



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN



MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

Par :

M^{elle} Kazi Tani Djazia

Sur le thème

Contribution à l'étude chimique et activités antioxydantes de *Daphne gnidium* L. de la région de Tlemcen

Soutenu publiquement le 26 juin 2018 à Tlemcen devant le jury composé de :

ALLALI Houcine	Professeur	Université de Tlemcen	Président
BENYAROU Meriem	Professeur	Université de Tlemcen	Examinatrice
SELLES Chaouki	Professeur	Université de Tlemcen	Encadreur

Laboratoire LASNABIO
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie

REMERCIEMENTS

Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage, la patience et la foi, la santé, la volonté qu'il nous a donnés pour mener à bien ce travail.

Ce mémoire a été réalisé sous la direction du **Pr. Chaouki SELLES** qui n'a jamais hésité à faire le point sur l'avancement de mes travaux. En plus de ses qualités scientifiques, j'ai découvert une personne profondément humaine qui se bat pour ses idées sans jamais renoncer. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir encadrée et veillé au bon déroulement de ce travail. Merci d'avoir toujours été disponible et pour m'avoir guidée par vos conseils et orientations. Merci infiniment pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

Le présent travail a été effectué dans le Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (**LASNABIO**). Pour cela, je tiens à remercier son directeur **Pr. Saïd GHALEM** ainsi que le chef de l'équipe des huiles essentielles le **Pr. Boufeldja TABTI** pour toute l'aide et les conseils qu'ils m'ont apportés.

J'exprime ma profonde reconnaissance au responsable du Master CPN le **Pr. Mohamed el Amine DIB** de m'avoir accueillie dans ce Master. Si ce travail est présentable aujourd'hui, c'est grâce à ses efforts, à son aide et sa disponibilité, ses conseils et surtout son orientation durant mes études en Master.

Que Mesdames et Messieurs les membres du jury trouvent ici l'expression de mon profond respect et de mes remerciements les plus sincères pour l'intérêt qu'ils portent pour juger ce modeste travail, en l'occurrence :**Pr. BENYAROU Meriem, Pr. Houcine ALLALI**

J'adresse également mes sincères remerciements à tous les membres du Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (CPN).

Un très grand merci à **M^{me} MERAD Nouria** pour ses conseils si précieux.

Mes vifs remerciements vont à **Asma Hadj Allal** et **Nassima Benmansour** pour leurs orientations ainsi qu'à **Imen TERBECHE** Ingénieur de laboratoire pour son aide technique si précieuse.

Mes remerciements vont également à tous les enseignants du département de chimie, qui ont contribué à ma formation.

Un grand merci à tous mes ami(es) de la promotion du Master de chimie des Produits Naturels, tout simplement pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble.

Dédicaces

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

Aux êtres les plus chers : Mes parents,

Que dieu les garde,

En témoignage de ma profonde affection.

De m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mon parcours

De m'avoir laissé libre dans mes choix

D'avoir prié pour moi

À mon cher frère et mes chères sœurs : Amine, Yasmina et Kawther

À mes très chers grands-parents (Rebi ykhelikoum lina)

À ma très chère cousine, copine, amie..Sarah

À toute ma famille du petit au grand : Kazi Tani et Hamdani

À mes enseignant(e)s et professeur(e)s du primaire à l'université

À tous ceux qui aiment la chimie

Liste des Figures	Pages
Figure 1. Structure de Tigliane.....	5
Figure 2. Structure de Daphnane.....	5
Figure 3. Structure de coumarines Daphnéline et Daphnine.....	5
Figure 4. Structure de Yuankanin.....	6
Figure 5. Structure de l'hydroquinone.....	7
Figure 6. Structure d'acide parahydroxybenzoïque.....	7
Figure 7. Structure générale des flavonoïdes.....	8
Figure 8. Structure de la chlorophylle A (vert-bleu).....	10
Figure 9. Structure de la chlorophylle B (vert-jaune).....	10
Figure 10. Structure de Phéophytine :(vert-olive).....	11
Figure 11. Structure de la β -Carotène (jaune-orange).....	11
Figure 12. Structure de l' α -Carotène (orange).....	11
Figure 13. Structure de Lutéine (jaune).....	11
Figure 14. Structure de Viola xanthine (jaune).....	11
Figure 15. Structure de Néo xanthine (jaune).....	11
Figure 16. Réaction du test DPPH.....	12
Figure 17. Schéma de la réaction de test FRAP.....	12
Figure 18. Courbes d'activité antioxydante (HE, HY et AA).....	29
Figure 19. Courbes d'activité antioxydante des extraits (aqueux, méthanolique).....	30
Figure 20. Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP.....	30

Liste des tableaux	Pages
Tableau 1: Masse et rendement des extraits de <i>Daphne gnidium</i> L.....	23
Tableau 2: Criblage phytochimique de la partie aérienne de <i>Daphne gnidium</i> L.....	23
Tableau 3: Dosages des composés phénoliques	24
Tableau 4: Composition chimique de <i>Daphne gnidium</i> L.....	25
Tableau 5: Rendement des acides gras et les insaponifiable	26
Tableau 6: Valeurs des R _f des composés.	28
Tableau 7: Polarité et identité des composés.....	28
Tableau 8 : IC ₅₀ de l'huile essentielle, l'extrait d'hydrolat et de l'acide ascorbique (DPPH)....	29
Tableau 9 : IC ₅₀ des extraits aqueux, méthanolique et de l'acide ascorbique (DPPH).....	30
Tableau 10 : IC ₅₀ des extraits et de l'acide ascorbique (FRAP).....	31

Liste des abréviations :

D : *Daphne*

HE : Huile Essentielle

HY : Hydrolat

% : Pourcentage

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

IC₅₀ : Concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres

CPG /SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

SM : Spectrométrie de masse

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

R_f : Rapport frontal

Liste des photos	Pages
Photo1. <i>D.gnidium</i> L. prise par Pep Ferrer.....	4
Photo 2.Feuille, Fruit (baie), Fleur de <i>D.gnidium</i> L.....	4
Photo 3.Matériel végétal.....	14
Photo 4.Montage de soxhlet.....	14
Photo 5.Évaporateur Rotatif.....	14
Photo 6.Boîte de pétri.....	15
Photo 7.Dessicateur.....	15
Photo 8.Centrifugeuse.....	15
Photo 9.Montage de l'hydrodistillation.....	18
Photo10.Obtention de l'hydrolat.....	19
Photo11.Huile essentielle de <i>D gnidium</i> L.....	24
Photo12.Obtention de la chlorophylle.....	27
Photo13.CCM de la chlorophylle Ether de pétrole/Acétone/Cyclohexane : 85/10/5%.....	27
Photo14.CCM de la chlorophylle Ether de pétrole/Ethanol : 90/10%	27
Photo15.CCM de la chlorophylle Ether diéthylique/Ether de Pétrole : 60/40%.....	27
Photo16. CCM de la chlorophylle Ether diéthylique/Cyclohexane: 70/30%.....	27
Photo17.Composés identifiés par CCM.....	28

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Abréviations	
Liste des photos	
Introduction générale	

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Etude botanique

I. Présentation de la plante <i>Daphne gnidium</i> L.....	3
I.1.Présentation de la famille des Thymelaeaceae.....	3
II. Généralités sur <i>Daphne gnidium</i> L.....	3
II.1.Présentation de l'espèce <i>Daphne gnidium</i> L.....	3
II.2.Classification systématique.....	3
II.3.Présentation et description botanique.....	3
II.4.Utilisations.....	4
II.5.Travaux antérieurs sur <i>Daphne gnidium</i> L.....	4
III. Métabolites chimiques.....	7
III.1.Dosage des composés phénoliques	7
III.2.Généralités sur les huiles essentielles.....	8
III.3.Hydrolat.....	9
III.4.Principales méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	9
III.5.Acide gras.....	10
III.6.Insaponifiable.....	10
III.7.Chlorophylle.....	10
III.8.Activité antioxydante.....	11

Chapitre II : Méthodes d'analyses

I. Chromatographie Phase Gazeuse CPG	13
II. Chromatographie sur couche mince	13

Partie II : Étude Expérimentale
Chapitre III: Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	14
I.1. Origine géographique et période de récolte de la plante.....	14
I.2. Identification botanique.....	14
I.3. Préparation du matériel végétal	14
II. Étude phytochimique.....	14
III. Dosage phytochimique des extraits.....	17
IV. Huiles essentielles	18
IV.4. Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat	19
1. Extraction des insaponifiables.....	20
2. Extraction des acides gras.....	20
IV.6. Obtention de la chlorophylle	20
IV.7. Étude du pouvoir antioxydant.....	22
IV.7.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	22
IV.7.2. Méthode de la réduction du fer (FRAP).....	22

Chapitre IV : Résultats et discussion

I. Obtention des extraits.....	23
II. Criblage phytochimique.....	23
III. Dosage phytochimique des extraits	24
IV. Extraction des huiles essentielles.....	24
V. Obtention de l'extrait d'hydrolat.....	26
VI. Extraction des acides gras et des insaponifiables.....	26
VII. Analyse de la chlorophylle par chromatographie sur couche mince.....	27
VIII. Résultats de l'activité antioxydante des extraits.....	28

Conclusion Générale

Références bibliographiques

Annexe

INTRODUCTION GENETALE

Introduction générale

Connu pour sa biodiversité, l'Algérie dispose d'une flore particulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% d'endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique constitué de plantes médicinales et condimentaires et même parfois toxiques, est peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique. A cet effet, il constitue à notre avis, une source non négligeable de recherche de substances naturelles [1].

La médication par les plantes appelée phytothérapie, était d'usage courant dans les plus anciennes civilisations qui s'intéressaient aux vertus curatives de certains végétaux. On peut dire qu'il s'agit d'une des premières manifestations de l'effort immémorial de l'homme pour comprendre et utiliser la nature [2].

Les substances naturelles dont les plantes constituent la source principale, représentant près de 60% des médicaments dont nous disposons. Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nés de la modification chimique de molécules ou de parties de molécules naturelles prises comme 'têtes de séries'. Depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolites secondaires [3].

Les substances naturelles d'origine végétale sont très recherchées en raison de leurs activités biologiques nombreuses : antivirales, antibactériennes, antifongiques, insecticides, antipaludiques, antioxydantes et anticancéreuses. De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part à cause des effets secondaires induits par les médicaments qui inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme [4].

Aujourd'hui, l'importance pharmacologique des métabolites végétaux augmente en raison des découvertes continues sur leur rôle et leur potentiel dans les soins de santé, de l'apparition de résistance à certaines classes d'agents anti-infectieux et du problème de sous-développement d'une grande partie de la population mondiale. L'utilisation historique des plantes en raison de leurs propriétés thérapeutiques avec les avancées techniques et scientifiques, ont mené à l'isolation de principes actifs.

Les plantes produisent naturellement des substances actives parmi lesquelles les huiles essentielles. De nos jours, l'utilisation des huiles essentielles est de plus en plus répandue que ce soit dans les pharmacies, ou dans divers commerces. Il existe à l'heure actuelle un intérêt croissant du

public pour les produits à base de plantes et un retour aux médecines naturelles. Les articles concernant le bien-être et la santé par les plantes et les huiles essentielles fleurissent. L'aromathérapie ou l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques est en expansion. Elle permet aussi l'harmonisation de la santé physique et mentale [5].

Les huiles essentielles sont principalement utilisées en raison de leurs propriétés médicinales, et de leurs propriétés odorantes d'une autre part, Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums, dans les compositions parfumantes ;des détergents et des produits de parfumerie fonctionnelle mais aussi dans le domaine alimentaire [6].

Le présent travail rentre dans le cadre général de la valorisation des plantes de l'ouest algérien pour la recherche de molécules bioactives nouvelles. La plante sur laquelle nous nous sommes penchés appartient à la famille des Thymelaeaceae; il s'agit de *Daphne gnidium* L.

Le choix de cette plante malgré sa toxicité, est basé sur le fait qu'elle soit mal connue par la population locale et peu étudiée où aucun travail sur la composition chimique de l'huile essentielle et de son hydrolat n'a été fait jusqu'à ce jour.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposé d'étudier ce qui suit :

- ❖ Un criblage phytochimique qualitatif afin de mettre en évidence les différents groupes chimiques présents dans l'espèce.
- ❖ Un dosage quantitatif des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins.
- ❖ L'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de la partie aérienne et l'obtention de l'extrait d'hydrolat par extraction liquide-liquide.
- ❖ Extraction des acides gras et des insaponifiables.
- ❖ Obtention de la chlorophylle et son analyse par chromatographie sur couche mince.
- ❖ Etude de la composition chimique de l'huile essentielle de *D.gnidium*L.
- ❖ Evaluation des activités antioxydantes de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat ainsi que des extraits aqueux et méthanolique par deux méthodes : DPPH et FRAP

Ce travail se subdivise en trois parties ;

La première partie est consacrée à une étude bibliographique,

Dans la deuxième partie, nous exposerons notre travail au laboratoire et les différents modes opératoires,

Dans le troisième chapitre, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale résumera l'essentiel du travail réalisé.

