République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Spécialité : Pharmaco-toxicologie

Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Evaluation d'une activité anti-inflammatoire d'une plante médicinale

Présenté par :

BELAIDENE lila & BOUALI meriem

Soutenu le : **24 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mr BELKACEM N.	MAA	Président
Mme ABDERRAHIM-KHAMTACHE S.	MCB	Encadreur
Mme RAHMANI-BERBOUCHA M.	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

REMERCIEMENTS

En premier lieu, nous tenons à remercier DIEU tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

On adresse nos remerciements à nos parents qui nous ont toujours soutenues.

On tient également à remercier notre promotrice Mme Abderrahim-Khamtache S. et notre co-promotrice Mme Mezahem de nous avoir guidées, encouragés et pour leurs précieux conseils tout au long de notre travail.

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude aux membres de jury :
Mr Belkacem N. d'avoir accepté de présider ce jury.
Mme Rahmani-Berboucha M. d'avoir accepté d'examiner ce travail

On remercie profondément Mr HARFI pour tout le soutien qu'il nous a témoigné tout au long de cette étude, ses encouragements et ses conseils dans les moments difficiles.

Nous remercions aussi les ingénieurs de laboratoire en particulier Melle TABTI pour leur gentillesse et pour tous les services qu'elles nous ont rendus.

Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.
Un grand merci à tous

DEDICACE

On dédie ce modeste travail à nos chers parents et grand parents qui ont toujours été là pour nous, qui nous ont soutenus et encouragé tout le long de notre parcours

A nos frères, sœurs, cousins, cousines, tantes et oncles

A nos maris et leur famille

A nos chers amies et camarades : Asma, Dehia, Karima, Houda, Houria, Ibtissem, Souad

A toute la promotion M2 Pharmaco-toxicologie, pour tous les moments inoubliables qu'on a partagés durant notre parcours.

A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin

A tous ceux que nous avons oubliés

Liste des abréviations

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien.

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien.

$AlCl_3$: Trichlorure d'aluminium.

ANOVA : Analysis of variance.

AP-1 : Activator protein-1.

ATPase : Adénosine tri-phosphatase.

BSA : Bovine serum albumin.

CAM : Complexe d'attaque membranaire.

CMC : Carboxy-méthyl cellulose.

COX: Cyclooxygénase.

EAG : Equivalent d'acide gallique.

EAT : Equivalent d'acide tannique.

EC : Equivalent de la catéchine.

EQ : Equivalent de la quercétine.

$FeCl_3$: Chlorure ferrique.

GC : Glucocorticoïde.

HCl : Acide chlorhydrique.

HPLC-PDA : High performance liquid chromatography photodiode array.

HPLC-SM : High performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry.

$H_3PMo_{12}O_{40}$: Acide phosphomolybdique.

$H_3PW_{12}O_{40}$: Acide phosphotungstique.

IC50 : 50% inhibitory concentration.

IL : Interleukine.

MS : Matière sèche.

NF-κB : Nuclear factor-kappa B.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

Na_2CO_3 : Carbonate de sodium.

ONAB : Office national des aliments de bétails de Bejaïa.

SDS : Sodium dodecyl sulfate.

SEM : Standard error of mean.

TEA : Triéthanolamine.

TNF-α : Tumor necrosis factor.

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de la plante *Daphne gnidium* ……..….....…....6

Figure 2 : Localisation géographique de station de récolte de *Daphne gnidium* L…..……...13

Figure 3 : Photographie des différentes parties de la plante *Daphne gnidium* L……..….....14

Figure 4 : Photographies originales des souris de souche Balb/C. ……..……...14

Figure 5 : Photographie d'administration par gavage des différents traitements...…….....21

Figure 6 : Photographie d'injection sub-plantaire de la carragénine au niveau de la patte arrière gauche de la souris.…….....….21

Figure 7 : Photographie de l'œdème inflammatoire induit par la carragénine et du pléthysmomètre…….…...…….22

Figure 8 : Taux d'extraction des extraits bruts de différentes parties de *Daphne gnidium*….23

Figure 9 : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium* ……24

Figure 10 : Variation des absorbances de l'ovalbumine en fonction du temps pour différentes concentrations……..……..……..……..…26

Figure 11 : Variation des absorbances de l'ovalbumine en fonction du temps pour différentes concentrations d'éthanol……..……. …...……...27

Figure 12 : Variation des absorbances de l'ovalbumine incubé à différentes températures (ambiante, 60°C, 70°C et 80°C) en fonction du temps.…….. ……..….28

Figure 13 : Représentation graphique de taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations d'extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium*……..…….…….……..29

Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA à différentes concentrations d'extraits éthanoliques de *Daphne gnidium*.……...……..30

Figure 15 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème par les extrait éthanoliques de *Daphne gnidium* et le Diclofénac en fonction du temps…..……..……...……..32

Figure 16 : Corrélations entre les composés phénoliques et les IC50 de l'activité inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine (A) et de la BSA (B) par les extraits de *Daphne gnidium*……..34

