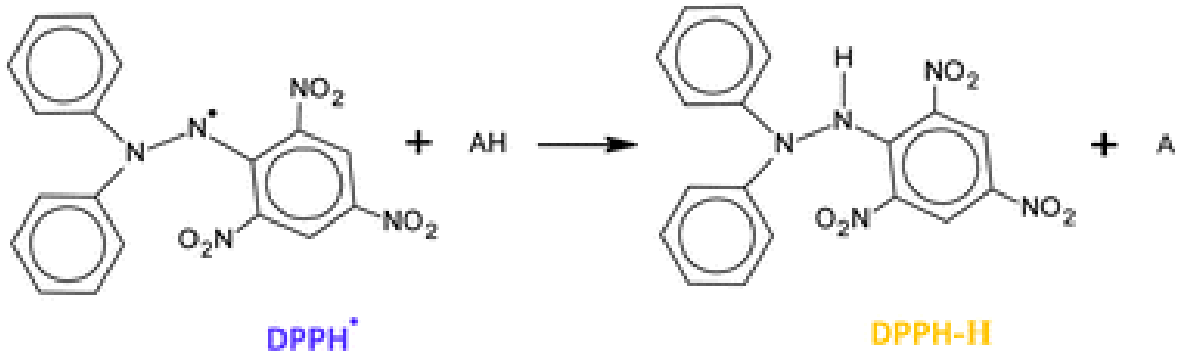


Figure III.3.3. Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).

III.5.2. Méthode expérimentale

- Préparation des solutions méthanoïques des extraits à différentes concentrations

  Dans une fiole de 10 mL on ajoute 1, 2, 3, 4,5 mL de l'extrait et complété par le méthanol jusqu'au trait de jauge afin d'obtenir différentes concentrations. (Figure III.34)

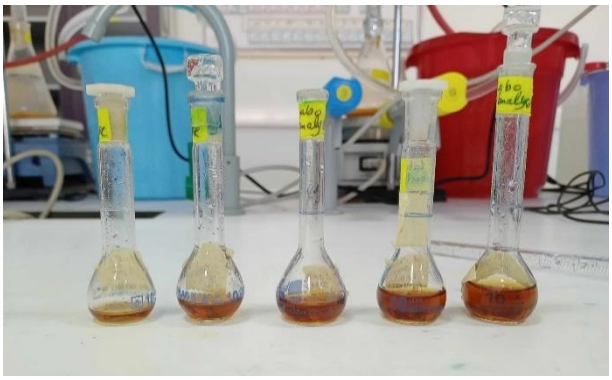


Figure III.34. Solutions préparées de l'extrait.

- Préparation de la solution méthanoïque du DPPH (Figure III.35)

  Dans une fiole de 100 mL on ajoute 4 mg de DPPH et complété par le méthanol jusqu'au trait de jauge.



Figure III.35. Solution méthanoïque de DPPH.

- L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz, Alviano et *al.* 2008) et (Athamena, Chalghem et *al.* 2010). Nous ajoutons 1mL de chaque solution méthanoïque des extraits à différentes concentrations ensuite ajouter 3 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,04g/L). (Figure III.36)

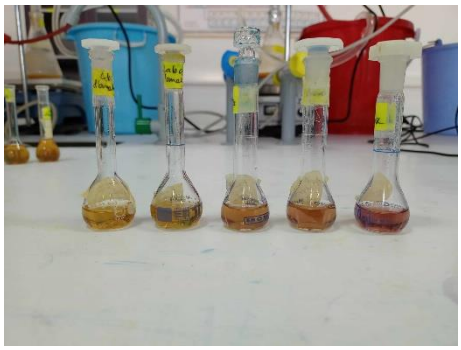


Figure III.36. Solutions méthanoïque préparé.

- La lecture de l'absorbance est faite pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante.

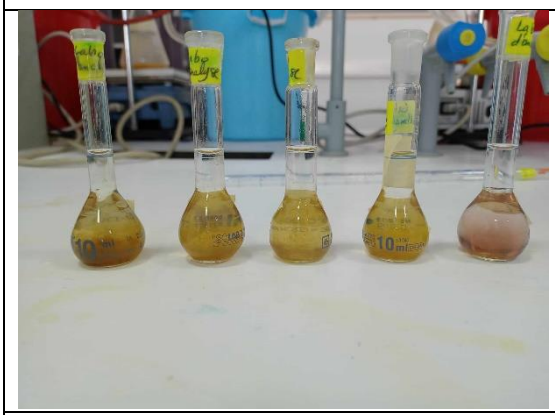
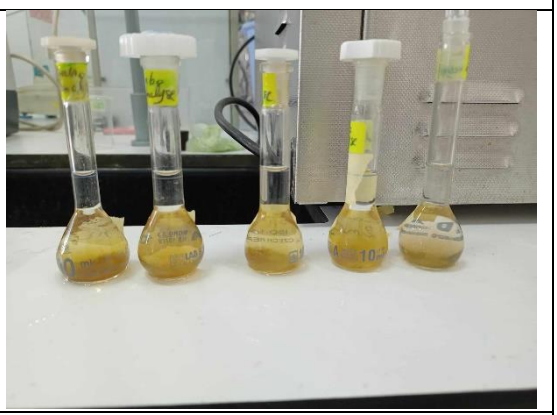
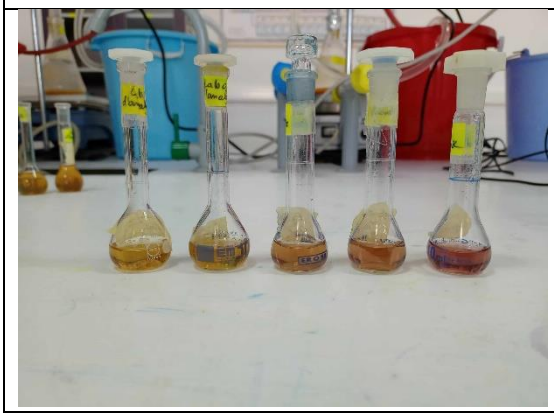
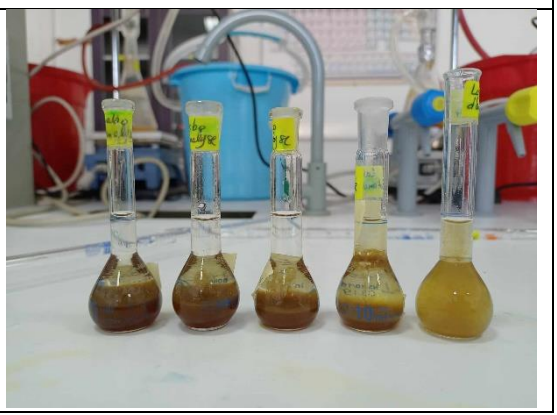
La solution de l'extrait l'eau + éthanol (Avant)	La solution de l'extrait l'eau + éthanol (Après)
	
La solution de l'extrait l'eau (Avant)	La solution de l'extrait l'eau (Après)
	

Figure III.37. Coloration des solutions avant et après 30 minutes.