Partie I: Synthèse bibliographique

Chapitre I: Etude botanique

I. Présentation de la plante *Daphne gnidium* L. :

I.1. Présentation de la famille des Thymelaeaceae :

Les Thymelaeaceae sont une petite famille de dicotylédones, composée de 1200 espèces réparties en 67 genres. Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tempérées de la planète particulièrement en Afrique et les zones tropicales, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids [7].

II. Généralités sur *Daphne gnidium* L.:

II.1. Présentation de l'espèce *Daphne gnidium* L. :

- Autre noms communs : Garou, Daphné paniculé, Garouette, Saint bois, Thymélée de Montpellier, Thymélée à feuilles de lin, Lin bâtard, Lin sauvage, Bois d'oreilles, Bois de garou, Coquenaudier, Camélée noire, Trintanelle [8].
- Non scientifique : *Daphne gnidium* L.
- Non vernaculaire :
 - Arabe: Lazzaz لازاز
 - Anglais: Daphné garou.
 - Français: Thymèleou saint bois.

II.2. Classification systématique [9] :

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotes
Sous-classe	Rosidees (Eurosidiées)
Ordre	Malvales
Famille	Thymeleacées
Tribu	Daphneae
Genre	Daphne
Espèce	<i>Daphne gnidium</i> L. (1753)

II.3. Présentation et description botanique :

C'est un arbuste des sables atlantiques et des garrigues méditerranéennes et existe dans tout le Tell de l'Algérie. Elle est présente dans les forêts, et les broussailles, de 60 cm à 2 m de haut ou plus, à rameaux minces très feuillés [10]. Des feuilles persistantes ou caduques, lancéolées-linéaires, larges de 5 à 7mm au plus, cupsidées, très denses. Les fleurs sont blanches caduques. Le fruit est une baie nue ovoïde de 5 à 8 mm, d'abord verte, redevenant rouge vive puis oranger à épicarpe brillant en murissant avec une seule graine (monosperme). La Graine est ovoïde à un seul embryon et à albumen triploïde.

La floraison est longue et s'étale de mars à octobre et c'est pour cette raison que fleurs et fruits coexistent. Il s'agit d'une plante entomogame [11].



Photo1. *D. gnidium* L. prise par Pep Ferrer;



Photo 2. Feuille, Fruit (baie), Fleur de *D. gnidium* L.

II.4. Utilisations :

Cette espèce est utilisée pour diminuer les inflammations et les douleurs abdominales. Cependant, elle a la particularité d'irriter gravement la peau (rougeurs, irritations, ampoules...). Les femmes l'utilisaient autrefois pour teindre leurs cheveux en noir. En effet, au Maroc, les feuilles séchées et pulvérisées en mélange avec le henné sont préparées pour traiter les cheveux. La plante est aussi indiquée pour le lissage des cheveux et contre les pellicules. L'huile de semences du *Daphne gnidium* L. est purgative [11].

L'écorce des plantes du genre *Daphne* et plus particulièrement du *Daphne gnidium* était utilisée sous forme de pommade aux propriétés épispastiques. La poudre d'écorce est aussi utilisée par voie orale dans le traitement de la syphilis et des maladies vénériennes. Par ailleurs, elle était utilisée pour la fabrication du papier de la plus haute qualité, des taffetas...

En Phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides, la sclérose en plaque, le sida ainsi contre la gale, les affections dartreuses pour le traitement de la syphilis enfin pour tous les soins des affections de la peau, et contre les maux de dents (gargarisme).

Dans la pharmacopée traditionnelle, *D. gnidium* L. était utilisé pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique et abortive. Le Garou possède des effets : cytotoxique, antioxydant et antimicrobien [12].

II.5. Travaux antérieurs sur *Daphne gnidium* L. :

Afin d'augmenter les chances d'isoler de nouveaux produits naturels issus des plantes, nous nous sommes intéressés à une espèce qui a été moyennement étudiée jusque-là ; il s'agit de *Daphne gnidium* L. Cependant, l'investigation de cette plante sous un autre angle : organe ou extrait différent, nouvelle technique analytique, activité biologique différente, etc. nécessite une recherche de littérature approfondie.

D. gnidium L. appartient aux Thymelaeaceae ; une famille relativement méconnue (difficultés dans la classification botanique) possédant par contre des utilisations traditionnelles très nombreuses en dépit de la toxicité de certaines espèces.

Chapitre I: Etude botanique

Par rapport aux travaux et aux publications consacrés aux Asteraceae et aux Fabaceae par exemple, la famille des Thymelaeaceae reste très peu étudiée.

Dans ce qui suit, nous allons donner un aperçu sur les métabolites secondaires produits par les Thymelaeaceae en général et par *D. gnidium* L. en particulier, ainsi que leurs activités biologiques.

Une attention particulière est mise sur la classe de composés la plus caractéristique des Thymelaeaceae : les diterpènes. En effet, ils sont responsables de la toxicité de ces plantes qui restent quand même utilisées en médecine traditionnelle. Bien que ces diterpènes soient d'une grande variabilité structurale, ils dérivent tous des squelettes de base tigliane et daphnane [13].

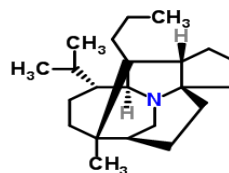
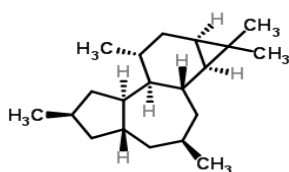
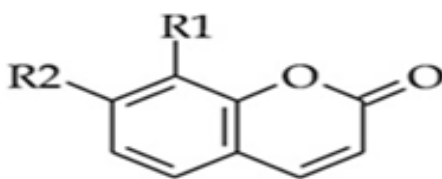


Figure 1. Structure de Tigliane Figure 2. Structure de Daphnane

Par ailleurs, les Thymelaeaceae contiennent une autre classe intéressante de métabolites secondaires : les coumarines. Isolées initialement des différentes espèces de *Daphne*, nous y trouvons la daphnétine et ses dérivés comme la daphnine.



Coumarines :

Daphnétine $R_1=R_2=OH$

Daphnine $R_1=OH; R_2=O-glu$

Figure 3. Structure de coumarines Daphnétine et Daphnine

D'autre part, quoi que les coumarines soient largement répandues dans les plantes, une petite quantité de bicoumarines ont été répertoriées à ce jour, chez les Thymelaeaceae où la première bicoumarine isolée de cette famille était la daphnorétine [14].

Une autre caractéristique des Thymelaeaceae est la diversité de leur métabolisme flavonoïdique. Nous y rencontrons des flavones, des flavonols, des flavanones, des C-glycosyl flavones, ainsi que des biflavonoïdes [15].

La littérature rapporte que diverses espèces de *Daphne* contiennent plusieurs types de métabolites secondaires tels que les coumarines, les flavonoïdes, les lignanes, les diterpènes et les triterpénoïdes. En parallèle, de nombreuses activités biologiques ont également été documentées : les activités anti-inflammatoires, antioxydantes, cytotoxiques, anti tumorales et antimicrobiennes.

En effet, l'investigation phytochimique des tiges de *D. gnidium* a permis d'isoler quatre coumarines (daphnétine, daphnine, acétylumbelliférone et daphnorétine) et sept flavonoïdes (lutéoline, orientine, isoorientine, apigénine-7-O-glucoside, genkwanine, 5-O-β-D-primeverosylgenkwanine et 2,5,7,4 -tétrahydroxyisoflavanol) dont les structures ont été déterminées par comparaison de leurs

propriétés physiques (UV, IR, SM, RMN¹H et ¹³C); des composés reconnus pour leurs effets antimicrobiens [16].

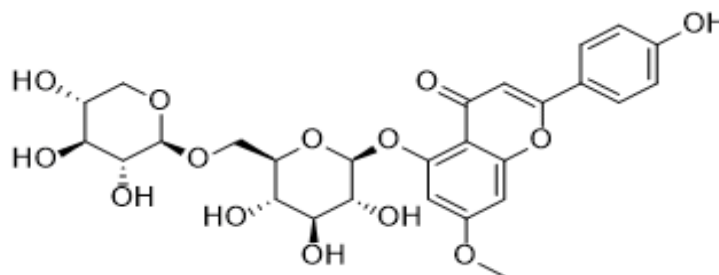


Figure 4. Structure de Yuankanin

Par ailleurs, un screening phytochimique de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *D. gnidium* a été réalisé afin de mettre en évidence les tannins, les flavonoïdes et les coumarines où une quantification des contenus en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins a été effectuée en utilisant respectivement les réactifs spécifiques Folin-Ciocalteu, AlCl₃ et Folin-Denis [17].

Les Thymelaeaceae en général, ne constituent pas une famille de plantes à huiles essentielles, mais de nombreux genres comme la *Daphne* produisent des fleurs odorantes qui pourraient être riches en résine et en huile essentielle. Cependant, aucun travail sur l'huile essentielle ni sur l'hydrolat de *D. gnidium* n'a été rapporté jusqu'à ce jour.

Quant aux autres travaux répertoriés sur *D. gnidium*, de nombreux criblages à large échelle ont été réalisés, à la recherche d'activités biologiques des plus diverses. En effet, beaucoup d'extraits bruts ont été soumis aux tests biologiques et biochimiques, afin d'évaluer leur potentiel bioactif.

Les groupes phytochimiques précédemment cités sont constitués de composés antimicrobiens dont leur présence dans les extraits végétaux ne pourrait donc que justifier l'activité observée. En effet, dans les années 1996 et 1997, Lauk et al. ont évalué l'extrait méthanolique des feuilles et de l'écorce de *D. gnidium* pour ses activités antibactérienne et antimycotique [18,19]. Une année après, il a été prouvé que l'extrait d'écorce de cette plante provoque des lésions cutanées photochimiques [20].

Cependant, certains composés comme la daphnorétine et l'apigénine se trouvant dans les feuilles ont montré une activité anti tumorale intéressante [21], une investigation sur la même activité a été poursuivie en 2014 où Chaabane et al. [22] ont étudié la capacité inhibitrice des extraits de chloroforme, de méthanol et de butanol de *D. gnidium* sur la prolifération de deux types de cellules cancéreuses de la peau chez des souris.

Dans une autre étude, les effets de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de *D. gnidium* sur la fonction cellulaire immunitaire des souris ont été évalués in vitro sur des souris. Les résultats obtenus ont montré que cet extrait agit comme anti-inflammatoire en inhibant les activités des macrophages et des lymphocytes chez ces souris [17].

En fin, La présente étude a démontré que certains extraits des feuilles de *D. gnidium* possèdent de puissantes activités antioxydantes et anti génotoxiques, qui pourraient être attribuées aux composés tels que les flavonoïdes et les polyphénols [23].

III. Métabolites chimiques :

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les lipides, les protéines et les glucides. Ces composés interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent tels que les parasites pathogènes et prédateurs, mais aussi les pollinisateurs et disséminateurs.

Les métabolites secondaires peuvent être classés 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.

III.1. Dosage des composés phénoliques:

III.1.1. Les polyphénols:

Dans diverses espèces végétales. Plus de 8 000 composés polyphénoliques ont été identifiés tous les composés phénoliques végétaux proviennent d'un intermédiaire commun, la phénylalanine, ou un précurseur proche, l'acide shikimique [24]. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits [25].

La teneur des phénols peut être déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin Ciocalteu [26]. Le réactif de couleur jaune est constitué d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [27].

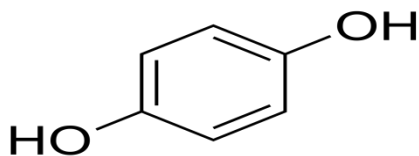


Figure 5. Structure de l'hydroquinone

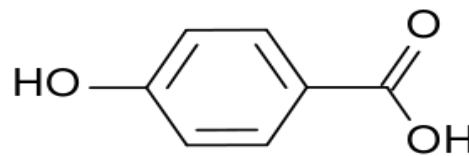


Figure 6. Structure d'acide parahydroxybenzoïque

III.1.2. Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les fruits et les écorces d'arbre. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur degré d'oxydation et leurs centres asymétriques [28].