Liste des tableaux

Tableau I : Rôles des médiateurs de l'inflammation……..…...……3

Tableau II : Plantes à activités anti-inflammatoires……..……5

Tableau III : Classification des polyphénols…….……..……11

Tableau IV: Evolution de l'œdème (mL) induit par la carragénine en fonction du temps.....31

Tableau V : IC50 de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*……..…..……...……...33

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction……..……..…….……1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Inflammation……..……..…..……..……..…..……..2

I.1.1. Principaux types d'inflammation...…..…….…….....…....2

I.1.2. Médiateurs de l'inflammation..…….……..….....3

I.1.3. Anti-inflammatoires.…….……....……...…..…4

I.1.3.1. Anti-inflammatoires de synthèses…….…….…....……....4

I.1.3.2. Effets indésirables des anti-inflammatoires.……..….…….……....5

I.1.3.3. Anti-inflammatoires naturels…….…….…...5

I.2. Présentation de la plante *Daphne gnidium*..…….....…6

I.2.1. Description botanique…….……..…7

I.2.2. Systématique……..7

I.2.3. Composition chimique de *Daphne gnidium*…….……..7

I.2.4. Utilisation thérapeutique de *Daphne gnidium*…….……...……....…...8

I.2.5. Toxicité de *Daphne gnidium*….…….…….……..…..……..8

I.2.6. Travaux antérieurs sur *Daphne gnidium*…...…….……..…9

I.3. Polyphénols.……10

I.3.1. Classification……..……...……..10

I.3.2. Propriétés biologiques des polyphénols….……..……12

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel…..……13

II.1.1. Préparation du matériel végétal……..…….…....13

II.1.2. Animaux de laboratoire…….……..14

II.2. Méthodes……14

II.2.1. Préparation de l'extrait brut éthanolique……..……..……..14

II.2.2. Dosage des composés phénoliques……..……15

II.2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*…..……..18

II.2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*……...……..20

II.3. Analyse statistique……...……..22

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Taux d'extraction……..……23
III.2. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins…….24
III.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*……...…..26
III.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*……..31
III.5. Corrélations entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité anti-inflammatoire *in vitro*……..……..33
Conclusion et perspectives……...……35
Références bibliographiques……..…..…….……36
Annexes
Glossaire
Résumé

Introduction

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Elle conduit à l'élimination d'éventuels pathogènes et au retour à l'hémostasie du tissu lésé. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation, aboutissant à certaines maladies chroniques telles que : l'athérosclérose, le cancer, la polyarthrite rhumatoïde et les affections respiratoires…etc.(Weill et Batteux, 2003 ; Calder et *al*., 2009).

Le traitement de l'inflammation fait appel à plusieurs thérapies parmi lesquelles, l'administration d'anti-inflammatoires de synthèses (stéroïdiens et non stéroïdiens) demeure la plus utilisée dans le monde (Ashley et *al*., 2012). Bien qu'ils soient efficaces, leur utilisation prolongée est également associée à de nombreux effets indésirables (Riseer et *al*., 2009).

Pour pallier à ces effets indésirables, il est nécessaire de développer de nouveaux agents anti-inflammatoires. Le recours aux plantes dites médicinales constitue une bonne alternative pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques tels que : les composés phénoliques, les saponosides, les coumarines, les alcaloïdes et les terpènes (Crozier et *al*., 2006).

Au cours de cette étude, on vise la recherche des composés phénoliques doués d'activité anti-inflammatoire. C'est dans ce contexte que, le choix de l'espèce a été porté sur *Daphne gnidium*, vu ses diverses applications en médecine traditionnelle, pour le traitement des leucémies, des tumeurs, du diabète, de l'inflammation et de la sclérose en plaque…etc. (Ziyyat et *al*., 1997 ; Harizi et *al*., 2011 ; Chaabane et *al*., 2014 ; Botineau, 2015).

Ce travail englobe deux aspects, le premier est basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques des extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium* ; le second aspect est consacré à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*, par l'inhibition de la dénaturation thermique des protéines, *in vivo*, sur le modèle d'inflammation aiguë chez les souris.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1. Inflammation

L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à diverses agressions qui peuvent être d'origines physique, chimique, biologique ou infectieuse (Espinosa et *al*., 2006). Elle se manifeste par quatre signes cardinaux à savoir : rougeur, gonflement, chaleur et douleur (Russo-Marie et *al*., 1998).

Elle mobilise le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et répare les lésions tissulaires (Calder et *al*., 2009).

I.1.1. Principaux types d'inflammation

L'inflammation est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire (Ashley et *al*., 2012) :

- **Inflammation aiguë**

Il s'agit d'une réponse immédiate de l'organisme à un agent toxinogène de courte durée et se caractérise par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. La guérison peut être spontanée ou après traitement, mais peut laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. L'inflammation aiguë peut être divisée en trois phases : phase vasculaire, phase cellulaire et phase résolutive (Ashley et *al*., 2012).