- Après 30 minutes, On remarque un changement dans la couleur des solutions passant du violet au jaune. (Figure III.37)

III.5.3. Résultats et discussion

Il est à noter qu'après incubation des échantillons à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 min nous avons remarqué le changement de la couleur voulu accompagné par la formation des filaments d'un aspect gélatineux conduisant à la formation des précipités dans la plupart des extraits testés (voir Figue III.37). Donc pour cette raison le test de l'activité antioxydante a été annulé.

Les filaments formés sont probablement dû à la présence des polysaccharides dans nos extraits. Les polysaccharides précipitent en présence de solvant organique comme le méthanol dans notre cas.

III.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de notre extrait poly-phénolique est mise en évidence suivant le même principe que l'antibiogramme. L'effet antibactérien du produit (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 microbienne sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Ainsi, dans cette méthode il y a compétition entre la croissance de la bactérie et la diffusion du produit à tester (Brodasky, Lewis et al. 1976). Les espèces bactéries testées sont :

- *Escherichia* coli
- *Bacillus* subtilis
- *Staphylococcus* aureus
- *Staphylococcus* epidermidis

III.6.1. Mode opératoire

Les différentes étapes réalisées pour l'activité antimicrobienne sont énumérées comme suit (figure III.38) :

1- Préparation de l'inoculum microbien (les suspensions bactériennes): 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 625 nm.

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. Par la méthode d'inondation, dans une zone stérile, verser 1 mL d'échantillon (les suspensions bactériennes) dans une boite de pétri, répartir au fond de la boite par gouttes.

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°C pendant 24 heures.

4- Lecture : Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une appareille SCAN 1200®, version 8.6.5.0.

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par (Mutai, Bii 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.

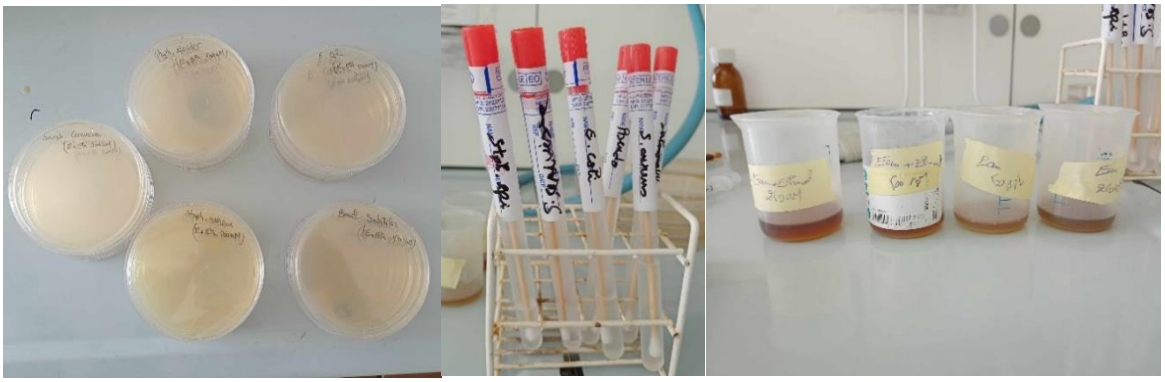
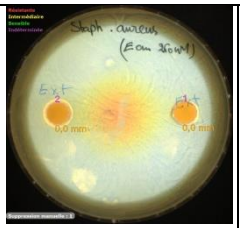
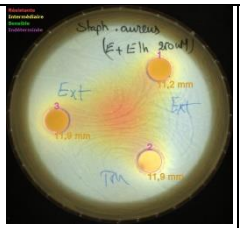
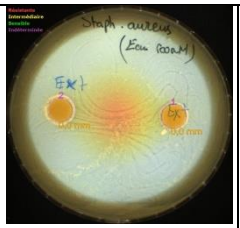
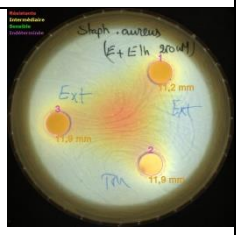
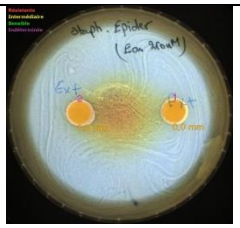
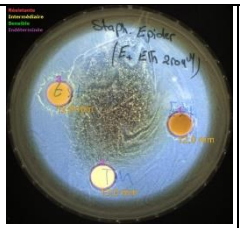
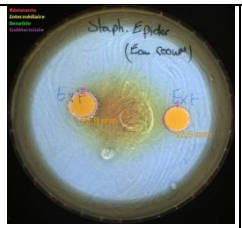
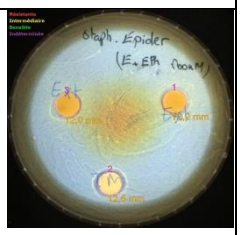
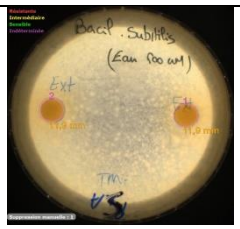
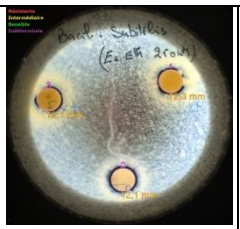
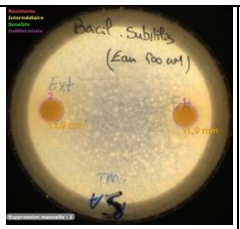
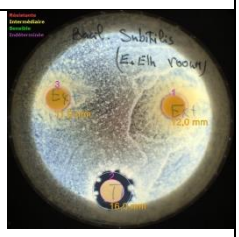


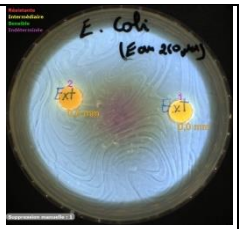
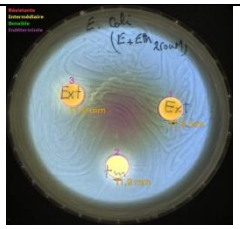
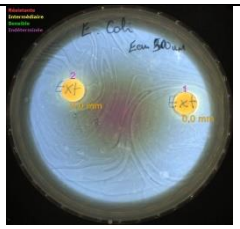
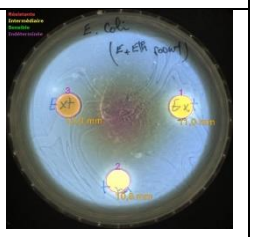
Figure III.38. Test d'antibiogramme

III.6.2. Résultats et discussion

Le test antimicrobien a été effectué sur tous les extraits. Les résultats obtenus pour le DG sont donnés dans le tableau III.11.