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides [29]. Ils peuvent exister dans divers organes: l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les graines [30].

III.1.3. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus étudié de polyphénols. Ce groupe a une structure basique commune consistant en deux cycles aromatiques liés ensemble par trois atomes de carbone qui forment un hétérocycle oxygéné [25].

La détermination des flavonoïdes peut être effectuée avec le réactif de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ et la soude $NaOH$ [31]. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510nm.

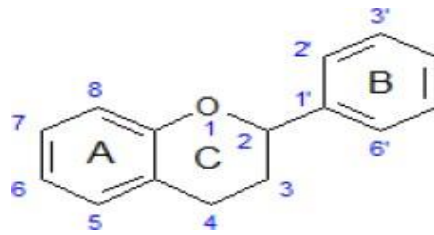


Figure 7. Structure générale des flavonoïdes

III.2. Généralités sur les huiles essentielles:

III.2.1. Définition :

Une huile essentielle est un extrait liquide, concentré et complexe, obtenu par distillation par entraînement à la vapeur d'eau d'une plante aromatique. Selon les normes internationales, les huiles essentielles doivent être liquides à température ambiante, de consistance huileuse mais non grasse, leur densité est souvent inférieure à celle de l'eau, volatiles, insolubles dans l'eau, et solubles dans les huiles végétales, dans l'éther et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage, et de polarité moyenne.

Les huiles essentielles sont principalement utilisées pour leurs propriétés médicinales, et odorantes. Elles sont employées dans le secteur du cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums, des détergents mais aussi dans le domaine alimentaire.

III.2.2. Composition des huiles essentielles :

La composition chimique des HE est complexe et peut varier selon la nature du sol, l'organe, le mode d'extraction, les facteurs climatiques et les pratiques culturales. Les huiles essentielles sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés.

✓ Les terpénoïdes :

Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est à dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés, de formule générale $(C_5H_8)_n$. Suivant les valeurs de n, on a les hémiterpènes (n=1), les monoterpènes (n=2), les sesquiterpènes (n=3), les triterpènes (n=6), les tétraterpènes (n=8) et les polyterpènes.

✓ Les composés aromatiques :

Les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénol. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles [32].

✓ Les composés d'origines diverses :

Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînaibles lors de l'hydro distillation. Ces produits peuvent être azoté ou soufrés [32].

III.3. Les hydrolats :

Les hydrolats ou les eaux aromatiques appelées aussi eaux florales sont issus de la distillation d'une plante ou d'une fleur à la vapeur d'eau en vue d'obtenir une huile essentielle.

Les hydrolats sont aujourd'hui de plus en plus présents sur le marché des produits naturels. Les praticiens en aromathérapie les utilisent souvent en compléments d'une thérapie par les huiles essentielles. Certains hydrolats sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires.

III.4. Principales méthodes d'extraction des huiles essentielles :

III.4.1. L'hydrodistillation:

Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur.

Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de la température du milieu, de l'acidité, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation [24].

III.4.2. L'entraînement à la vapeur d'eau :

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînaables par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe [25]. Il existe d'autres méthodes d'extraction :

a) Techniques conventionnelles telles que :

- L'hydrodiffusion
- La distillation à vapeur saturée
- L'expression à froid
- Extraction au moyen de solvant (l'enfleurage à froid et à chaud)

b) Techniques innovantes tel que :

- Extraction par des solvants supercritique
- Extraction par Détente éclair (flash détente)
- Détente instantée contrôlée (DIC)
- Extraction par ultrasons
- Extraction assistée par micro-ondes.

III.5. Acide gras :

Un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique longue. Ils sont présents dans les graisses animales et les graisses végétales, les huiles végétales ou les cires, sous forme d'esters,

Les acides gras naturels possèdent une chaîne carbonée de 4 à 36 atomes de carbone.

III.6. Insaponifiables :

Les insaponifiables sont les éléments résiduels qui sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques après saponification.

Ce sont des polyphénols, des phytostérols, des minéraux, des vitamines (A, D, E et K), des enzymes et des esters résineux.

C'est dans la partie insaponifiable que se trouve une grande partie des principes actifs qui confèrent aux huiles d'excellentes propriétés.

III.7. Chlorophylle:

III.7.1. Définition :

La chlorophylle, est un pigment végétal, responsable de la coloration verte des plantes. Ce pigment que l'on retrouve dans les cellules des végétaux est utilisé avec d'autres pigments par les plantes pour effectuer la photosynthèse.

Il existe plusieurs pigments photosynthétiques (chlorophylle a, b, c, carotène, phycocyanine, xanthophylle) mais le pigment le plus commun est la chlorophylle a qu'on retrouve dans toutes les plantes, les algues et les cyanobactéries

III.7.2. Différents types de chlorophylle :

Il existe plusieurs sortes de chlorophylles qui diffèrent par leur structure moléculaire et leur mode d'absorption des ondes lumineuses [33].

La formule chimique de chacune des 6 chlorophylles est :

- Chlorophylle a : $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$
- Chlorophylle b : $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$
- Chlorophylle c1 : $C_{35}H_{30}O_5N_4Mg$
- Chlorophylle c2 : $C_{35}H_{28}O_5N_4Mg$
- Chlorophylle d : $C_{54}H_{70}O_6N_4Mg$
- Chlorophylle f : $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ [34]

III.7.3. Couleur et structure :

Toutes ces molécules contiennent des liaisons doubles conjuguées qui sont essentielles pour l'absorption et le transport de l'énergie lumineuse.

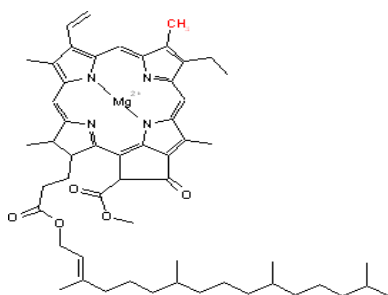


Figure 8. Structure de la chlorophylle A
(vert-bleu)

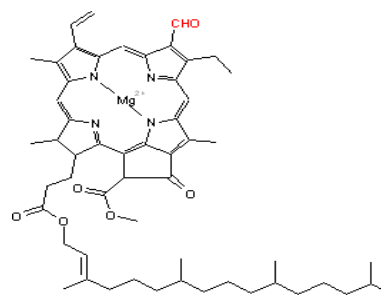


Figure 9. Structure de la chlorophylle B
(vert-jaune)

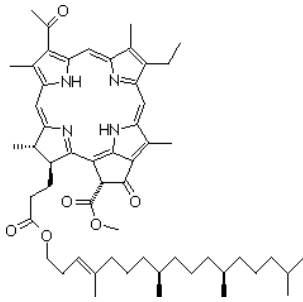


Figure 10. Structure de Phéophytine
(vert-olive)

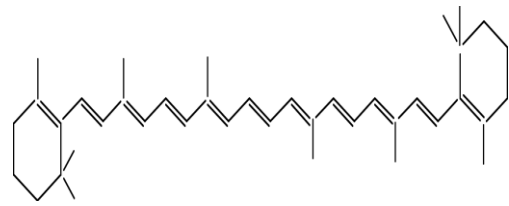


Figure 11. Structure de la β -Carotène
(jaune-orangé)

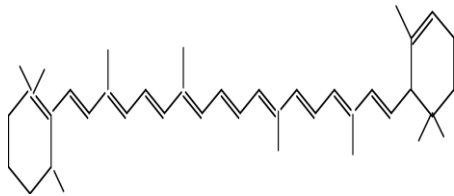


Figure 12. Structure de l' α -Carotène (orange)

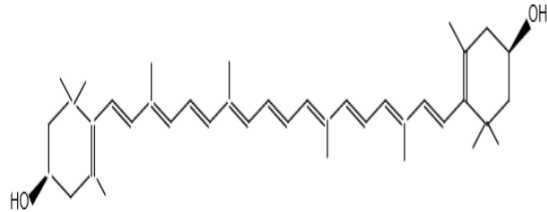


Figure 13. Structure de Lutéine (jaune)

Xanthophylles (jaune) :

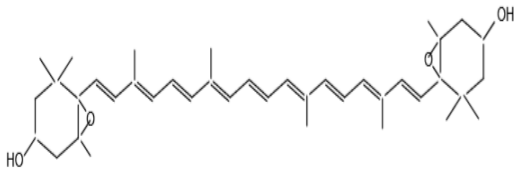


Figure 14. Structure de Viola xanthine (jaune)

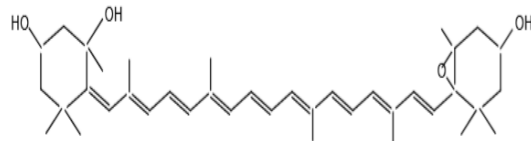


Figure 15. Structure de Néo xanthine (jaune)

III.8. Activité antioxydante :

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la capacité antioxydante. Elles sont largement décrites dans la littérature. Parmi lesquelles nous citons :

III.8.1. Test de réduction du radical stable, le DPPH :

III.8.1.1. Principe de la méthode:

La stabilité du radical libre 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) résulte de la délocalisation importante de l'électron célibataire sur la totalité de la molécule. Cette délocalisation est à l'origine de la coloration violette foncée caractérisée par une bande d'absorption entre 515-517 nm.

Quand une solution de DPPH est mélangée avec celle pouvant céder un atome d'hydrogène, une diminution de la coloration violette caractéristique de l'apparition de la forme réduite du DPPH est produite. Il persiste une légère coloration jaune due au groupement picryl résiduel [35].

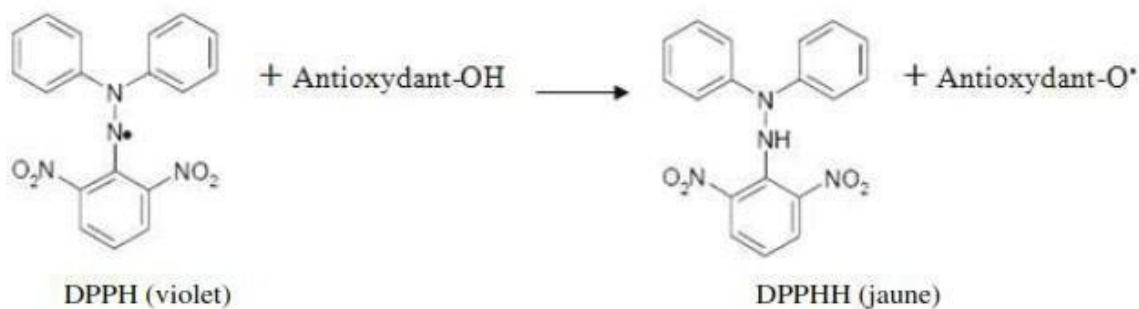


Figure16. Réaction du test DPPH [36]

III.8.2. Test FRAP (Ferric Reducing Ability Power):

Cette technique consiste à réduire le complexe ferrique de 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu à pH=3.6. L'absorbance est enregistrée à 595 nm après 30 min d'incubation à 37 ° C [37].

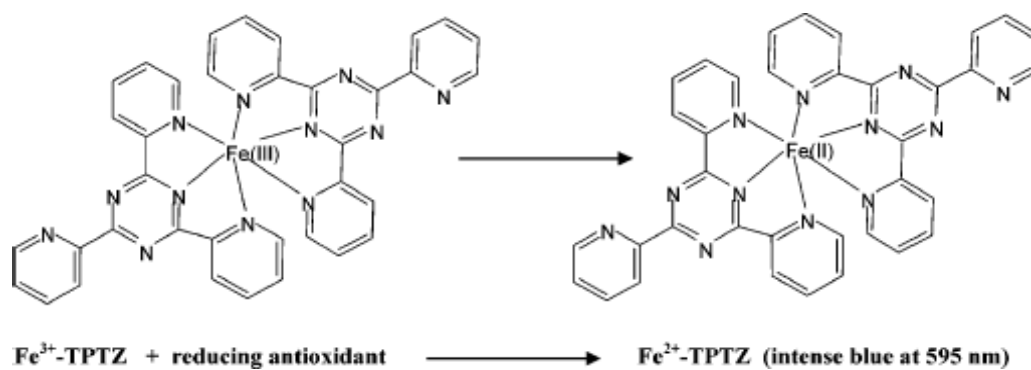


Figure17. Schéma de la réaction de test FRAP [38]

Chapitre II : Méthodes d'analyse

Chapitre II : Méthodes d'analyse

Les méthodes les plus appliquées pour l'analyse des huiles essentielles sont des méthodes chromatographiques qui permettent l'identification et la séparation des constituants.