- **Inflammation chronique**

Elle apparait lorsque la lésion de l'inflammation persiste ou lorsqu'une inflammation récidive de façon répétée dans le même organe. Cette inflammation se manifeste de plusieurs semaines à plusieurs années ce qui est à l'origine de différentes maladies chroniques, telles que l'allergie, l'athérosclérose, le cancer, l'arthrite et les maladies auto-immunes (Ashley et *al*., 2012).

I.1.2. Médiateurs de l'inflammation

Le déclenchement de l'inflammation conduit à la libération de nombreux médiateurs chimiques, pro ou anti-inflammatoires, qui sont des substances protéiques plasmatiques ou cellulaires (Tableau I) (Henrotin et *al*., 2001).

Tableau I : Rôles des médiateurs de l'inflammation (Henrotin et *al*., 2001 ; Weill et Batteux, 2003).

Médiateurs	Rôles dans l'inflammation
Cellulaires	
Système de coagulation	Synthèse de thromboxane A2 qui assure une vasoconstriction efficace et l'activation du facteur XII, déclenche la coagulation et aboutit à la formation des fibrines.
Système du complément	Intervient dans la défense non spécifique contre les agents infectieux. Il comprend trois voies d'activation, aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire à action cytolytique (CAM).
Système des kinines (bradykinines)	Assurent la vasodilatation, la contraction des muscles lisses, l'augmentation de la perméabilité capillaire et la douleur.
Plasmatiques	
Amines vaso actives (histamine et sérotonine)	Assurent la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et induisent l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Médiateurs lipidiques	Jouent un rôle essentiel dans la perméabilité vasculaire, l'attraction et l'activation des polynucléaires.
Cytokines et Chimiokines	Les cytokines agissent sur des récepteurs membranaires, elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNFα) ou anti-inflammatoires (IL-10). Les chimiokines permettent le recrutement des monocytes et des polynucléaires pendant l'inflammation.
Radicaux libres	Peroxydation lipidique des membranes des macrophages, provoquant la synthèse des cytokines et des chimiokines.
Métalloprotéases	Responsables de la dégradation des tissus de l'organe lésé et facilitent la migration des cellules immunitaires vers le site inflammatoire.

I.1.3. Anti-inflammatoires

I.1.3.1. Anti-inflammatoires de synthèses

On distingue deux classes principales d'anti-inflammatoires, selon le mode d'action et l'origine de leurs biosynthèses :

- **Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou glucocorticoïdes sont des dérivés du cortisol, naturellement secrétés par les glandes surrénales. Ils sont de puissants agents anti-inflammatoires doués également de propriétés immunomodulatrices et antiallergiques (Barnes, 1998 ; Dangoumau et *al.*, 2006).

Les glucocorticoïdes (GC) traversent librement les membranes cellulaires, où ils se fixent sur des récepteurs nucléaires spécifiques aux stéroïdes. Ce complexe bloque la transcription des gènes cibles (NF-kB, AP-1…), en empêchant l'activation de la phospholipase A2, ainsi que la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6, TNF-α ou interferon-γ (Barnes, 1998 ; Dangoumau et *al.*, 2006).

Il existe plusieurs variétés d'anti-inflammatoires stéroïdiens : le prednisone, le méthyl-prednisolone, le prednisolone, le dexaméthasone, le bêtaméthasone…etc. Chaque classe d'anti-inflammatoires se distingue par la durée de leur effet (courte, intermédiaire ou prolongée) (Hawkey, 1999).

- **Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils agissent sur la phase initiale de l'inflammation, en inhibant les deux isoformes de la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), diminuant ainsi la synthèse des prostaglandines E2 et du thromboxane A2 (Jouzeau et *al.*, 2004).

Les AINS peuvent être classés en plusieurs groupes selon leur sélectivité ou non pour les COX (Lipsky et *al.*, 1998 ; Jouzeau et *al.*, 2004) :

- ✓ Les anti-COX non sélectifs (la plupart des AINS et l'aspirine à dose anti-inflammatoire) ;
- ✓ Les anti-COX 1 préférentiels (indométacine, piroxicam et l'aspirine à faible dose) ;
- ✓ Les anti-COX 2 préférentiels (essentiellement méloxicam) qui perdent leur sélectivité s'ils sont utilisés au-delà des doses thérapeutiques ;
- ✓ Les anti-COX 2 sélectifs appelés « coxibs » (célécoxib, parécoxib, étoricoxib).

I.1.3.2. Effets indésirables des anti-inflammatoires

De par leur pharmaco-activité, les anti-inflammatoires sont dotés d'effets indésirables importants. Ceci explique que pour une utilisation prolongée et une posologie croissante les AINS sont associés à divers troubles, tels que l'ulcération et le saignement gastro-intestinal, et le dysfonctionnement plaquettaire (Martin et Desmeules, 2001 ; Risser et *al.*, 2009). De même les corticostéroïdes présentent des effets indésirables graves, tels que l'hypertension, l'hyperglycémie, une faiblesse musculaire, une susceptibilité accrue à l'infection, des troubles psychiatriques, l'arrêt de croissance...etc. (Nicolaides et *al*., 2010).