Tableau III.11. Résultat de l'activité antibactérienne

La bactérie	*Staphylococcus* aureus			
Le type d'extrait utilisé	 Eau 100% 250μm	 Eau 50% + éthanol 50% 250μm	 Eau 100% 500μm	 Eau 50% + éthanol 50 500μm
Le diamètre (mm)	0	R_1= 11.2 R_2= 11.9	0	R_1= 11.2 R_2= 11.9
La bactérie	*Staphylococcus* epidermidis			
Le type d'extrait utilisé	 Eau 100% 250μm	 Eau 50% + éthanol 50% 250μm	 Eau 100% 500μm	 Eau 50% + éthanol 50% 500μm
Le diamètre (mm)	0	R_1= 12 R_2= 12	R_1= 12.5 R_2= 12.9	R_1= 12.2 R_2= 12.5
La bactérie	*Bacillus* Subtilis			
Le type d'extrait utilisé	 Eau 100% 250μm	 Eau 50% + éthanol 50%	 Eau 100% 500μm	 Eau 50% + éthanol 50% 500μm
Le diamètre (mm)	R_1= 11.2 R_2= 11.9	R_1= 12.3 R_2= 12.1	R_1= 11.9 R_2= 11.9	R_1= 11.9 R_2= 12

La bactérie	*Escherichia* coli			
Le type d'extrait utilisé	 Eau 100% 250μm	 Eau 50% + éthanol 50% 250μm	 Eau 100% 500μm	 Eau 50% + éthanol 50% 500μm
Le diamètre (mm)	0	R_1= 11.4 R_2= 11.9	0	R_1= 11 R_2= 12

Pour la majorité des extraits testés, les zones d'inhibitions obtenues sont comprises entre 11mm≤D≤16mm ceci montre que les extraits du DG possèdent un pouvoir antimicrobien (Légèrement inhibiteurs).

Nous avons remarqué que la bactérie *Staphylococcus* aureus est légèrement sensible à l'extrait eau 50% + éthanol 50% avec une zone d'inhibition varié de 11.2 mm à 12 mm. La bactérie *Staphylococcus aureus* est qualifiée résistante vis-à-vis les extraits d'eau (100%) dont aucune zone d'inhibition n'est observée.

La bactérie *Staphylococcus* epidermidis est également qualifiée légèrement sensible aux deux d'extraits (eau 50% + éthanol 50%) et à l'extrait d'eau 500μm avec une zone d'inhibition de l'ordre 12 mm à 12.9 mm et pas de sensibilité avec l'extrait d'eau 250μm.

Concernant la bactérie *Bacillus* subtilis, elle est sensible aux quatre extraits testés avec des zones d'inhibition allant de 11.9 mm à 12.3 mm

Et pour la bactérie *Escherichia* coli, elle est sensible légèrement aux extraits (eau 50% + éthanol 50%) avec une zone d'inhibition de l'ordre 10.8 mm à 11.9 mm et pas de sensibilité avec deux d'extraits d'eau.

III.7. 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 une régulation fine, généralement bénéfique, qui conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'homéostasie du tissu lésé (Ashley, Weil 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 DG.

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 III.12.

Tableau III.12. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Test in vivo	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, Tupe et al. 2010) ; (Chippada, Volluri et al. 2011)
Induction d'œdème en appliquant l'huile de corton sur l'oreille de souris	(Huang, et al. 2011).
Inhibition de l'activité des protéases	(Govindappa, Naga Sravya et al. 2011).

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, Gupta et al. 2007).

III.7.1. Protocole expérimental

III.7.1.1. Préparation de la suspension des globules rouges

Le sang utilisé a été récupéré au niveau de laboratoire d'analyses -ECHIFA- à Médéa 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 (figure III.39). 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 III.40.



Figure III.39. Sang utilisé.

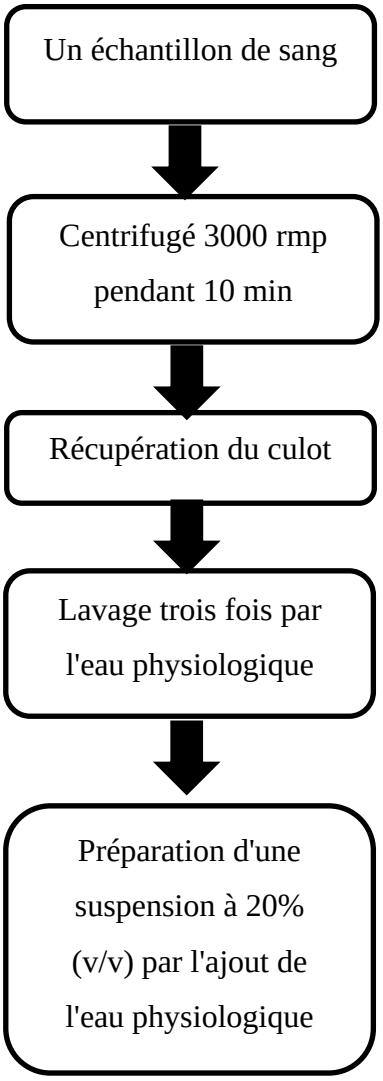


Figure III.40. Récupération des globules rouges.

III.7.1.2. Evaluation de l'activité hémolytique

En parallèle avec l'activité anti-inflammatoire, il est nécessaire d'évaluer la toxicité des extraits des feuilles de DG. 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 cytotoxique. 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 des feuilles de la plante Daphné garou a été réalisée selon la méthode de (Li GuoXiang et Liu ZaiQun 2008).

Dans des tubes à hémolyse, 20 µl de l'extrait (115.38 µg/ml) ont été ajouté à 1980 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 centrifugé à 2500 rpm pendant 10 mn. La lecture de l'absorbance a été effectuée à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS. (Figure III.41.)