I. Chromatographie en Phase Gazeuse CPG :

C'est une technique de séparation d'un mélange de molécules volatiles, appelées ici « analytes ». Elle repose sur l'équilibre de partage des analytes entre une phase stationnaire et une phase mobile gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est souvent combinée avec une technique d'identification spectrale, généralement la Spectrométrie de Masse (SM) ou la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier.

II. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

C'est une technique de chromatographie planaire dont la phase mobile est liquide. Elle est couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse ou de purification.

➤ Rapport frontal :

On appelle rapport frontal R_f d'une espèce chimique, le rapport entre la distance x parcourue par l'espèce et la distance y parcourue par l'éluant pendant le même temps.

R_f dépend de la nature du produit, de l'éluant et de la phase fixe.

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par l'éluant}} = \frac{x}{y}$$

Partie II: Étude Expérimentale
Chapitre III: Matériel et méthodes

Chapitre III: Matériel et méthodes

I. Matériel végétal:

I.1. Origine géographique et période de récolte de la plante :

Pour la réalisation des objectifs de notre travail, la plante récoltée au mois de février 2018 dans la région de Beni-snous (Tlemcen), nous a été fournie par un herboriste.

I.2. Identification botanique :

L'identification botanique de notre plante a été faite par des botanistes du laboratoire d'écologie et gestion des écosystèmes de l'université de Tlemcen.

I.3. Préparation du matériel végétal :

Le matériel végétal est nettoyé (débarrassé des débris) puis étalé sur du carton étendu par terre ensuite laissé sécher à l'ombre, à l'abri de la lumière, la poussière et dans un endroit bien aéré. Le matériel végétal est disposé par fines couches et remué de temps à autre. Après séchage, Les différentes parties de la plante sont conditionnées dans des sachets en papier pour des utilisations ultérieures.



Photo 3. Matériel végétal

II. Étude phytochimique:

II.1. Préparation des extraits bruts (aqueux et alcoolique):

1) Préparation des extraits éthanolique et méthanolique :

L'épuisement de la matière végétale a été réalisé à chaud par un montage de type Soxhlet, où 25g de la matière végétale est placée dans une cartouche poreuse à l'intérieur du siphon, et cela, en présence de 200 mL de solvant (éthanol ou méthanol). Le mélange est filtré et l'extrait obtenu est concentré à l'évaporateur rotatif puis conservé dans un flacon stérile [39]

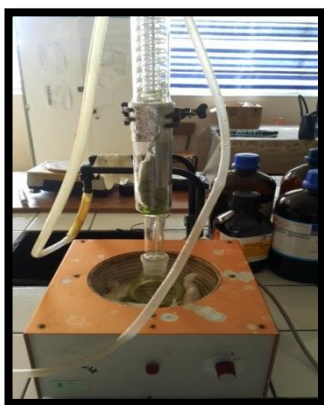


Photo 4. Montage de soxhlet.



Photo 5.Évaporateur Rotatif.

Chapitre III: Matériel et méthodes

2) Préparation de l'extrait aqueux :

L'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L. est obtenu à partir de 25 g de la poudre de plante que nous chauffons sous reflux dans 200 mL de l'eau distillée pendant 9h. Ensuite et après décantation, la solution est filtrée sur du papier filtre. Le filtrat est centrifugé pendant 10 minutes à 3900 tours par minute. Le surnageant a été filtré pour éliminer d'éventuels résidus. Le filtrat est transvasé dans des boîtes de pétri puis mis dans l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un extrait qui sera conservé dans le dessiccateur jusqu'à utilisation ultérieure [40]

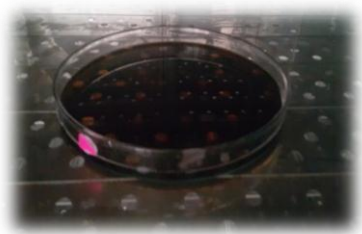


Photo 6. Boîte de pétri



Photo 7. Dessiccateur



Photo 8. Centrifugeuse

II.2. Calcul du rendement :

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par la formule:

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

R : Rendement en %,

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant,

M₀ : Masse en grammes du matériel végétal obtenu après dégraissage

II.3. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques sont un ensemble des techniques et méthodes de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Le but final de l'étude des plantes médicinales est d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante, ces techniques sont basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques.

II.3.1. Epuisement du matériel végétal avec de l'eau à chaud :

L'extrait aqueux est soumis aux différents tests cités ci-dessous :

1. Amidon:

Le test effectué consiste à traiter 5 mL de l'extrait aqueux avec le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée.

2. Composés réducteurs:

Le teste consiste à ajouter 2mL de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de Fehling, chauffer ensuite la solution résultante. Un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbonnes.

3. Saponosides:

Chapitre III: Matériel et méthodes

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 mL de l'extrait aqueux, après l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée:

Pas de mousse = test négatif (-) ;

Mousse moins de 1cm = test faiblement positif (+) ;

Mousse de 1-2cm = test positif (++) ;

Mousse plus de 2cm = test très positif (+++)[42]

4. Les tanins:

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1mL de l'extrait aqueux, 1mL d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins.

II.3.2. Epuisement du matériel végétal avec de l'éthanol :

L'extrait éthanolique est soumis aux tests cités ci-dessous :

1. Alcaloïdes sels :

On évapore 20 mL de la solution éthanolique à sec. On ajoute 5mL de HCl 2N au résidu et on chauffe dans un bain-marie. On filtre le mélange, puis on divise le filtrat en deux parties égales. En fin, on traite la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

Observation : présence de turbidité ou précipitation

(+) Est enregistré si le réactif produit une légère opacité

(++) Est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation

(+++) Est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd

2. Flavonoïdes :

On traite 5 mL d'extrait alcoolique avec quelques gouttes de HCl concentré et 0.5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3min [41]

3. Tanins:

A 1 mL de solution alcoolique, on ajoute 2mL d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (tanins cathéchiques), bleu-verte (tanins galliques) [42]

4. Composés réducteurs :

On traite 1mL de l'extrait éthanolique avec 2 mL d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis on chauffe. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique [42]

5. Coumarines :

On évapore 5mL de la solution extractive éthérique. On dissout le résidu dans 1 à 2mL d'eau chaude. On divise le volume en deux parties puis on Prend la moitié du volume comme témoin et on

Chapitre III: Matériel et méthodes

ajoute à l'autre moitié 0.5mL de NH₄OH (10%). En fin on met deux taches sur un papier filtre et on les examine sous la lumière U.V., une fluorescence intense indique la présence des coumarines [42].

6. Stérols et stéroïdes:

On évapore 10mL d'extrait alcoolique puis le résidu obtenu est traité avec 10mL de chloroforme anhydre. Après filtration, on mélange 5mL de la solution chloroformique avec 5mL d'anhydre acétique puis on ajoute quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. On agite et on laisse reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité) en 30 min à 21C°.

III. Dosage phytochimique des extraits:

III.1. Dosages des polyphénols totaux : [43]

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été effectuée par spectrophotométrie UV-Visible selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu.

➤ Mode opératoire :

Dans un tube à essai, on introduit 0.2 mL de l'extrait aqueux, 0.8 mL de la solution de Na₂CO₃ à 7.5 % et on agite. 1 mL de la solution de Folin Ciocalteu (10 mL du réactif Folin Ciocalteu + 90 mL d'eau distillée) y est additionné. L'ensemble est incubé à une température ambiante pendant deux heures. La lecture est effectuée contre un blanc sans extrait à 760 nm.

➤ Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

Une gamme étalon a été établie de 0.01 à 0.2 mg/mL, avec l'acide gallique pour calculer la concentration des composés phénoliques dans chaque extrait. Les résultats sont exprimés en équivalent-mg d'acide gallique /g d'extrait.(Annexe 1)

$$T = C \times \frac{V \times D}{P_s}$$

T : teneur en phénols totaux

C : concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe

V : Volume de l'extrait

D : facteur de dilution

P_s : poids de la matière sèche

III.2. Dosages des flavonoïdes : [44]

➤ Mode opératoire :

Dans un tube à essais, on introduit 1 mL de l'extrait méthanolique. 1 mL de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol) est ajouté. Le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

➤ Préparation de la courbe d'étalonnage de la quercétine :

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en

Chapitre III: Matériel et méthodes

utilisant de la quercétine comme contrôle positif. Une gamme de 10 concentrations de quercétine allant de 40 à 2.5 $\mu\text{g/mL}$ a été préparée à partir d'une solution mère à 400 $\mu\text{g/mL}$. La teneur en flavonoïdes est exprimée en ($\mu\text{g Eq / g d'extract}$) (**Annexe 2**)

III.3. Dosage des tanins : [45]

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm.

➤ **Mode opératoire :**

Dans un erlenmeyer, on introduit 5 mL du réactif d'analyse qui contient : 2.5 mL de la solution de vanilline à 1% mélangée à 2,5 mL de la solution de HCl à 8% (8 mL de HCl complétés à 100 mL avec du méthanol). On ajoute 1 mL de l'échantillon (préparé dans le méthanol) et on agite le mélange pendant une minute. On additionne 5mL de la solution de HCl à 4%. L'erlenmeyer est ensuite introduit au bain marie à 30°C et laissé pendant 20 min La lecture des absorbances est faite à 500 nm.

➤ **Préparation de la courbe d'étalonnage de la catéchine :**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Une gamme de concentrations de la catéchine allant de 0.3 à 0.06 mg/mL a été préparée à partir d'une solution mère à 4.4 mg/m. (**Annexe 3**)

IV. Huiles essentielles :

IV.1. Procédé d'extraction : [40]

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle [46]. C'est une technique qui permet d'extraire des huiles essentielles à partir de la plante fraîche ou sèche. L'hydrodistillation du matériel végétal est accomplie à l'aide d'un dispositif expérimental constitué d'un chauffe-ballon muni d'un thermostat et surmonté d'un essencier de type Clevenger.

Les vapeurs hétérogènes entraînées par chauffage sont condensées dans un réfrigèrent et l'huile essentielle obtenue se sépare de l'hydrolat par une simple différence de densité. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.



Photo 9. Montage de l'hydrodistillation

Chapitre III: Matériel et méthodes

Dans un ballon de six litres, une quantité de la partie aérienne de *Daphne gnidium* L est mise en contact direct avec quatre litres d'eau. Le chauffage est mis en marche en opérant une ébullition douce. Le réfrigérant est mis en fonction en réglant le débit d'eau. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau aromatique par décantation. La récupération de cette huile est effectuée du haut de l'essencier, à l'aide d'une pipette pasteur en introduisant de l'éther diéthylique surtout quand le rendement est faible.

Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre) ; c'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour ne recueillir que la phase organique exempte d'eau. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des piluliers en verre ambré et conservée au congélateur jusqu'à analyse.

IV.2. Caractérisation des huiles essentielles :

Une fois l'huile obtenue, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CPG/SM). Les conditions opératoires se trouvent en (Annexe 5)

IV.3. Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile (en mL) obtenue pour 100 g de matière végétale frais.

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal à traiter sèche. Le rendement R en huile essentielle est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Rd}\% = (m_1/m_0) \times 100$$

Rd : rendement en huile essentielle,

m_1 : masse en gramme d'huile essentielle,

m_0 : masse en gramme de la matière végétale

IV.4. Procédé d'obtention de l'extrait d'hydrolat :

Pour chaque extraction, 500 mL d'hydrolat a été récupéré dans des bouteilles en verre ambré et conservé à l'abri de la chaleur. Le volume total a été soumis à une extraction séquentielle liquide-liquide par un solvant apolaire en utilisant une ampoule à décanter.



Photo10. Obtention de l'hydrolat

Chapitre III: Matériel et méthodes

L'hydrolat a été traité par 3 fois 50 mL d'éther diéthylique. Le résidu ainsi récupéré a été mis dans des flacons opaques préalablement pesés.

Le calcul de rendement est défini comme suit :

$$\%HY = [V/V^{\circ}] \times 100$$

%HY : rendement en hydrolat,

V : volume d'hydrolat après traitement en millilitre,

V[°] : volume total de l'hydrolat en millilitre.