I.1.3.3. Anti-inflammatoires naturels

Tous ces effets indésirables des anti-inflammatoires de synthèse font qu'un retour à la pharmacothérapie traditionnelle est très souhaitable. En effet de nombreuses plantes présentent un potentiel anti-inflammatoire via, notamment leurs composés polyphénoliques (Crozier et *al.*, 2006). Le Tableau II montre les effets anti-inflammatoires de quelques plantes médicinales.

Tableau II : Plantes à activités anti-inflammatoires.

Plantes	Parties utilisées	Activités	Utilisation	Références
Curcuma zedoaria (Zingiberaceae)	rhizome	anti-nociceptive et anti-inflammatoire	la douleur, les plaies et les affections cutanées.	Ullah et *al*., 2014.
Phrygilanthus acutifolius (Loranthaceae)	fleurs	anti-inflammatoire, anti-nociceptive et antipyrétique.	infections respiratoires, antibactérien	Daud et *al*., 2009
Saba senegalensis (Apocynaceae)	tiges feuillées	anti-inflammatoire analgésique et antioxydante	maladies infectieuses, l'inflammation et les maux de têtes.	Yougbaré-Ziébrou et *al*., 2015.
Withania somnifera (Solanaceae)	racines	anti-inflammatoire	l'asthme, les ulcères, l'insomnie et le vieillissement cérébral.	Chandra et *al*., 2012.

Dans le but de rechercher des substances naturelles à effet anti-inflammatoire dans ce cadre, *Daphne gnidium* est parmi les plantes médicinales connue pour ses diverses applications en médecine traditionnelle, fera l'objet de notre étude.

I.2. Présentation de la plante *Daphne gnidium*

Les Daphnés sont des arbrisseaux ou plantes herbacées annuelles de la famille des Thyméleacées, appartenant au genre *«Daphne »*, qui renferme environ 70 espèces, connues en Australie, en Asie, en Europe et en Afrique du nord. Parmi les espèces les plus répandues de ce genre : *Daphne mezereum* (L) (Bois gentil), *Daphne laureola* (L) (La lauréole) et *Daphne gnidium* (L) (Le garou) (Figure 1) (Reynaud, 2002).

Daphne est le nom de la nymphe Daphné métamorphosée en laurier (Mythologie grecque). Le nom *gnidium* est une référence à Cnide, ville de Grèce antique. Cette espèce est très connue pour son utilisation en médecine traditionnelle en Chine et dans les régions tropicales d'Afrique pour le traitement de diverses affections (Botineau, 2015).

Figure 1 : Photographie de la plante *Daphne gnidium L*. (Sovrlić et Manojlović, 2016).

I.2.1. Description botanique

C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, existe dans tout le Tell de l'Algérie, de 60 cm à 1,5 m de hauteur ou plus, se caractérise par des racines longues, grosses, dures, rougeâtres à l'extérieur et blanches à l'intérieur (Quezel et Santa, 1963).

Les tiges pouvant atteindre 70 cm à un mètre de hauteur, sont droites, divisées dès leur base en rameaux souples, minces, très feuillés, élancés et d'une couleur brune cendrée (Boucher et Doux, 2011).

Des feuilles sont coriaces, persistantes, lancéolées-linéaires, larges de 5-7 mm au plus, cuspides et très denses. Les inflorescences terminales sont en panicule rameuse longue de 5–10 cm, entièrement blanche tomenteuse. Les fleurs sont blanches, caduques, et odorantes (Quezel et Santa, 1963 ; Boucher et Doux, 2011 ; Miara et *al*., 2013).

Les fruits sont des baies rouges à maturité (Boucher et Doux, 2011).

I.2.2. Systématique (Quezel et Santa, 1963 ; Halda, 1998 ; Sovrlić et Manojlović, 2016).

Règne : *Plantae* (plantes)
Sous règne : *Tracheobionta* (plantes vasculaires)
Embranchement : *Magnoliophyta* (plantes à graines)
Sous- Embranchement : Angiospermes
Classe : *Magnoliopsida* (dicotylédones)
Sous- Classe : *Rosidae*
Ordre : *Myrtales*
Famille : *Thymelaeaceae*
Genre : *Daphne*
Espèce : *Daphne gnidium L*
Nom français : Daphné Garou, Thymèle, Sain-bois, Daphné Paniculé (Leclerc, 1999).
Nom anglais : Flax-leaved Daphne (Miara et *al*., 2013).
Nom berbère : Lazzaz, inif, methnane (Bnouham et *al*., 2002).