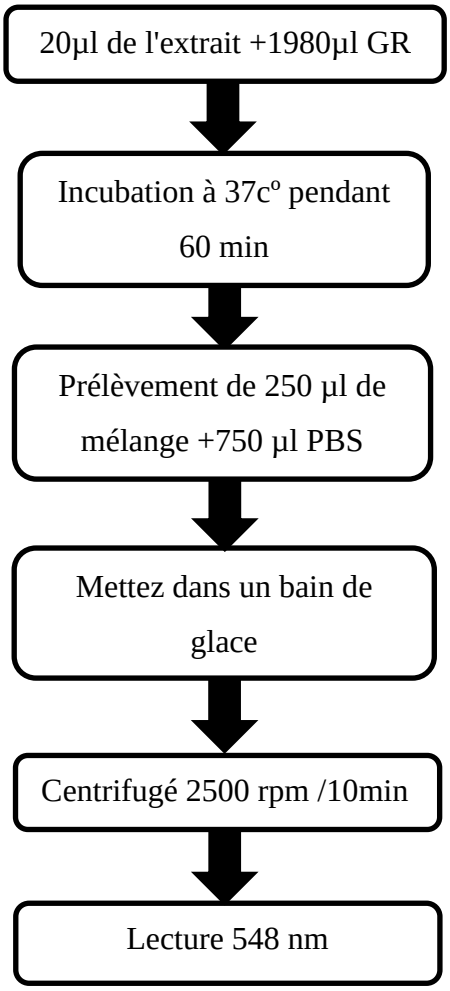


Figure III.41. Dosage de l'activité hémolytique.

III.7.1.3. Effet des extraits sur la stabilité des membranes des globules rouges (activité anti-inflammatoire)

Dans les mêmes conditions et en utilisant la même démarche selon le protocole décrit par (Ganesh, Saurabh et al. 2013) un témoin positif a été préparé dans un tube d'hémolyse contenant 100 µl de la suspension érythrocytaire et 1900 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 suivant.

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = ((DO_{ext} - DO_{TN}) / DO_{TP}) \times 100$$

DO_{ext} : densité optique de l'extrait

DO_{TN} : densité optique de témoin négatif

DO_{TP} : densité optique de témoin positif

III.8.2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.17.

Tableau III.13. Résultats de l'activité anti-inflammatoire et hémolytique de l'extrait

Extraits	Eau 250µm	Eau/éthanol 250µm	Eau 500µm	Eau/éthanol 500µm
Taux d'hémolyse (%)	4.82	3.75	3.79	3.89

Les pourcentages de taux d'hémolyse sont compris entre 3.75 et 4.82%. Ces résultats nous ont permis de dire que tous les extraits testés présentent un effet hémolytique très faible.

D'après nos résultats, nous constatons que les extraits présentent un effet toxique très faible, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas les 8%, ce qui les caractérise par l'absence de risque de cytotoxicité.

III.8. Formulation d'un shampoing et sérum à base des extraits de DG

Dans cette partie nous avons opté pour l'application des extraits de DG dans la préparation d'une formule parapharmaceutique à base des produits bio (naturels).

III.8.1. Protocol expérimental de la formulation

Le shampoing et le sérum ont été préparés selon un protocole bien défini. La formulation préparée est une émulsion de type huile dans eau (H/E) pour le shampoing et pour le sérum c'est une émulsion de type eau dans huile (E/H). Notre extrait (eau 50% éthanol 50% de 500 µm) a été ajouté dans la phase aqueuse et la phase huileuse. Le shampoing et le sérum obtenus sont montrés dans la figure III.42.



Figure III.42. Shampoing et le sérum formulé.



Figure III.43. Emballage de shampoing et le sérum

III.8.2. Caractères organoleptiques du shampoing et du sérum

Les principaux résultats des différents tests de la caractérisation organoleptique du shampoing et du sérum formulé sont regroupés dans le tableau III.14.

Tableau III.14. Caractère organoleptique de shampoing

Test	Shampoing	Sérum
Odeur	Forte	Forte
Couleur	Blanche	Beige
Aspect	Crème	Huileux

III.8.3. Caractérisation physicochimique du shampoing et du sérum

Les principaux résultats relatifs aux différents tests physicochimiques réalisés sur le shampoing et le sérum formulés sont groupés dans les tableaux III.15.16.

Tableau III.15. Résultats des tests physicochimiques du shampoing

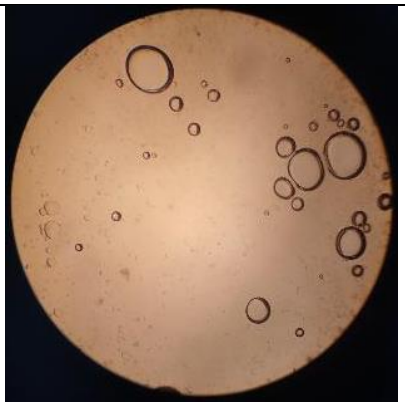
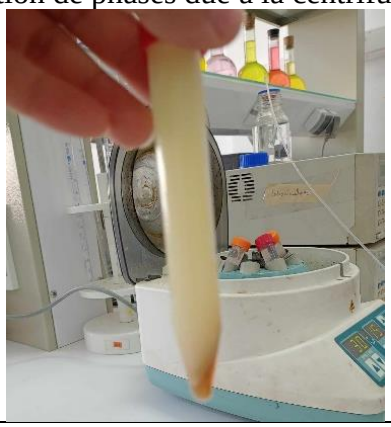
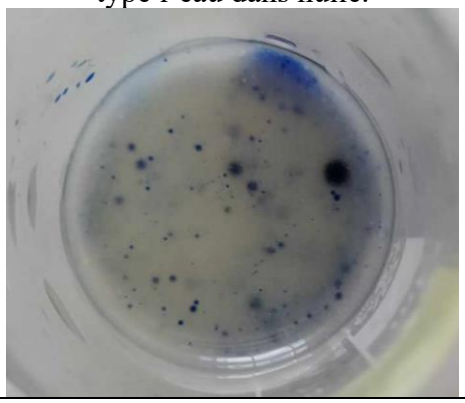
Type de test	Résultat
Conductivité à 23.6 °C	0.22 μs
pH	8.2
Observation sur microscope 	
Centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes	Emulsion stable : pas de séparation à la centrifugation. 
Sens d'émulsion avec la méthode de coloration au bleu de méthylène	La diffusion de la couleur du bleu de méthylène confirme que la dispersion est de type huile dans l'eau. 

Tableau III.16. Résultats des tests physicochimiques du sérum

Type de test	Résultat
Conductivité à 35.6 °C	0.1 μs
pH	4.8
Observation sur microscope 	
Centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes	Emulsion n'est pas stable : il y'a de séparation de phases due à la centrifugation. 
Sens d'émulsion avec la méthode de coloration au bleu de méthylène	La non diffusion de la couleur du bleu de méthylène confirme que la dispersion est de type l'eau dans huile. 