IV.5. Dégraissage du matériel végétal :

En utilisant un soxhlet, 25 g de la matière végétale est extraite en présence de 200 mL d'hexane tout en chauffant pendant 7h. Après évaporation du solvant, le résidu obtenu sous forme d'un extrait huileux représente la matière grasse. [47]

1. Extraction des insaponifiables:

1 g d'extrait hexanique est saponifié avec 50 mL de solution d'hydroxyde de potassium méthanolique (2 mol/L), pendant 1 heure sous reflux. A la fin du reflux, le mélange est lavé avec 20 mL d'eau distillée. Les composants de l'insaponifiable sont ensuite extraits trois fois avec 3 x 20 mL d'éther. Les extraits sont rassemblés et lavés trois fois avec 50 mL d'eau déminéralisée. Le solvant est ensuite éliminé à 35 °C sous pression réduite avec un évaporateur rotatif, puis pesé [48].

2. Extraction des acides gras:

La solution savonneuse aqueuse obtenue précédemment est acidifiée avec du HCl 1 N, jusqu'à précipitation des acides gras (pH 5-6). Les acides gras libérés sont extraits à l'éther (3x 20 mL) et séchés sur MgSO₄ puis pesés. Les acides gras sont transformés en leurs dérivés esters méthyliques par l'ajout d'une solution méthanolique de BF₃ à 10% (1 mL de BF₃ dans 10 mL d'éthanol). Par la suite, les acides gras sont extraits trois fois avec 50 mL d'hexane à température ambiante. La couche organique est évaporée et séchée sur Na₂SO₄ [48].

3. Calcul du rendement :

Le rendement est le rapport de la quantité de l'extrait recueillie après extraction sur la quantité de la biomasse, exprimée en pourcentage.

$$\text{Rdt (\%)} = (P_1 - P_2) / P_3 \times 100$$

P₁ : poids du ballon après évaporation ;

P₂ : poids du ballon avant évaporation (vide);

P₃ : poids de la matière végétale de départ.

IV.6. Obtention de la chlorophylle : [49,50]

Premièrement, nous commençons par hacher finement les feuilles à l'aide d'un robot ménager « Mixeur ». Les feuilles ainsi coupées sont mises dans un mortier contenant une spatule de sable et

Chapitre III: Matériel et méthodes

10 mL d'acétone. A l'aide du pilon, nous broyons jusqu'à ce que le solvant prenne une couleur vert foncé, éventuellement en tamponnant le milieu avec du CaCO_3 . L'ajout de chlorure de calcium CaCl_2 permet en outre de favoriser l'extraction en perméabilisant la membrane chloroplastique. Après filtration, nous recueillons la solution acétonique de chlorophylles de couleur vert limpide.

Evaporons le solvant soit à l'évaporateur rotatif ou en chauffant modérément au bain-marie jusqu'à obtenir une pâte de couleur vert-foncé.

IV.6.1. Chromatographie sur couche mince :

Mode Opérateur :

a) Préparation de la cuve :

La cuve chromatographique doit être bien fermée et préparée à l'avance pour que l'atmosphère à l'intérieur soit saturée en vapeur d'éluant. Pour cela, sous la hotte, verser l'éluant dans un bécher sec de 100 mL, sur une hauteur de $\frac{1}{2}$ cm. Recouvrir la cuve avec une boîte à pétri : pour notre cas, plusieurs éluants ont été testés.

- Eluant 1 : Ether de pétrole/Acétone/Cyclohexane : 85/10/5%
- Eluant 2 : Ether de pétrole/Ethanol : 90/10%
- Eluant 3 : Ether diéthylique/Ether de Pétrole : 60/40%
- Eluant 4 : Ether diéthylique/Cyclohexane: 70/30%

b) Préparation de la plaque chromatographique :

Prendre une plaque d'aluminium recouverte de silice. Ne pas toucher avec les doigts. Découper avec un cutter une plaque. Tracer au crayon sans appuyer une ligne (ligne de dépôt) à 1 cm du bord inférieur de la plaque ensuite, marquer légèrement au crayon sur cette ligne, l'emplacement du dépôt.

c) Dépôt de l'échantillon :

A l'aide d'une pipette pasteur, ou d'un cure-dent, prélever une goutte d'extrait vert et une goutte d'extrait de la bêta carotène (comme témoin) et la déposer à l'emplacement marqué. Ensuite, laisser sécher avant d'effectuer un nouveau dépôt.

d) Elution :

Lorsque les dépôts sont secs, introduire la plaque verticalement dans la cuve (la ligne de dépôt ne doit pas tremper dans l'éluant) et refermer à l'aide de la boîte à pétri. Au cours de l'élution, l'éluant migre sur la plaque en imprégnant la silice. Après, retirer la plaque de la cuve avec des pinces, lorsque le front du solvant est à 1 cm du bord supérieur de la plaque. Et enfin, repérer le front du solvant au crayon et laisser l'éluant s'évaporer sous la hotte.

e) Révélation (développement du chromatogramme):

Observer le chromatogramme et entourer au crayon, les différentes tâches colorées qui apparaissent. Lorsque les taches sont incolores, on les fait apparaître sous une lampe UV ou à l'aide

Chapitre III: Matériel et méthodes

d'un révélateur chimique mais dans le cas des pigments, ils apparaissent sous forme de taches colorées, visibles à l'œil nu.

f) Analyse du chromatogramme :

Pour ce faire, nous calculons le rapport frontal R_f de chacune des taches que nous comparons avec celui du témoin utilisé.

IV.7. Etude du pouvoir antioxydant:

IV.7.1. Test de piégeage du radical libre DPPH:

Utilisé en tant que réactif, le DPPH (2,2-diphényle-2-picrylhydrazyle hydrate) offre évidemment une méthode pratique et précise pour titrer les groupes oxydables d'origine naturelle ou synthétique.

➤ Mode opératoire :

Une solution éthanolique de 0,025 g/L de DPPH° est mélangée avec différentes concentrations des extraits en ($\mu\text{g/mL}$). On met 1mL de chaque dilution de ces extraits (aqueux, méthanolique ainsi l'huile et hydrolat), dans un tube à essai, on ajoute 1mL de solution éthanolique de DPPH, ensuite on laisse incuber 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. Après, on lit l'absorbance (517 à 518nm) contre un blanc qui contient de l'éthanol pur.

Ces mêmes opérations sont répétées, en remplaçant les extraits par l'acide ascorbique (contrôle positif) et l'éthanol pur (contrôle négatif). Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

IV.7.1.1 Calcul des IC_{50} :

La IC_{50} (concentration inhibitrice à 50%) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés donnant le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations. [51]

IV.7.2. Méthode de la réduction du fer (FRAP):

1 mL de l'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50 °C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2.5 mL d'acide trichloracétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 2.5 mL du surnageant sont ajoutés à 2.5 mL d'eau distillée et 500 μL d'une solution de chlorure du fer ($FeCl_3, 6H_2O$) à 0.1 % sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un Spectrophotomètre. [52]

Chapitre IV :
Résultats et discussion

Chapitre IV: Résultats et discussion.

I. Obtention des extraits:

Les résultats correspondant aux rendements de l'extrait aqueux de *D.gnidium* L. et de son extrait méthanolique sont consignés dans le tableau 1 :

Tableau 1: Masse et rendement des extraits de *Daphne gnidium* L.

Materiel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
25 g	Aqueux	4.59	18.36 %
	méthanolique	10.69	42.76%

Il ressort du tableau que le rendement de l'extrait méthanolique de la plante étudiée est très important et dépasse largement celui de l'extrait aqueux.

II. Criblage phytochimique :

Nous avons procédé aux tests phytochimiques afin de révéler les différents métabolites secondaires présents dans cette plante. Les résultats du criblage phytochimique qualitatif réalisé sur les extraits de la partie aérienne de *D. gnidium* L. sont reportés dans le Tableau 2. Au cours de ces tests, deux solvants de polarités différentes (eau, éthanol) ont été utilisés. Les différentes méthodes employées ont été exposées dans la partie expérimentale.

Tableau 2 : Criblage phytochimique de la partie aérienne de *Daphne gnidium* L.

Réactif	Famille	Extrait	
		Aqueux	Ethanolique
Mayer	Alcaloïdes	/	-
Wagner		/	-
Mg, HCl	Flavonoïdes	+	+
Liqueur de Fehling	Composés réducteurs	+	+
FeCl ₃	Tanins	+	+
NH ₄ OH 10%	Coumarines	/	-
Réactif d'amidon	Amidon	-	/
Anhydride acétique+H ₂ SO ₄	Stéroïdes	/	-
Indice de mousse	Saponosides	+	/

-: absence + : présence / : non testé

Le criblage phytochimique nous a permis de caractériser les principaux groupes chimiques qui pourraient être responsables des propriétés des extraits aqueux et éthanolique de l'espèce *D. gnidium* L..

Les groupes chimiques mis en évidence sont les flavonoïdes, les composés réducteurs, les tanins, et les saponosides (Tableau 2). Par ailleurs, les alcaloïdes, les coumarines et les stéroïdes ainsi l'amidon n'étaient pas présents.

Chapitre IV: Résultats et discussion.

La présence des flavonoïdes et des tanins révèlent que *D.gnidium* L. est riche en composés phénoliques qui donneraient à la plante des activités biologiques intéressantes. En effet, les flavonoïdes possèdent un spectre très large d'activités biologiques et pharmacologiques comprenant des activités antitumorales, antioxydantes, anti-inflammatoires..... Comme les flavonoïdes, les tanins sont aussi doués d'activités : antifongique, antibactérienne et antioxydante et ils sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines [54].

III. Dosage phytochimique des extraits :

A la lecture des résultats obtenus et présentés dans le Tableau3, les quantités des polyphénols (12.73 mg GAE/g)et des flavonoïdes (11.95 mg QE/g)sont importantes. Par contre, la quantité des tanins trouvée est très faible, et est de (0.04mg CE/g).Il a été rapporté que le taux des tanins dans une plante dépend du stade de développement végétatif et des conditions environnementales [53]

Tableau 3: Dosages des composés phénoliques

Polyphénols(mg GAE/g)	12.73± 0.03
Tanins (mg CE/g)	0.04± 0.02
Flavonoïdes (mg QE/g)	11.95± 0.02

IV. Extraction des huiles essentielles :

L'huile essentielle a été caractérisée par une couleur jaune et une odeur forte avec un rendement de 0.015 %



Photo 11. Huile essentielle de *D.gnidium* L.

L'évaluation de la proportion de chaque composé dans l'huile a permis d'obtenir les résultats présentés dans le Tableau 4 où les composés identifiés sont listés suivant l'ordre de leur temps de rétention. Au total, 32 composés ont été identifiés à des pourcentages variables.

Les résultats de l'identification des constituants de notre huile essentielle, sont présentés dans le (Tableau 4). Ce dernier regroupe les données expérimentales suivant :

- ✓ Le nom de la molécule identifiée.
- ✓ Les indices de rétentions IR

Chapitre IV: Résultats et discussion.

Tableau 4: composition chimique de *Daphne gnidium* L.

Pic	Composés	TR	%	IR
1	Benzaldehyde C ₇ H ₆ O	14.386	0.19	928.79
2	Meta cymene C ₁₀ H ₁₄	18.721	0.41	1011.12
3	Linalol C ₁₀ H ₁₈ O	22.954	1.23	1080.97
4	Nonanal C ₉ H ₁₈ O	23.158	2.11	1084.33
5	Borneol C ₁₀ H ₁₈ O	25.484	1.84	1121.47
6	Cryptone C ₉ H ₁₄ O	27.878	2.12	1158.80
7	Naphtalene C ₁₀ H ₈	28.082	1.35	1161.99
8	Estragol C ₁₀ H ₁₂ O	29.110	1.95	1178.01
9	Decanal C ₁₀ H ₂₀ O	29.544	0.78	1184.78
10	Cuminaldehyde C ₁₀ H ₁₂ O	31.350	0.93	1213.01
11	Carvone C ₁₀ H ₁₄ O	31.912	16.51	1221.82
12	Phellandral C ₁₀ H ₁₆ O	33.898	0.69	1252.95
13	Alpha terpinen C ₁₀ H ₁₆	34.324	1.42	1259.64
14	Trans anethole C ₁₀ H ₁₂ O	34.873	4.78	1268.23
15	Carvacrole C ₁₀ H ₁₄ O	35.501	3.59	1278.08
16	Undecan -2-ol C ₁₀ H ₂₄ O	35.718	2.50	1281.49
17	Thymol C ₁₀ H ₁₄ O	36.150	6.70	1288.26
18	Piperitenone oxide C ₁₀ H ₁₄ O ₂	39.570	4.26	1343.23
19	Trans beta damascenone C ₁₃ H ₁₈ O	41.969	2.03	1382.08
20	Trans caryophyllene C ₁₅ H ₂₄	44.103	1.36	1417.39
21	Neryle acetate C ₁₂ H ₂₀ O ₂	44.900	0.95	1430.87
22	Alloaromadendrene C ₁₅ H ₂₄	47.315	1.83	1471.76
23	Alpha curcumene C ₁₅ H ₂₂	48.572	1.78	1493.03
24	Delta cadinene C ₁₅ H ₂₄	49.900	0.41	1516.29
25	Calamenene C ₁₅ H ₂₂	51.174	1.45	1538.94
26	Cis 3-hexenyl benzoate C ₁₃ H ₁₆ O ₂	52.188	0.69	1556.97
27	Spathulenol C ₁₅ H ₂₄ O	52.925	12.51	1570.08
28	Caryophyllene oxide C ₁₅ H ₂₄ O	53.487	2.38	1580.07
29	Beta turmerone C ₁₅ H ₂₂ O	56.781	2.96	1640.65
30	Phytone C ₁₈ H ₃₆ O	66.520	2.45	1830.42
31	Acide hexadecanoïque C ₁₆ H ₃₂ O ₂	73.667	8.26	1981.53
32	Pentacosane C ₂₅ H ₅₂	98.922	2.06	2499.11
	% identification totale		94.48	

Chapitre IV: Résultats et discussion.