I.2.3. Composition chimique de *Daphne gnidium*

Des recherches phytochimiques effectuées sur les différentes parties de la plante *Daphne gnidium* ont permis de mettre en évidence la présence d'une grande variété des métabolites secondaires à savoir : les flavonoïdes, les tanins, les coumarines et les terpènes (Kupchan et *al*., 1976; Deiana et *al*., 2003) (Annexe 1).

La composition chimique des feuilles de *Daphne gnidium,* effectuée par HPLC-PDA est caractérisée par la présence des coumarines (daphnétine, daphnine, acétylumbelliférone, daphnorétine) et des flavonoïdes (apigénine, lutéoline, quercétine, orientine, isoorientine, lutéoline-3-7-di-O-glucoside, apigénine-7-O-glucoside, genkwanine, 5-O-β-D-primeverosyl-genkwanine, 2,5,7,4 tétra-hydroxy-isoflavanol et l'α-tocophérol) (Deiana et *al*., 2003 ; Nowik, 2005).

Couplan et Styner, (2013) ont rapporté que les différentes espèces de *Daphne* renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines).

Une étude réalisée sur les feuilles et tiges de *Daphne gnidium* a permis d'identifier par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-SM) un certain nombre de composés diterpèniques : daphnetoxine, gnidicine, gniditrine et excoecariatoxine (Vidal et *al*., 2012).

I.2.4. Utilisation thérapeutique de *Daphne gnidium*

Daphne gnidium est largement utilisée en médecine traditionnelle comme purgatif, diurétique, antiseptique et cicatrisante ainsi que dans le traitement de la syphilis et des affections dartreuses (dermatoses squameuses) (Bruneton, 1987 ; Bellakhdar et *al*., 1991).

L'écorce est utilisée sous forme de pommade car elle possède des propriétés vésicantes et épispastiques, tandis que les racines sont indiquées pour soigner les maux de dents et contre l'hépatite (Bellakhdar et *al*., 1991 ; Borris et *al*., 1998 ; Nowik, 2005).

Au Maroc, les feuilles et les écorces sont utilisées comme composés hypoglycémiants et pour le traitement des maladies de la peau surtout d'origine vénériennes, dans les avortements, dans les teintures pour textiles et les cheveux et dans les soins capillaires (Bruneton, 1987 ; Bellakhdar et *al*., 1991 ; Ziyyat et *al*., 1997 ; Nowik, 2005).

En phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs, contre la sclérose en plaque et le sida (Vidal et *al*., 2012 ; Chaabane et *al*., 2014 ; Botineau, 2015).

I.2.5. Toxicité de *Daphne gnidium*

Les différentes parties de la plante sont considérées toxiques, plus particulièrement les fruits et les écorces. Cette toxicité est dûe à la présence d'une résine vésicante, la mézéréine, associée à un hétéroside âcre, la daphnine, qui donne par hydrolyse la dihydroxycoumarine (Reynaud, 2002 ; Boucher et Doux, 2011).

L'écorce des tiges et des racines est vésicante et peut provoquer une rubéfaction intense par frottement sur la peau (Borris, 1988 ; Botineau, 2015). L'ingestion des fruits déclenche une ulcération du tube digestif avec nausées, spasmes violents, vomissement, difficulté de déglutition, diarrhée et convulsions, une dose de 12 baies pourrait être mortelle chez l'adulte (Reynaud, 2002).

I.2.6. Travaux antérieurs sur *Daphne gnidium*

De nombreuses recherches effectuées sur les différentes parties de *Daphne gnidium* L. soulignent que cette plante possède un nombre important de propriétés pharmacologiques (Sovrlić et Manojlović, 2016) :

- **Activité antimicrobienne et antivirale**

L'activité antimicrobienne contre *Bacillus lentus* et *Escherichia coli* est dûe à la présence des flavonoïdes et des coumarines dans les différentes parties de la plante (Cottiglia et *al*., 2001).

Une activité antivirale a été mise en évidence, exercée par des diterpènes des parties aériennes de *Daphne gnidium* (daphnetoxine, gnidicine, gniditrine et excoecariatoxine) (Vidal et *al*., 2012).

- **Activité anti-oxydante**

La richesse des différentes parties de *Daphne gnidium* en polyphénols et en flavonoïdes lui confère une activité anti-oxydante testée par l' inhibition de la peroxydation lipidique, *in vitro*, par des systèmes d'auto-oxydation et de l'oxydation l'acide linoléique par l'intermédiaire du fer ou de 1'EDTA (Deiana et *al.*, 2003).

Une étude récente, réalisée par Chaabane et ses collaborateurs en 2015, a montré que l'extrait de feuilles de *Daphne gnidium*, testé *in vivo*, présente des effets antigénotoxiques avec des activités anti-oxydantes et des effets neuroprotecteurs élevés par l'inhibition de la buturyl-cholinestérase.

- **Activité anti-inflammatoire**

L'extrait de feuilles de *Daphne gnidium*, à une concentration de 100 µg/mL, a démontré une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de la prolifération des macrophages et des lymphocytes, *in vitro*. Cette activité anti-inflammatoire a été examinée en mesurant la sécrétion des molécules pro-inflammatoires : l'Il-1β, NO et TNF-α (Harizi et *al*., 2011).