Les résultats de test de viscosité sont présentés dans les graphes des figures III.40 et III.41:

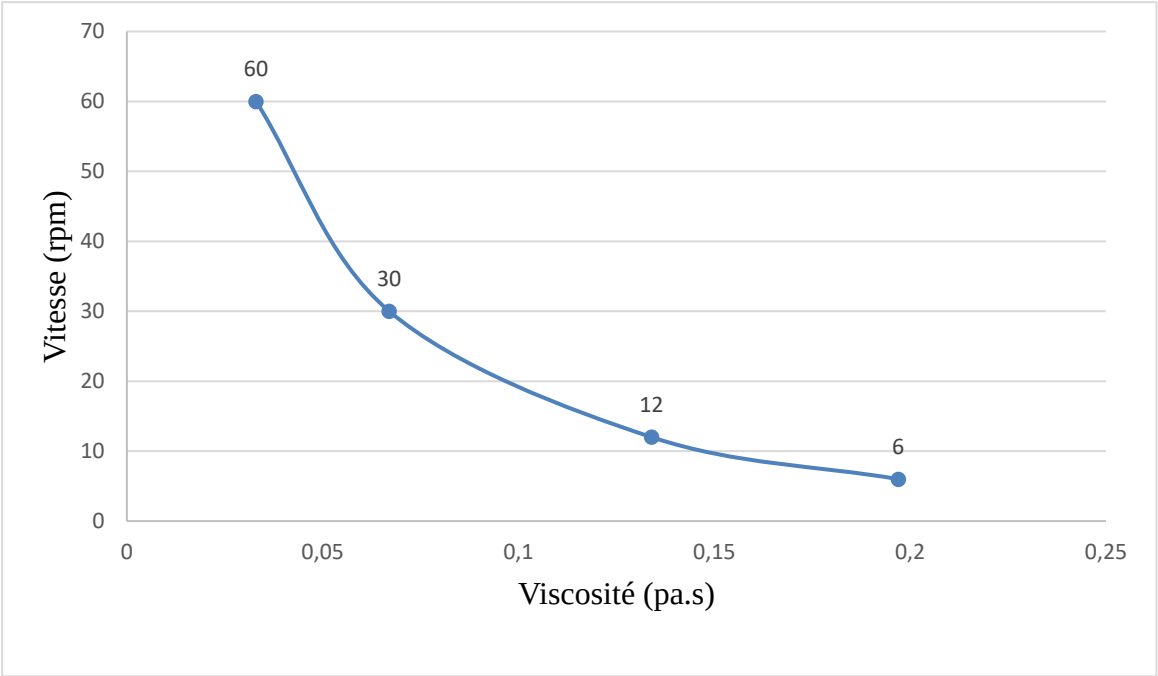


Figure III.40. Test de viscosité sur le shampoing formulée

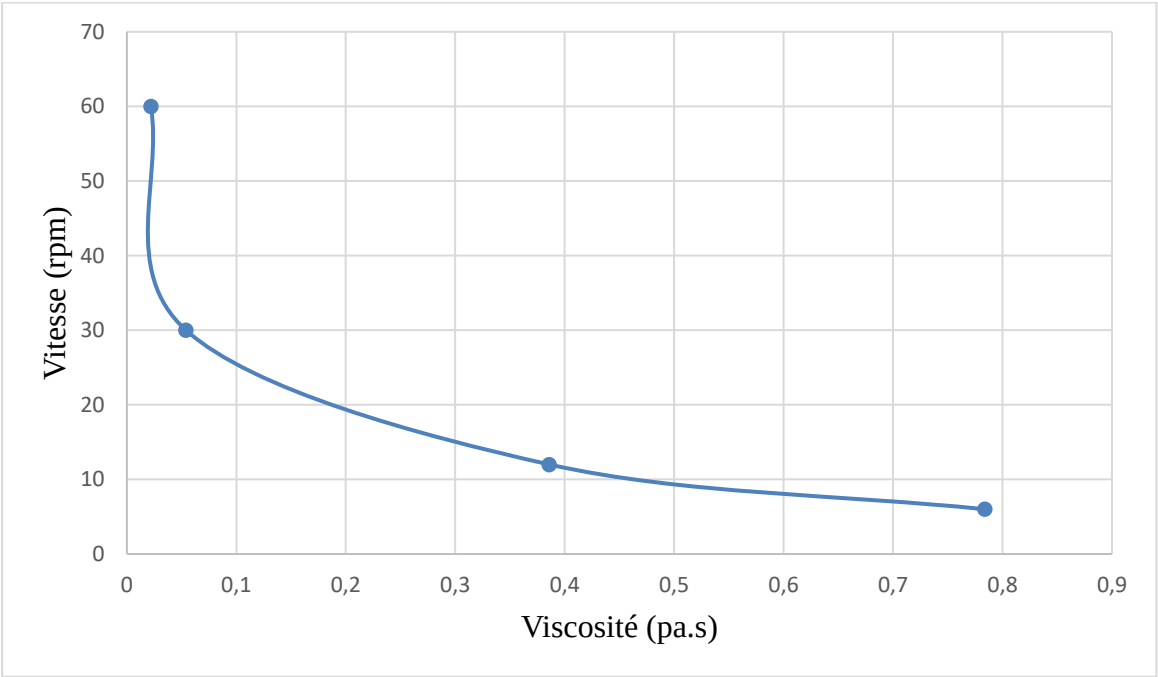


Figure III.41. Test de viscosité sur le sérum formulée

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 shampoing et le sérum.