% monoterpènes hydrocarbonés		1,83	
% monoterpènes oxygénés		38,22	
% sesquiterpènes hydrocarbonés		6,83	
% sesquiterpènes oxygénés		14,89	
% non terpéniques		32,71	

L'analyse de l'échantillon de l'huile de *D.gnidium* L. par CPG et CPG/SM a permis l'identification de 32 composés représentant 94,48 % de la composition totale de l'huile essentielle.

Les composés majoritaires sont : La Carvone (16.5%), Spathulenol (12.51%), l'Acide hexadecanoïque (8.26%), le Thymol (6.70%), Piperitenone oxide (4.26%).

L'huile est caractérisée par une forte teneur en monoterpènes oxygénés (38,22%), monoterpènes hydrocarbonés (1,83%), sesquiterpènes oxygénés (14,89%) sesquiterpènes hydrocarbonés (6,83%)

La carvone est l'une des molécules aux propriétés expectorantes et mucolytiques intéressantes qui aident à fluidifier le mucus et à favoriser son expulsion hors des bronches. Elle permet aussi de faciliter la digestion et la production de bile par le foie. Par ailleurs, la carvone est une cétone monoterpénique aux propriétés cicatrisantes qui favorise la reconstitution des tissus cutanés. Par ailleurs, la carvone a été employée depuis des milliers d'années dans l'alimentation, en raison de son arôme. En agriculture biologique, elle est utilisée pour empêcher la germination précoce des pommes de terre.

V. Obtention de l'extrait d'hydrolat :

À l'issue du processus d'extraction de l'huile essentielle de *Daphne gnidium* L. hydrodistillation, 500 mL d'hydrolat ont été récupérés. Pour extraire les composés volatils, des extractions liquide-liquide successives avec de l'éther diéthylique ont été effectuées. Après évaporation du solvant sous pression réduite, 0,055g d'extrait d'hydrolat concentré ont été récupérés ce qui correspond à une concentration de 0.01650g /L par rapport au volume de départ. L'hydrolat possède une odeur très forte avec un aspect huileux très visqueux, avec un rendement de 0.018 %.

VI. Extraction des insaponifiables et des acides gras :

➤ Calcul du rendement de l'extrait hexanique :

Le rendement de l'extrait hexanique de *Daphne gnidium* L. est de 11.28 %. L'idée d'extraction des acides gras et des insaponifiables consiste à extraire et à établir le profil chimique des acides gras présents dans la plante. Le rendement des acides gras et les insaponifiable est consignés dans (le tableau 5)

Tableau 5 : Rendement des acides gras et les insaponifiable :

Extrait hexanique	Insaponifiables	Acides gras
11.28	0.20	1.80

Chapitre IV: Résultats et discussion.

VII. Analyse de la chlorophylle par chromatographie sur couche mince.

Après avoir extrait la chlorophylle en utilisant l'acétone (Photo 14), nous avons procédé à sa séparation par CCM.



Photo 12. Obtention de la chlorophylle

VII 1. Chromatographie sur couche mince :

Afin de séparer les différents pigments colorés des feuilles de notre plante, parmi les quatre éluants testés c'est l'éluant 4 qui a donné la meilleure séparation (Photos 1,2,3,4).

En présence du bêta-carotène comme témoin, nous avons calculé les valeurs des R_f des différentes taches. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6.



Photo 13. CCM de la chlorophylle
Ether de pétrole/Acétone/Cyclohexane:85/10/5%



Photo 14. CCM de la chlorophylle
Ether de pétrole/Ethanol:90/10%



Photo 15. CCM de la chlorophylle
Ether diéthylique/Ether de Pétrole:60/40%



Photo 16. CCM de la chlorophylle
Ether diéthylique/Cyclohexane:70/30%

Chapitre IV: Résultats et discussion.

Tableau 6 : Valeurs des R_f des composés

Composé	Couleur de la tache	R_f
1	Jaune	0.25
2	Vert-jaune	0.42
3	Vert-bleu	0.56
4	Vert-olive	0.65
5	Jaune-orange	0.79

En se basant sur la valeur du R_f du témoin utilisé, il apparaît que la tache 5 correspondrait à la bêta-carotène. Par ailleurs, et selon la recherche bibliographique effectuée [49] les quatre autres taches obtenues de couleurs différentes correspondraient aux composés reportés dans le tableau

Tableau 7 : Polarité et identité des composés

Composé	Polarité des composés	Composés identifiés
1	Polaire	Xanthophylle
2	Moyennement polaire	Chlorophylle B
3	Peu polaire	Chlorophylle A
4	Peu polaire	Phéophytine
5	Très peu polaire	carotènes

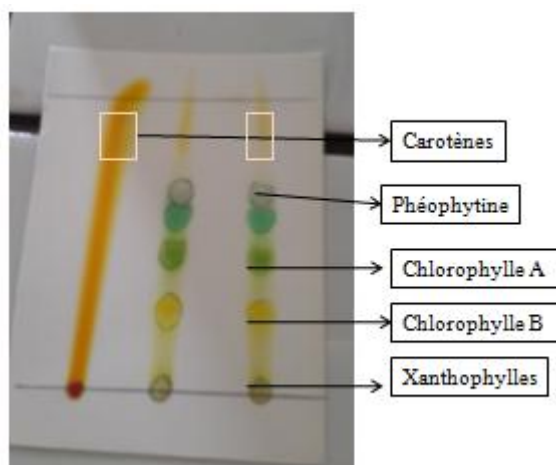


Photo 17. Composés identifiés par CCM

VIII. Résultats de l'activité antioxydante des extraits :

VIII. 1. Méthode du piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits de *D.gnidium* L. a été évaluée par spectrophotométrie suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune, mesurable à 517 nm.

Chapitre IV: Résultats et discussion.

Les courbes d'activité antioxydante sont exprimées en pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et de l'acide ascorbique pris comme antioxydant de référence.

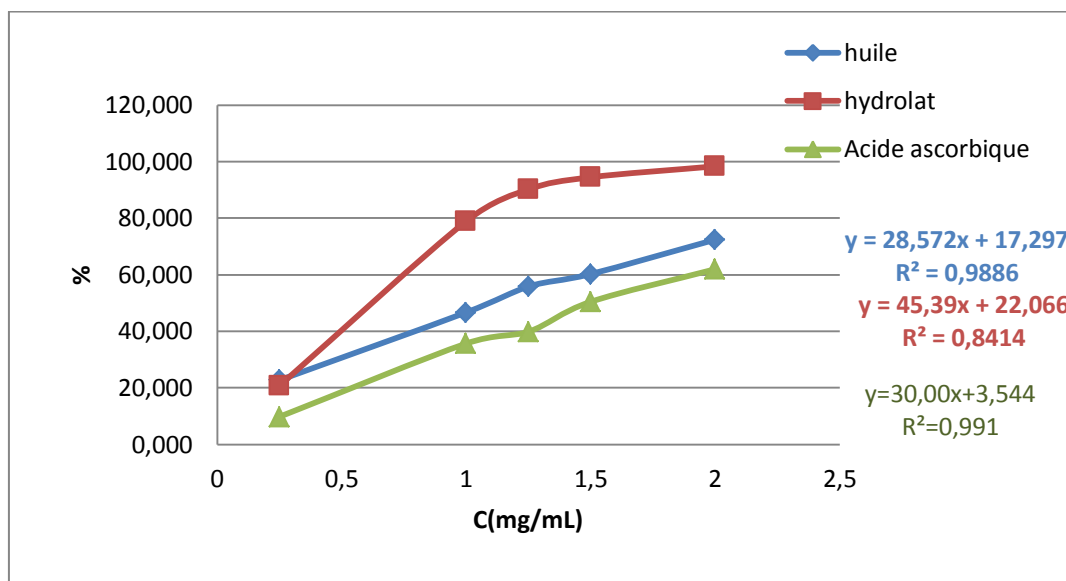


Figure 18. Courbes d'activité antioxydante (HE, HY et AA)

L'interprétation des courbes montre que l'activité antioxydante des extraits augmente avec l'augmentation de leurs concentrations pour se stabiliser à la fin.

Dans le gramme des concentrations étudiées, l'IC₅₀ a été estimée en utilisant la courbe de régression linéaire $y = ax + b$. Les IC₅₀ sont déterminées à partir des graphes (figures 18,19 et 20) dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée, l'activité antioxydante en pourcentage.

A partir des courbes (figure 18) ainsi que des valeurs des IC₅₀ trouvées (Tableau 8) , il apparait que l'huile essentielle et l'extrait d'hydrolat donnent une activité antioxydante plus importante que l'acide ascorbique. L'extrait d'hydrolat dont la valeur de IC₅₀ est la plus faible possède le pouvoir antioxydant le plus fort. Cela pourrait être du aux composés oxygénés hydrophiles existants dans cet extrait.

Tableau 8 : IC₅₀ de l'huile essentielle, l'extrait d'hydrolat et de l'acide ascorbique (DPPH)

L'extrait	IC 50 (mg/mL)
L'huile	1.14
L'hydrolat	0.62
Acide ascorbique	1.55

Chapitre IV: Résultats et discussion.

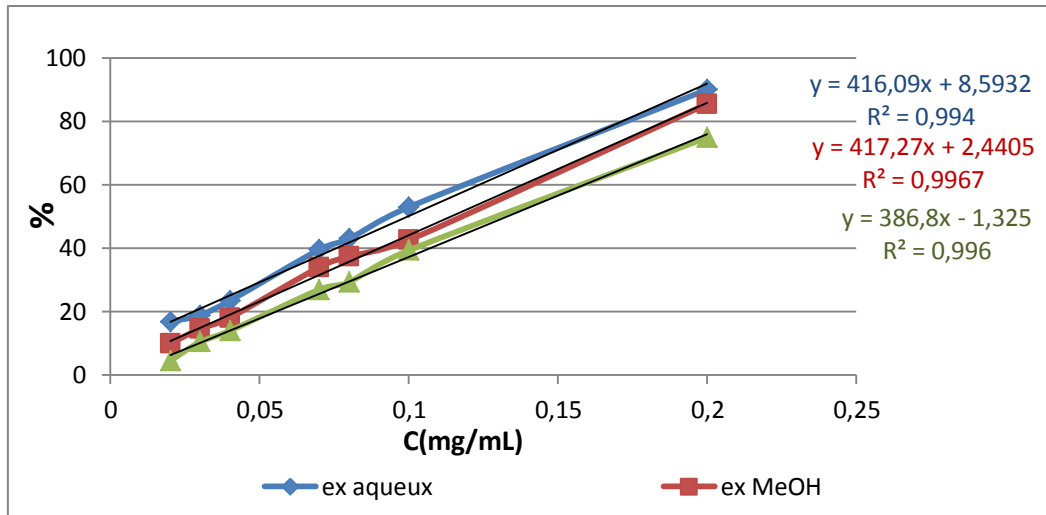


Figure 19. Courbes d'activité antioxydante des extraits (Aqueux, Méthanolique)

A partir des courbes (figure 19) ainsi que des valeurs des IC_{50} trouvées (Tableau 9), il apparaît que les deux extraits aqueux et méthanolique donnent une activité antioxydante semblable à celle de l'acide ascorbique.