- **Activité antifongique**

L'étude réalisée par Mohammedi et Atik, (2013) a montré qu'à la concentration de 10 µg/mL, l'extrait de feuilles de *Daphne gnidium* exerce une inhibition de 94% sur la synthèse de l'aflatoxine B1 d'*Aspergillus flavus.*

- **Activité anti-leucémique**

Les extraits de feuilles de *Daphne gnidium* ont montré une activité anti-leucémique marquée en perturbant le cycle cellulaire de K562 et par l'inhibition de la P-glycoprotéine humaine dans la lignée cellulaire K562 / R7 (Chaabane et *al*., 2014).

- **Activité anti-cancéreuse**

Chaouki et ses collaborateurs, (2014**)** ont rapporté que l'extrait d'acétate d'éthyle des racines de *Daphne gnidium* exerce un effet apoptotique et antiprolifératif sur les cellules du cancer du poumon et de l'hépatome *in vitro*.

De plus, l'évaluation de l'activité anticancéreuse des extraits de feuilles de *Daphne gnidium* a laissé voir une inhibition de la prolifération des lignées cellulaires de mélanome (B16 F0 et B16 F10), à une concentration de 100 µg/mL (Chaabane et *al*., 2013).

I.3. Polyphénols

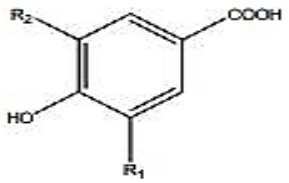
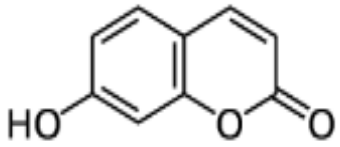
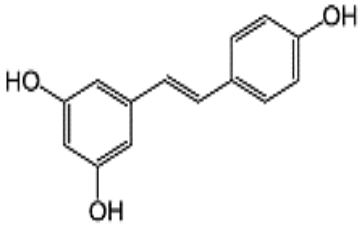
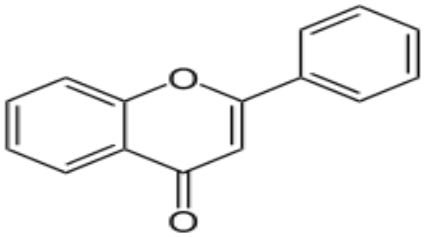
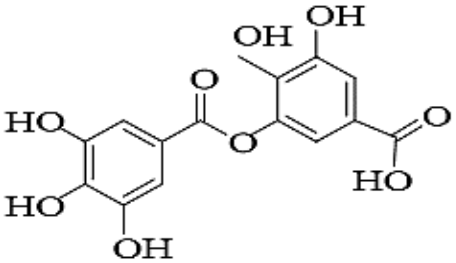
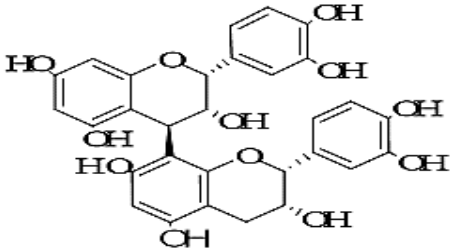
Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (Hennebelle et *al*., 2004). Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle benzoïque portant un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (Crozier et *al*., 2006).

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) à des proportions variables et ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la différenciation, la germination des graines ou la maturation des fruits (Crozier et *al*., 2006 ; Kabera et *al*., 2014).

I.3.1. Classification

Selon (Crozier et *al*., 2006) les polyphénols peuvent être subdivisés en plusieurs groupes (Tableau III) :

Tableau III : Classification des polyphénols.

Classification	Exemple	Structure de base
Acides phénoliques	Acide gallique Acide caféique Acide vannilique	
Coumarines	Esculitine Scopolétine	
Stilbènes	Resveratrol	
Flavonoïdes	Quercétine Apigénine Catéchine	
Tanins hydrolysables	Gallotanins et Ellagitanins	
Tanins condensés	Tanins catéchique	

I.3.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont des molécules biologiquement actives, largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires (Hanasaki et *al.*, 1994 ; Gomez-Caravaca et *al.*, 2006). Ils possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, antiprolifératives et anti-apoptotiques (Crozier et *al.*, 2006).

Ces propriétés pharmacologiques sont liées au fait qu'ils peuvent moduler l'activité de nombreuses protéines intracellulaires (les protéines kinases, les phospholipases, les ATPases l'adénylatecyclase, les cyclo-oxygénases, le cytochrome P450) (Cole et *al.*, 2005 ; Rasmussen et *al.*, 2005).

L'objectif de cette étude est basé sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques des extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium* ainsi que, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro,* par l'inhibition de la dénaturation thermique des protéines et *in vivo,* par le suivi de l'activité anti-œdémateuse sur le modèle animal.