Conclusion générale

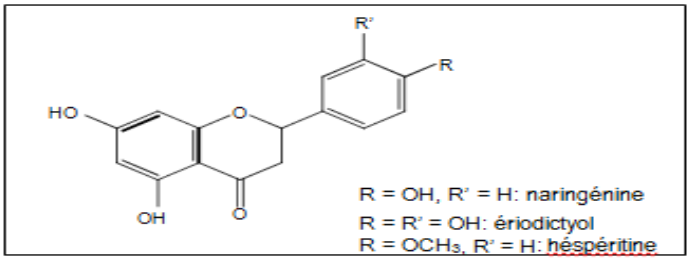
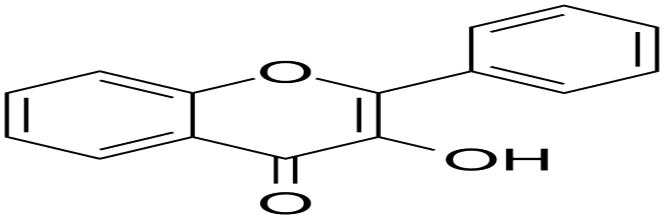
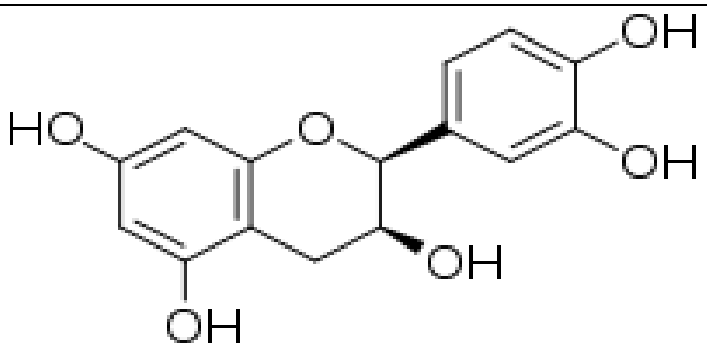
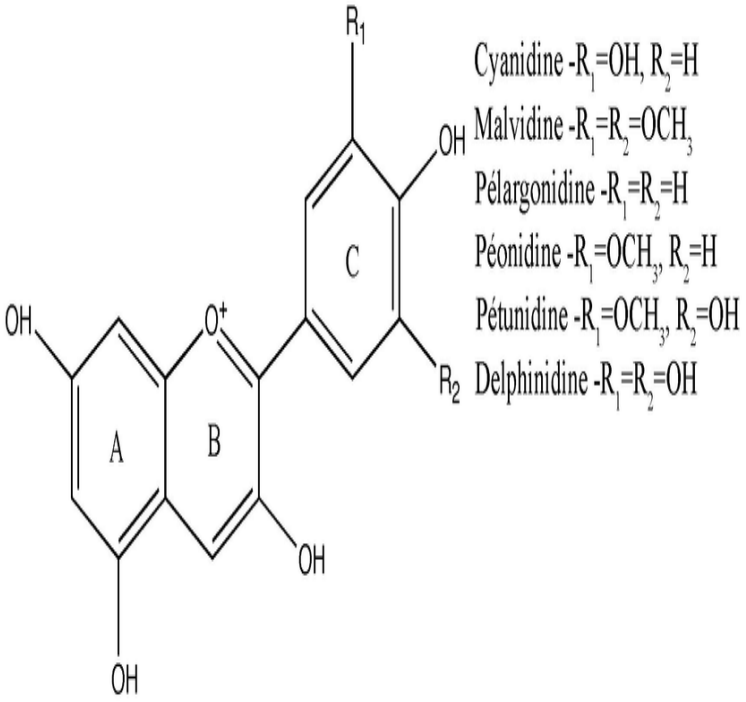
Notre pays dispose d'une biodiversité végétale immense, encore largement inexplorée, et une grande partie de cette flore est composée d'espèces médicinales. Dans le cadre de notre étude actuelle, nous nous sommes concentrés sur l'espèce *Daphné gnidium L.*, membre de la famille des *Thymelaeaceae*, qui est l'une des plus importantes et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels dans la flore algérienne.

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

- L'extraction des substances actives à partir des feuilles de Daphné gnidium, en utilisant une extraction solide-liquide par macération en présence d'eau distillée à 100% et un mélange eau/éthanol (50/50%) à une température de 25°C.
- La caractérisation physique des extraits a montré qu'ils ont une couleur marronne, un pH acide faible (5 ~ 6) et une conductivité électrique élevée dans l'eau (4.5 ms/cm).
- L'analyse qualitative a révélé la présence de polyphénols, de tanins galliques, de glycosides cardiaques et de saponosides. L'analyse quantitative a montré un maximum en teneur en polyphénols totaux de 471.43 mgEA/g et d'une teneur maximale en flavonoïdes 28,57 mg ERU/g a été enregistrée dans l'extrait aqueux (100%).
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits, par la méthode de diffusion sur gélose, a montré que cette activité est fonction de la bactérie cible. *Staphylococcus* Epidermidis est la souche la plus sensible envers tous les extraits à l'exception de l'extrait d'eau 250 (12mm à 12.9 mm). *Bacillus* Subtilis possède une résistance vis-à-vis tous les extraits testés alors que les bactéries *Staphylococcus* Aureus et *Escherichia* Coli ne sont pas sensibles à l'extrait d'eau (100%).
- L'activité anti-inflammatoire a montré que les extraits présentent un effet toxique très faible, avec un taux d'hémolyse qui ne dépasse pas les 8 % à une concentration de 28.57 mg/ml, ce qui les caractérise par l'absence de risque de cytotoxicité.
- La formulation d'un shampoing et un sérum à base des extraits de Daphné garou obtenus par émulsification a permis d'obtenir une émulsion très stable de type H/E pour le shampoing et une émulsion de type E/H plus ou moins stable pour le sérum. Les deux formulations possèdent un comportement rhéofluidifiant ce qui facilite leur étalement lors l'utilisation.

A lumière des résultats obtenus, il sera intéressant de poursuivre cette étude :

- Par l'utilisation d'autres parties de la plante.
- Par l'utilisation d'autres méthodes d'extractions
- Par étude plus approfondie des formulations préparées.

Les classes des Flavonoïdes	La structure chimique
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 (Bruneton 2008) ; (Chira, Suh et al. 2008).	
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 (Crozier 2003)	
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 (Chira, Suh et al. 2008).	
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, 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	

Abderrazak, M. and R. Joël (2007). "La botanique de A à Z." Dunod. Paris **177**.

Amari, N. (2015). Etude Phytochimique, Potentiel Antioxydant et Activité antifongique deThymelaea hirsuta (Cas des dermatophytes), thèse de doctorat, Univ. Mostaganem, Algérie.

Ameni, D., et al. (2015). "Phytochemical profiles, antioxidant capacity and protective effect against AAPH-induced mouse erythrocyte damage by Daphne gnidium L. Shoots extracts." Int J Pharm Pharm Sci **7**: 148-156.

Ashley, N. T., et al. (2012). "Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation." Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **43**: 385-406.

Atefeibu, E. (2002). Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne de Acacia nilotica var adansonii, Thèse de pharmacie Université de Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, 37p.

Athamena, S., et al. (2010). "Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L." Lebanese science journal **11**(1): 69-81.

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Belbah, H., et al. (2016). "Effect of a natural brightener, Daphne gnidium L. on the quality of nickel electroplating from Watts bath." Journal of New Materials for Electrochemical Systems **19**(2): 97-102.

Beloued, A. (2005). Plantes médicinales d'Algérie.

BENAICHA, C. and K. YAHIAOUI (2022). "Analyse physico-chimique du sol d'une plante médicinale: Daphne gnidium L au niveau de la région de Ain Temouchent."

Beniston, W. (1984). Fleurs d'Algérie, édition entreprise nationale de livre, Algérie.

Beverly, C. D. and G. Sudarsanam (2011). "Ethnomedicinal plant knowledge and practice of people of Javadhu hills in Tamilnadu." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **1**(1): 79-81.

Bourgaud, F. (2013). "Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filiere; exemple de l'apport des sciences cognitives à la production/valorisation des métabolites secondaires d'intérêt." Communication in Plantes à parfum, aromatiques et médicinales **5**.

Brodasky, T., et al. (1976). "Bioautographic thin-layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal: 1. Clindamycin in the rat." Journal of chromatography A **123**(1): 33-44.

Bruneton, J. (1999). "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd." Lavoisier, Paris **1120**.

Bruneton, J. (2008). "Acides phénols." Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris: 198-260.