Tableau 9 : IC_{50} des extraits aqueux, méthanolique et de l'acide ascorbique (DPPH)

L'extrait	IC_{50} (mg/mL)
Aqueux	0.10
Méthanolique	0.12
Acide ascorbique	0.13

VIII.2. Méthode FRAP

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} / complexe ferricyanide à la forme du fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700nm [55].

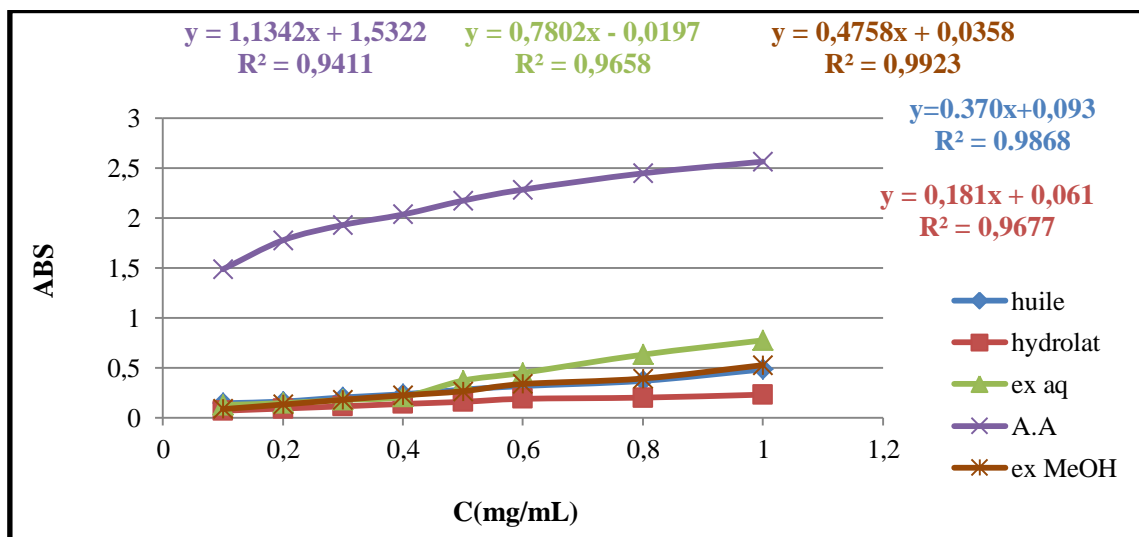


Figure 20. Courbe d'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de FRAP

Chapitre IV: Résultats et discussion.

Il ressort du graphe que tous nos extraits présentent des activités antioxydantes nettement inférieures qu'à celle de la référence (acide ascorbique). Il apparait aussi que c'est l'extrait aqueux qui présente le meilleur pouvoir antioxydant.

l'ordre décroissant des activités est le suivant : acide ascorbique > extrait aqueux > extrait méthanolique ,huile > hydrolat.

Tableau 10 : IC₅₀ des extraits et de l'acide ascorbique (FRAP)

L'extrait	IC ₅₀ (mg/mL)
L'huile	134.88
L'hydrolat	275.91
Aqueux	64.13
Méthanolique	105.19
Acide ascorbique	42.74

Conclusion générale

Conclusion générale

Le nord ouest algérien est connu pour sa grande diversité où beaucoup d'espèces restent peu étudiées.

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO) dont l'un des objectifs est la valorisation des espèces végétales du nord ouest algérien dans un but de découvrir de nouvelles molécules bioactives. Pour ce faire, une espèce appartenant à la famille des Thymelaeaceae a été sélectionnée. Il s'agit de : *D.gnidium* L.

Le choix de cette plante a été fondé sur la base d'une recherche bibliographique approfondie qui a révélé une plante très peu étudiée et dont l'huile essentielle n'a jamais fait l'objet d'aucun travail jusqu'à ce jour.

Nous avons commencé par un criblage phytochimique qualitatif basé sur des réactions de coloration et/ou de précipitation. Cet examen a permis de mettre en évidence différentes familles chimiques. Les flavonoïdes, les composés réducteurs, les tanins, et les saponosides sont présents dans *D.gnidium* L. alors qu'elle est dépourvue d'alcaloïdes, de coumarines, de stéroïdes et d'amidon.

L'huile essentielle, l'hydrolat ainsi que les acides gras de la partie aérienne (tiges et feuilles) ont été obtenus respectivement par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger et par extraction liquide-liquide. Parmi ces extraits, seule l'huile essentielle a été caractérisée et pour la première fois. Le rendement d'huile essentielle a été exprimé par rapport à la matière sèche. L'espèce *D. gnidium* L. a des rendements faibles en huile essentielle et en hydrolat qui ont des valeurs respectives de 0.015 % et 0.018 %

La caractérisation de l'huile essentielle a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM). L'analyse du chromatogramme. a révélé la présence d'un mélange complexe de composants qui représentent 94.48 % de la quantité totale de l'huile essentielle. Les monoterpènes oxygénés ont montré une prédominance avec un pourcentage de 38.22 % dont les composés les plus importants sont la carvone (16.51 %), le spathulenol (12.51 %) et l'acide hexadécanoïque (8.26%).

Par ailleurs, l'extraction de la chlorophylle et sa séparation par chromatographie sur couche mince a permis d'identifier cinq composés dont la bêta carotène.

L'extraction solide-liquide par soxhlet de la partie aérienne de *D. gnidium* L., en utilisant deux solvants de polarités différentes ; le méthanol et l'eau, a permis d'obtenir deux extraits bruts où le méthanol a donné le meilleur rendement. les quantités des polyphénols et des flavonoïdes sont importantes. Alors que , la quantité des tanins trouvée est très faible.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle, de l'extrait d'hydrolat et des différents autres extraits, a été effectuée pour la première fois. Pour ce faire, deux méthodes ont été employées : DPPH et FRAP. Les résultats obtenus pour les huiles essentielles et l'hydrolat de *D.gnidium* L. montrent une activité antioxydante très forte et même meilleure que celle de l'acide ascorbique. En ce qui concerne les extraits méthanolique et aqueux, le test au DPPH révèle des activités antioxydantes très intéressantes et très proches de celle de l'acide ascorbique.

Les activités antioxydantes de *D. gnidium* L. testées par les deux méthodes du DPPH et FRAP ont donné des résultats différents.

Cette étude a permis de mieux connaître la phytochimie de la plante choisie qui permettrait l'enrichissement de la banque de données des huiles essentielles..

Enfin, pour la valorisation de la flore de l'ouest algérien, ce travail ouvre des perspectives de recherches en envisageant d'analyser l'extrait d'hydrolat et les acides gras, et élargir l'éventail des activités biologiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Quezel P., et Santa S., 1963.- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 670p
- [2] Bosserdet et Rivolier., 1977. Secret et vertus des plantes médicinales. Paris 463p. of the Missouri Botanical Garden, 479-535 p.
- [3] Bouhadjera K., 2005. Thèse contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudneya africana* R.Br. Et *Aristidapungens* L. UN- ABOU BEKR BELKAID.
- [4] Boudjouref., 2011. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisiacampestris* L. Université Ferhat Abbes, Sétif. Magister.
- [5] Florence M., Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles. Etude de cas en maison de retraite, 2012, p. 7-10.
- [6] Besombes C. Thèse de doctorat : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées, Université de la Rochelle, 2009; p. 51.
- [7] Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A., 1988, Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae, *J. Ethnopharmacol*, 24, 41-91.
- [8] [Botanique] LEANDRI Jacques - Structure particulière d'un rhizome de *Daphne*. - 1928, p. 243-248 - Départ./Région : , *Bulletin de la Société Botanique de France*, 4, Tome 75 - Fascicule 2.
- [9] Chase, M.W., and Reveal, J.L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Bot J Linn Soc* 161, 122–127.
- [10] Quezel P., Santa S., Nouvelle flora de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris, 1963, p. 502.
- [11] Guide illustré de la flore algérienne.pdf
[http://www.wilayaalger.dz/Guide%20illustré%20de%20la%20flore%20algérienne%](http://www.wilayaalger.dz/Guide%20illustré%20de%20la%20flore%20algérienne%20)
- [12] Catalogue des plantes médicinales-Lajeunia-n° 186).
- [13] Freeman, P. W.; Ritchie, E.; Taylor, W. C. *Aust. J. Chem.* 1979, 32, 2495–2506.
- [14] Lin, L.-C., Yang, K.-Y., Chen, Y.-F., Wang, S.-C., and Tsai, T.-H. (2005). Measurement of daphnoretin in plasma of freely moving rat by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1073, 285–289.
- [15] Thèse Doctorat Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich; Julien Ferrari ; LAUSANNE 2002
- [16] Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Casu, M., Pompei, R., Bonsignore, L., 2001. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* 8 (4), 302–305
- [17] Harizi, H., Chaabane, F., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2011). Inhibition of

proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cellular Immunology* 267, 94–101.

[18] Iauk, L., Aleo, G., Caccamo, F., Rapisarda, A., Ragusa, S., Speciale, A.M., 1996. Antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* L. leaf extracts. *Phytotherapy Research* 10, 166–168

[19] Iauk, L., Aleo, G., Caccamo, F., Rapisarda, A., Ragusa, S., Speciale, A.M., 1997. Comparative evaluation of antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* leaf and bark extracts. *Farmacoterapia* 14, 37–43

[20] Rapisarda, A., Germanò, M.P., Iauk, L., La Rosa, M., Sanogo, R., Ragusa, S., 1998. *Daphne gnidium* L. bark and leaf extracts: skin damage by topical application. *Phytotherapy Research* 12, 49–51

[21] Mak, P., Leung, Y.K., Tang, W.Y., Harwood, C., Ho, S.M., 2006. Apigenin suppresses cancer cell growth through ER β 1. *Neoplasia* 8, 896–904.]

[22] Chaabane, F., Pinon, A., Simon, A., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2014). Chloroform leaf extract of *Daphne gnidium* inhibits growth of melanoma cells and enhances melanogenesis of B16-F0 melanoma. *South African Journal of Botany* 90, 80–86.

[23] Chaabane, F., Boubaker, J., Loussaif, A., Neffati, A., Kilani-Jaziri, S., Ghedira, K., and Chekir-Ghedira, L. (2012). Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *daphne gnidium* leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12, 153. [24] Kanti Bhooshan Pandey and Syed Ibrahim Rizv. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009 Nov-Dec; 2(5): 270–278.

[25] Boizot N., Charpentier J.P., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier, *Le cahier des techniques de l'Inra*, 2006, p. 79- 82.

[26] Lister E, Wilson P., (2001). Measurement of total phenolics and ABTS assay for Antioxidant Activity. *New Zealand: Crop Research Institute*.

[27] Boizot N., and Charpentier .J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. Pp 79-82

[28] Hemingway R W, 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*. Hemingway R W, Laks P. E. New York.

[29] Cavin A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia marginata* (Convolvulacées) et *Oropeaenandra* (annonacées). Thèse de Doctorat, Lausanne, 241 P.

[30] Khanbabae K., Ree T. R., Tannins: Classification and Defenition, *Journal of Royal Society of Chemistry*, *Journal of Royal Society of Chemistry*, 2001, 18: 641-649.

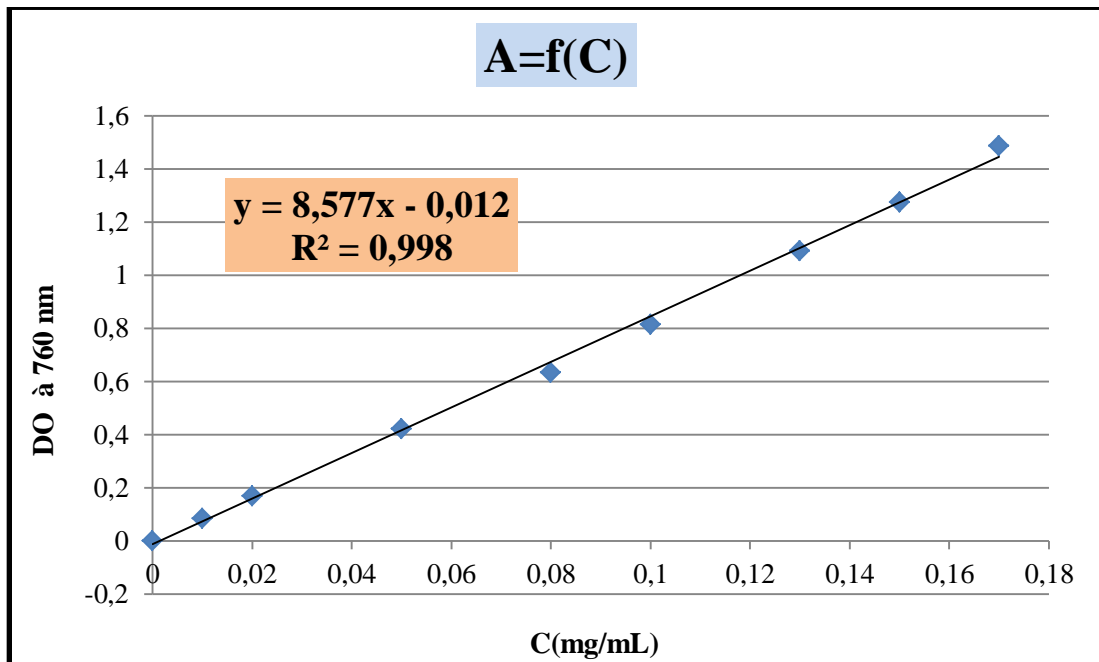
[31] Dewanto V, Wu X, Adom K K, Liu R H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010 -3014.