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II.1.Matériel

Les réactifs utilisés au cours de cette étude ainsi que les appareils ont été rapportés en Annexe 2 et 3 respectivement.

II.1.1. Préparation du matériel végétal

La cueillette de *Daphne gnidium* a été réalisée dans la région de Kendira de la ville de Bejaia (36°31’58’’N ; 5°3’46’’E ; 945 m d’altitude) (Google Earth V.7.1.2.2018) (Figure 2), le matin, loin de tout impact de pollution, durant le mois de juillet 2017. Son identification a été effectuée par Mr BOUADAM au niveau de laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique de la Faculté des Science de la Nature et de la Vie, de l’Université A. Mira de Bejaia et en utilisant la flore des plantes Algériennes (Quezel et Santa, 1963).

Figure 2 : Localisation géographique de la station de récolte de *Daphne gnidium* L. (Google map).

Après la récolte, les différentes parties de la plante [feuilles (A), tiges (B) et racines (C)] (Figure 3), ont été séparées, nettoyées avec de l’eau puis séchées à 40°C dans l’étuve pendant 10 jours. Chaque organe de la plante a été broyé séparément à l’aide d’un broyeur électrique puis tamisé, jusqu’à l’obtention d’une poudre fine d’un diamètre inférieur à 125 µm. Les poudres obtenues ont été conservées dans des flacons en verre bien fermés, jusqu’à une utilisation ultérieure.

Figure 3 : Photographies de différentes parties de la plante *Daphne gnidium* L (originales).

II.1.2. Animaux de laboratoire

L'étude, *in vivo*, a été réalisée sur des souris mâles et femelles Balb/C (Figure 4), dont le poids varie entre 25 et 30 g, procurées auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Ces souris ont été élevées dans l'Animalerie de l'Université A. Mira de Bejaia, à une température environ 25 °C, soumises à un cycle de lumière/obscurité de 12/12H. Les animaux ont été hébergés dans des cages de polypropylène où ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard (ONAB EL-KSEUR BEJAIA). Les souris ont bénéficié d'une période d'adaptation de 15 jours avant leur utilisation.

Figure 4 : Photographies des souris de souche Balb/C (originales).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation de l'extrait brut éthanolique

L'extraction des composés phénoliques de la poudre des feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium* a été réalisée par macération à l'éthanol 70%, à une température ambiante conformément à la méthode décrite par Benhammou et *al.*, (2008). 100 g de poudre végétale ont été macérées dans un volume de 1L d'éthanol sous agitation douce pendant 72h, puis laisser sédimenter jusqu'à la séparation des deux phases, ensuite le surnageant a été filtré en utilisant

le papier Wattman. Cette étape est répétée trois fois afin d'extraire le maximum de composés phénoliques. L'évaporation du solvant organique a été réalisée sous hotte chimique à température ambiante pendant une semaine. L'extrait sec obtenu a été ensuite complètement séché à l'étuve (40°C) pendant 24H.

- **Expression du taux d'extraction**

Le taux d'extraction exprimé en (%) a été déterminé selon la formule suivante :

Taux d'extraction (%) = [P1 / P0] *100

P1 : poids de l'extrait sec exprimé en gramme.

P0 : poids initial de poudre végétale exprimé en gramme.

II.2.2. Dosage des composés phénoliques

II.2.2.1. Dosage des phénols totaux

- **Principe**

La quantification des composés phénoliques totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), oxyde les composés phénoliques; les oxydes métalliques produits ont une couleur bleue, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Ribéreau-Gayon et *al.*, 1982). Cette coloration possède une absorption maximale à 765 nm (Rayan, 2013).

- **Mode opératoire**

Un volume de 200 µL de l'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) solubilisé dans l'éthanol (0,2 mg/mL), a été mélangé avec 1,5 mL de Folin-Ciocalteu (10%). Après 5 minutes d'incubation à l'obscurité, 1,5 mL de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 7,5%) ont été ajoutée. Après deux heures d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 765 nm (Rayan, 2013).

Un blanc a été préparé dans les mêmes conditions précédentes en remplaçant l'extrait végétal par l'éthanol.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 1g de matière sèche (MS), en se référant à une gamme d'étalon obtenue avec l'acide gallique (Annexe 5).

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

- **Principe**

La teneur en flavonoïdes est évaluée selon la méthode colorimétrique de Quettier-Deleu et *al.*, (2000), en utilisant comme réactif spécifique le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La présence du groupement hydroxyle (OH) libre en position C_3 ou C_5 dans les flavonoïdes provoque la formation de complexes flavonoïdes-aluminium, qui donne par chélation de l'ion Al^{+3}, une coloration jaunâtre mesurable à 448 nm. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait (Quettier-Deleu et *al.*, 2000).