Catier, O. and D. Roux (2007). "Botanique pharmacognosie phytothérapie." Cahiers du préparateur en pharmacie. Groupe Liaisons.

Chaabane, F., et al. (2012). "Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of daphne gnidium leaf extracts." BMC complementary and alternative medicine **12**: 1-10.

Chaabane, F., et al. (2016). "Genoprotective and neuroprotective effects of Daphne gnidium leaf methanol extract, tested on male mice." Drug and Chemical Toxicology **39**(3): 297-302.

Chahrazed, B., et al. (2022). Analyse physico-chimique du sol d'une plante médicinale: Daphne gnidium L au niveau de la région de Ain Temouchent.

Chang, C.-P., et al. (2007). "The flavonoid baicalin protects against cerebrovascular dysfunction and brain inflammation in experimental heatstroke." Neuropharmacology **52**(3): 1024-1033.

Chaouki, W., et al. (2009). "Roots of Daphne gnidium L. inhibit cell proliferation and induce apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7." Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences **64**(8): 542-546.

Chen, J. Y. and W. H. Huestis (1997). "Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1323**(2): 299-309.

Chippada, S. C., et al. (2011). "In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of Centella asiatica by HRBC membrane stabilisation." Rasayan J Chem **4**(2): 457-460.

Chira, K., et al. (2008). "Les polyphénols du raisin." Phytothérapie **6**(2): 75-82.

Collin, S. and J. Crouzet (2011). Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire, Lavoisier.

Cottiglia, F., et al. (2005). "Topical anti-inflammatory activity of flavonoids and a new xanthone from Santolina insularis." Zeitschrift für Naturforschung C **60**(1-2): 63-66.

Crozier, A. (2003). "Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview." Plants: diet and health. The report of a British Nutrition Foundation Task Force: 27-48.

Deiana, M., et al. (2003). "Chemical composition and antioxidant activity of extracts from Daphne gnidium L." Journal of the American Oil Chemists' Society **80**(1): 65-70.

Djidda, A. and L. Nait Chalal (2020). Extraction de biomolécules actives à partir d'une plante médicinale: Carthamuscaeruleus L, Université Mouloud Mammeri.

Djouahra-Fahem, D., et al. (2019). "A comprehensive study on crude methanolic extract of Daphne gnidium L. as effective corrosion inhibitors of mild steel induced by SRB consortium." Journal of Bio- and Tribo-Corrosion **5**: 1-14.

Dor, M. (2017). Création d'une formation continue vétérinaire en phytothérapie.

EL FENNOUNI, M. (2012). "Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'avortement au Maroc."

Essouaadi, N., et al. (2015). "Evaluation in vitro de l'effet antifongique de l'extrait aqueux de Daphne gnidium sur Rhynchosporium secalis, agent de la rhynchosporiose de l'orge." Revue Marocaine de Protection des Plantes(8).

Ferrari, J. (2002). Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles:" Gnidia involucrata" Steud. ex A. Rich, Université de Lausanne, Faculté des sciences.

Fricker-Hidalgo, H., et al. (2013). "Toxoplasma seroconversion with negative or transient immunoglobulin M in pregnant women: myth or reality? A French multicenter retrospective study." Journal of clinical microbiology **51**(7): 2103-2111.

Genesh, G., et al. (2013). "Antioxidant and anti-inflammatory activities of the methanolic leaf extract of traditionally used medicinal plants Mimusops elengi L." Pharm Sci Res **5**: 125-130.

Ghedira, K. (2005). "Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique." Phytothérapie **3**(4): 162-169.

Ghichi, N., et al. (2003). Contribution à l'etude de l'effet de l'extrait brut de la Plante Daphne gnidium. l Sur Les Rates Gestantes, Université de jijel.

Ghomari, F. and A. Bendi-ouis (2008). "Science des matériaux de construction." faculté des sciences de l'ingénieur, Travaux pratique département de génie civil.

Govindappa, M., et al. (2011). "Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of Wedelia trilobata (L.) Hitchc." Journal of medicinal plants research **5**(24): 5718-5729.

Hagerman, A. E. and L. G. Butler (1978). "Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins." Journal of agricultural and food chemistry **26**(4): 809-812.

Häkkinen, S. H., et al. (1999). "Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries." Journal of agricultural and food chemistry **47**(6): 2274-2279.

Harizi, H., et al. (2011). "Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from Daphne gnidium." Cellular immunology **267**(2): 94-101.

Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." Pharmacology & therapeutics **96**(2-3): 67-202.

Hennebelle, T., et al. (2004). "Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif." Phytothérapie **2**: 3-6.

Hertog, M. G., et al. (1992). "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands." Journal of agricultural and food chemistry **40**(12): 2379-2383.

Hertog, M. G., et al. (1993). "Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices." Journal of agricultural and food chemistry **41**(8): 1242-1246.

Hosseinzadeh, S., et al. (2015). "The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of Thymus vulgaris." International Journal of Clinical Medicine **6**(9): 635-642.

Huang, M.-H., et al. (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, P. (2002). Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxyloides Lam.(Rutaceae), Thèse Pharmacie, Universite de Bamako, Faculte de Medecine et d'Ondonto ….

Jain, P. K. and H. Joshi (2012). "Coumarin: chemical and pharmacological profile." Journal of Applied Pharmaceutical Science(Issue): 236-240.

Kansole, M. M. R. (2009). "Etude ethnobotanique, phytocuimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de Leucas martinicansis (Jacquin) R." Brown, Hoslundiaopposstavahlet Orthosiphonpallidusroyle ex benth.

Khouchlaa, A., et al. (2021). "Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of Daphne gnidium: A review." Journal of Ethnopharmacology **275**: 114124.

Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.

Krief, S., et al. (2003). "Résultats des examens parasitologiques de selles pratiqués sur une population de chimpanzés sauvages (Pan troglodytes schweinfurthii) d'Ouganda." Bulletin de la Société de pathologie exotique **96**(2): 80-82.

Ladhari, A., et al. (2011). "Phytotoxicity of Daphne gnidium L. occurring in Tunisia." World Academy of Science, Engineering and Technology **59**: 1534-1537.

Ladhari, R., et al. (2011). "Bank service quality: comparing Canadian and Tunisian customer perceptions." International Journal of Bank Marketing **29**(3): 224-246.

LAHAG Lemya, D. W. (2019). "Etude phytochimique du Daphne gnidium L. et son effet sur l'électrodéposition du nickel."

Lahmar, S., et al. (2008). Etude de la toxicité de deux plantes spontanées de la région de Jijel Arum italicum et Daphné gnidium, Université de Jijel.

Lahsissene, H., et al. (2009). "Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental)." Lejeunia, revue de botanique.