- [32]M. Piochon, "Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse," Mémoire, Université du Québec ,Quebec, 2008.
- [33]Personal Care.EFFECTS OF CHLORELLA EXTRACT ON SKIN.Novembre 2007.
<http://www.personalcaremagazine.com/Print.aspx?Story=3080>.
- [34]Clémence MICHEL.10 juin 2013.Les Echouages d'Algues sur les Côtes du Calvados. Master. UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE NORMANDIE.
- [35]Molyneux P, the use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, songklanakarin J.Sci.Technol ,2004, 26(2) : 211-219.
- [36]CONGO M, 2012. Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- [37] Durazzo, A., Lisciani, S., Camilli, E., Gabrielli, P., Marconi, S., Gambelli, L., Aguzzi, A.,Lucarini, M., Maiani, G., Casale, G., Marletta., L., Nutritional composition and antioxidant properties of traditional Italian dishes, *Food Chemistry* (2016), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.120>
- [38] PRIOR R L., WU X., SCHAICH K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements . *Agric. Food Chem.*(53) : 4290-4302
- [39] Houghton P.J and Raman A, *Laboratory Hand Book For Fractionation Of Natural Extracts*, 1sted. Londres, 1998.
- [40]Selles,Chaouki, Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum L.* Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M. Thèse de doctorat d'état : chimie physique. Tlemcen : Université Abou Bekr Belkaid, 2012, 214p.
- [41] Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R., *Travaux et documents de l'orstom*, Paris, 1971.
- [42] Trease E., Evans W. C., *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall,13th Ed., London, 1987, p. 61-62.
- [43] Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999); Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Methods in Enzymology*.299 : 152-178
- [44] Yi Z.-B., Yu Y., Liang Y.-Z., Zeng B. (2007).In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *PericarpiumCitriReticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *LWT-Food Science and Technology*.4 : 1000-1016.
- [45] Price, M.L; Van scoyoc, S; et Butler, L.G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain, *J. Agric. Food Chem*, 26: 1214-1218.
- [46] Normes AFNOR Receil Des Normes Françaises Huile Essentielle.AFNOR ,Paris .1992

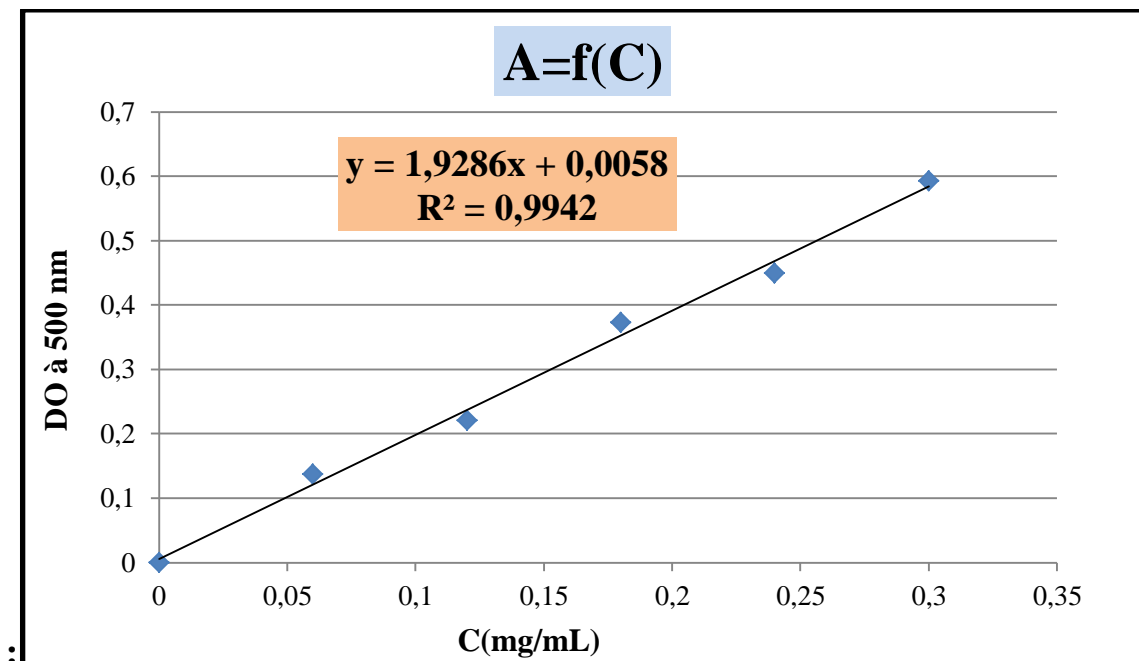
- [47]. Benmehdi H, « Valorisation de certaines plantes médicinales a activité hypoglycemiante comme la coloquinte », Abou Bekr Belkaid, tlemcen, 2000.
- [48] Bendiabdellah A. Etudes chimique et biologique des extraits de trois Daucus (D. crinitus, D. muricatus et D. carota ssp hispanicus) de la région de Tlemcen, Thèse de Doctorat d'état, 2014, Université de Tlemcen
- [49] http://scienceamusante.net/wiki/index.php?title=La_chlorophylle
- [50] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Chlorophylle>
- [51] Bentabet N, Boucherit-otmani Z, and Boucherit K, “Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de fedolia avetioides de la région de Béchar en Algérie.”
- [52] N. Bougandoura ,N.Bendimerad , “Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de Satureja calamintha ssp.Nepeta (L.) Briq.,” Nat. Technol., vol. 9, p. 14 à 19, Juin 2013.
- [53] Skadhauge B., GruberM.Y., Thomsen K.K., Von Wettstein D., 1997. Leucocyanidin reductase activity and accumulation of proanthocyanidins in developing legume tissue.Am. J. Bot.Pp 494-503.
- [54] Ma Z. C., Porter L. J., Tannins from *Bendo Eucalyptus*, Journal of Integrative Plant Biology, 1988, 30: 534-538.
- [55] Oyaizu M., Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine, Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44: 307-315.

Annexe

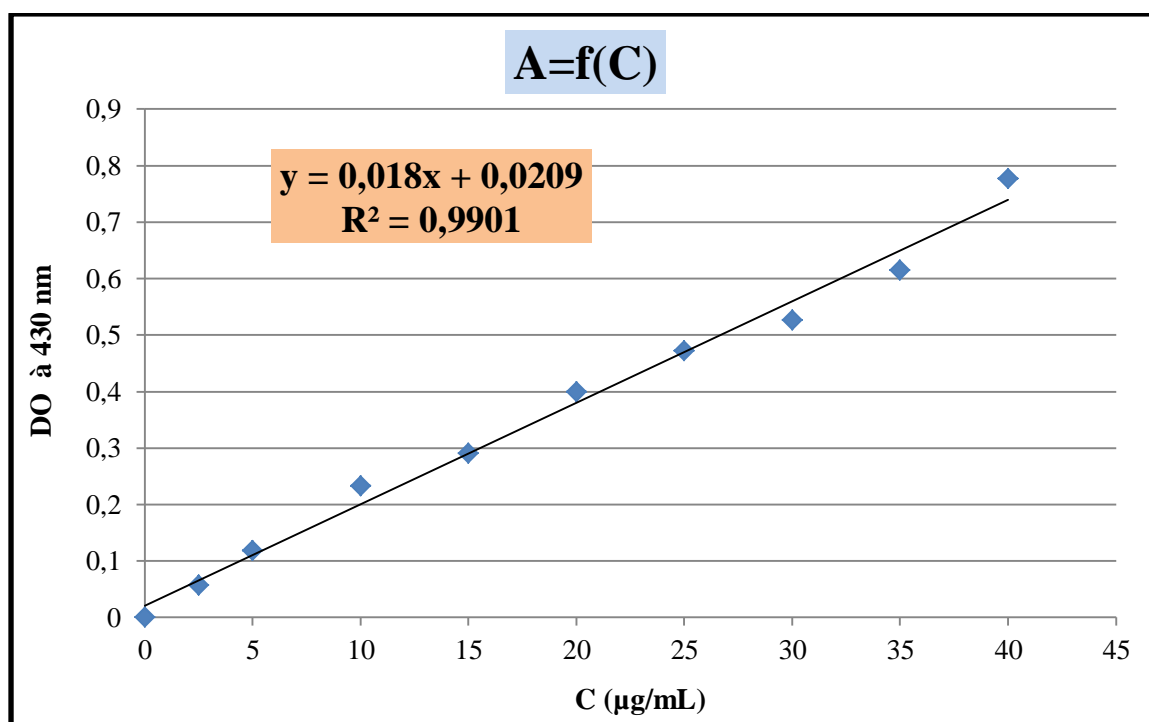
Annexe1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique:



Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de la catéchine



Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la quercétine :



Annexe 4 : Réactifs et réactions de caractérisations :

- ✓ Réactifs de wagner : on fait dissoudre 2 g de KI et 1.27 de I₂ dans 75 mL d'eau, la solution ainsi obtenue est ajoutée à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité blanc.
- ✓ Réactif de Mayer : on dissout 1.358 g de HgCl₂ dans 60 mL d'eau et 5 g de KI dans 10 mL d'eau, on mélange ensuite les deux solutions et on ajuste le volume total à 100 mL d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif une trouble plus un précipité blanc.
- ✓ Réactif d'amidon : une solution de 1.2 g d'iode dans 50 mL d'eau distillé contenant 2.5 g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie, 5 mL de la solution à tester avec 10 mL de la solution d'une solution de NaCl saturé jusqu'à l'ébullition.
- ✓ Réaction de liqueur de Fehling : Mélanger 5 mL de liqueur Fehling A avec 5 mL de liqueur Fehling B. Le caractère réducteur des aldoses ou des cétooses donne un précipité rouge brique.
- ✓ Réaction de Libermann-Burchardt : Mélanger 5 mL de la solution à tester avec 5 mL d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser reposer la solution 30 minutes à 21°C.
- ✓ Réaction de Bornträger : En milieu alcalin aqueux (NH₄OH), les anthracénosides donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

Annexe 5 :CPG et CPG/SM

Chromatographie en phase gazeuse : Les analyses chromatographiques ont été effectuées en utilisant un appareil CPG Perkin Elmer Clarus 600 (Walton, MA, USA) équipé d'un injecteur unique et deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). L'appareil a été utilisé pour l'échantillonnage simultané de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mx 0,22 mm, épaisseur film de 0,25 um) avec différentes phases stationnaires: Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et RTX cire (polyéthylène glycol). Le programme de température est: de 60 à 230 ° C par pat de 2 ° C/min, puis la température est maintenu stable à 230 ° C pendant 30 min. Le gaz vecteur est l'hydrogène (0,7 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenus à 280 ° C. Le mode d'injection a été mené avec un rapport de 1:80. Volume injecté: 0,1 µL.

Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse : L'huile essentielle a été analysée en utilisant un analyseur quadripôle Perkin Elmer TurboMass, directement couplé à un Perkin Elmer Autosystem XL équipé de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mm 0,22 mm, Epaisseur 0,25 um), Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Pour la CPG les mêmes conditions décrit ci-dessus ont été conservé. Pour la SM, la température de la source d'ions: 150 ° C; l'énergie d'ionisation: 70 eV; Les spectres de masse à ionisation électronique ont été acquises avec un intervalle de masse de 35 à 350 Da; balayage de masse: 1s. Volume d'huile injectée: 0,1 µl.