Li GuoXiang, L. G. and L. Z. Liu ZaiQun (2008). "The protective effects of ginsenosides on human erythrocytes against hemin-induced hemolysis."

Lopes-Lutz, D., et al. (2008). "Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils." Phytochemistry **69**(8): 1732-1738.

Maataoui, B., et al. (2006). "Activites antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie [Opuntia ficus indica]." Lebanese science journal **7**(1): 3-8.

Macheix, J., et al. (2006). "Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles." Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris: 390-399.

Madjida, M. (2022). Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques extraits d'une plante médicinale (Aloysia citrodora L.), university center of abdalhafid boussouf-MILA.

Maistrello, L., et al. (2005). "Growth inhibitory activity of Daphne gnidium L.(Thymelaeaceae) extracts on the elm leaf beetle (Col., Chrysomelidae)." Journal of applied entomology **129**(8): 418-424.

Manach, C., et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." The American journal of clinical nutrition **79**(5): 727-747.

Marco, G. J. (1968). "A rapid method for evaluation of antioxidants." Journal of the American Oil Chemists' Society **45**(9): 594-598.

Mauro, C., et al. (2006). "ABIN-1 binds to NEMO/IKKγ and co-operates with A20 in inhibiting NF-κB." Journal of Biological Chemistry **281**(27): 18482-18488.

Mazari, K., et al. (2010). "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens L." J Med Plants Res **4**(10): 959-964.

Mekhelfi, T. and L. Zaiter (2016). "Séparation et Détermination Structurale de Métabolites Secondaires de deux Plantes Algériennes-Activités Biologiques."

Menat, É. (2006). "Les polyphénols de thé, du vin et du cacao." Phytothérapie **1**(4): hs40-hs45.

Miara, M., et al. (2013). "Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie)." Phytothérapie **11**(4): 206-218.

MIMOUNI, M. (2021). "Contribution à une enquête ethnobotanique des plantes médicinales dans la wilaya de Mostaganem."

Mohammedi, Z. (2013). "Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie." Thčse de doctorat (Tlemcen: Université de Tlemcen).

MOHAMMEDI, Z. and F. ATIK (2012). "Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de Lavandula stoechas L." Revue «Nature & Technologie». n **6**: 34-39.

Mohammedi, Z. and F. Atik (2013). "Fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spore germination and aflatoxin B1 production of Aspergillus flavus." Australian Journal of Crop Science **7**(3): 293-298.

Molyneux, P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." Songklanakarin J. sci. technol **26**(2): 211-219.

Mustapha Mahmoud, D., et al. (2016). "Effect of time and traditional extraction on antioxidant activity of three Lavandulaspecies." Global Journal ofMedicinal Plant Research **4**(3): 6-8.

Mutai, C., et al. (2009). "Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupane triterpenes." Journal of Ethnopharmacology **123**(1): 143-148.

Naczk, M. and F. Shahidi (2004). "Extraction and analysis of phenolics in food." Journal of chromatography A **1054**(1-2): 95-111.

Naczk, M. and F. Shahidi (2006). "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis **41**(5): 1523-1542.

Perez Izquierdo, M. and R. Ocete (1994). "Antifeedant activity of extracts of Daphne gnidium L. and Anagyris foetida against Spodoptera littoralis (Boisd.)(Lepidoptera: Noctuidae)."

Pietta, P.-G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." Journal of natural products **63**(7): 1035-1042.

Pourmorad, F., et al. (2006). "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants." African journal of biotechnology **5**(11).

Rajeshwar, Y. and R. Lalitha (2013). "Preliminary phytochemical screening and in vitro anthelmintic effects of Acmella paniculata plant extracts." Biolife **1**(3): 106-112.

Ramdani, M., et al. (2015). "Phytochemistry, antibacterial activity and chromosome number of two species of Daphne from Algeria." Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem **4**: 7-17.

Reddy, M. K., et al. (2007). "Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from Punica granatum L." Planta Medica **53**(05): 461-467.

Regnault-Roger, C. (2008). "Recherche de nouveaux biopesticides d'origine végétale à caractère insecticide: démarche méthodologique et application aux plantes aromatiques méditerranéennes." Biopesticides d'origine végétale: 25-49.

Reichl, F.-X., et al. (2010). Guide pratique de Toxicologie, De Boeck.

Richter, G. (1993). "Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie."

Romaní, A. M., et al. (2006). "Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities." Ecology **87**(10): 2559-2569.

Saija, A., et al. (1998). "In vitro antioxidant activity and in vivo photoprotective effect of a red orange extract." International Journal of Cosmetic Science **20**(6): 331-342.

Sakat, S., et al. (2010). "Gastroprotective effect of methanol extract of Oxalis corniculata Linn (whole plant) experimental animals." Planta Medica **76**(12): P090.

Samah, B. C. "Étude de l'inhibition de la corrosion de l'acier en milieu acide parl'extrait des plantes."

Silva, D. l., et al. (2004). "Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin." Toxicology Letters **147**(1): 53-61.

Singleton, V. L., et al. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology, Elsevier. **299:** 152-178.

Škerget, M., et al. (2005). "Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities." Food chemistry **89**(2): 191-198.

Sofowora, A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, KARTHALA Editions.

Souad, S. and R. Rania (2020). Etude bibliographique De la composition phytochimiques et activités biologiques des feuilles de Morus nigra.

Tepe, B., et al. (2006). "Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey." Food chemistry **95**(2): 200-204.

Vadivu, R. and K. Lakshmi (2008). "In vitro and in vivo anti-inflammatory activity of leaves of Symplocos cochinchinensis (Lour) Moore ssp Laurina." ||| Bangladesh Journal of Pharmacology **3**(2): 121-124.

Vidal, V., et al. (2012). "Library-based discovery and characterization of daphnane diterpenes as potent and selective HIV inhibitors in Daphne gnidium." Journal of natural products **75**(3): 414-419.

Vivas, N., et al. (2001). "Les phénomènes colloïdaux et l'intérêt des lies dans l'élevage des vins rouges une nouvelle approche technologique et méthodologique. 2. partie: Méthodes destinées aux élevages en cuves de grande capacité." Revue Française d'Oenologie (France)(190).

Yam, M. F., et al. (2009). "Anti-inflammatory and analgesic effects of Elephantopus tomentosus ethanolic extract." Journal of acupuncture and meridian studies **2**(4): 280-287.

Zohra, M. and A. Fawzia (2014). "Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria." Int J Pharm Sci Res **5**(8): 495-500.

SITES DE REFERENCES

- https://fr.wikipedia.org/wiki/Ph%C3%A9nol_%28groupe%29
- 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
- https://www.quelle-est-cette-fleur.com/Fiches-botaniques/Fiche-espece-daphne-gnidium.php
- https://www.preservons-la-nature.fr/flore/taxon/2185.ht
- https://incisecret.it/coumarin/