- **Mode opératoire**

Un volume de 1 mL d'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) solubilisé dans l'éthanol (1 mg/mL) a été additionné à 1 mL d'$AlCl_3$ à 2%. Après 10 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 448 nm (Djeridane et *al*., 2006). Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions précédentes en remplaçant l'extrait par l'éthanol.

Les résultats obtenus ont été exprimés en mg équivalent de quercétine par 1g de matière sèche, en se référant à une courbe d'étalonnage de la quercétine (Annexe 5).

II.2.2.3. Dosage des tanins

- **Dosage des tanins totaux**

- **Principe**

Les tanins ont la capacité de se complexer avec les protéines et de les précipiter. Après formation du complexe, la protéine est dénaturée pour que les tanins soient libérés, leur absorbance est mesuré à 510 nm (Hagerman et Butler, 1978). Cette méthode est basée sur la précipitation de la protéine BSA.

- **Mode opératoire**

500 µL d'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) solubilisé dans l'éthanol (1 mg/mL) ont été mélangés avec 1 mL de solution d'albumine sérique bovine (BSA) (1 mg/mL) dissoute dans le tampon A [Acide acétique à 0,2 M ; Chlorure de sodium (NaCl à 0,17 M) ; pH = 4,9] et laisser réagir pendant 24h à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé (3000 rpm / 15 min). Le culot récupéré est suspendu dans un mélange contenant 2 mL de la solution [Sodium dodesyl sulfate/ Triéthanolamine (SDS /TEA)] et 500 µL de solution Chlorure ferrique ($FeCl_3$ à 0,01

M) dissout dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl à 0,01 M). L'absorbance a été mesuré à 510 nm au bout de 15 min d'incubation (Hagerman et Butler, 1978).

La quantité des tanins est exprimée en mg équivalent d'acide tannique par 1g de matière sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique (Annexe 5) réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits à tester.

La préparation des solutions est indiquée dans l'annexe 4.

- **Dosage des tanins condensés**

- **Principe**

L'estimation de la teneur en tannins condensés a été réalisée selon la méthode décrite par Deshpande et *al.*, (1986). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés dans un milieu acide pour produire un complexe rouge mesuré à 500 nm (Hagerman et Butler, 1978).

- **Mode opératoire**

Un volume de 1 mL d'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) solubilisé dans l'éthanol (1 mg/1 mL) a été mélangé avec 5 mL de vanilline (5,8%) / HCl (0,01M), Après homogénéisation et incubation pendant 20 min à 30°C, l'absorbance a été mesurée à 500 nm (Hagerman et Butler, 1978).

La teneur en tanins condensés a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec la catéchine (Annexe 5). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par 1g de matière sèche (mg EC/ 1g Ms).

- **Dosage des tanins hydrolysables**

- **Principe**

Le dosage des tanins hydrolysables a été réalisé selon la méthode décrite par Mole et Waterman, (1987) en utilisant comme réactif le chlorure ferrique. Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique en donnant une coloration bleue mesurée par spectrophotométrie (Mamadou, 2002).

- **Mode opératoire**

1mL d'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) solubilisé dans l'éthanol a été mélangé avec 3,5 mL de la solution ($FeCl_3$ à 0,1% / HCl à 0,01 M), après homogénéisation et incubation pendant 15 min, l'absorbance a été mesurée à 660 nm (Mamadou, 2002).

La teneur en tanins hydrolysables a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide tannique (Annexe 5). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique par 1g de matière sèche (mg EAT/1g Ms).

II.2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*

L'étude de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro,* des extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium* a été effectuée selon deux méthodes basées sur la dénaturation thermique des protéines : l'ovalbumine extraite du blanc d'œuf et celle de l'albumine bovine sérique (BSA).

II.2.3.1. Extraction de l'ovalbumine

L'ovalbumine a été extraite selon la méthode décrite par Datta et *al.,* (2009), à partir du blanc d'œuf**,** ensuite, le blanc d'œuf a été récupéré dans un bécher mis dans un bain de glace et mélangé à 50 mL du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,6) puis homogénéisé sous agitation magnétique pendant 5 mn, l'homogénat obtenu a été centrifugé à 3000 rpm (4°C) pendant 15 min, le surnageant obtenu a été filtré à travers une bande de gaze pour éliminer les globulines précipitées. Enfin le filtrat obtenu, a été partagé dans des aliquotes de volume de 2 mL puis stockés à -20°C.

Après l'extraction, des tests ont été effectués afin d'évaluer l'effet de la concentration, la température et d'éthanol sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine (Adrach Verma et *al*., 2011).

- **Effet de la concentration d'ovalbumine**

5 mL d'extrait d'ovalbumine à différentes dilutions (1/100, 1/75, 1/50 et 1/25), ont été mélangés avec 250 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 6,6), incubé dans un bain marie à 70°C ± 2 pendant 60 min, l'absorbance a été mesurée à 660 nm avant (t = 0) et après incubation (t = 60 min).

- **Effet de l'éthanol**

5 mL d'extrait d'ovalbumine (1/25) ont été mélangés avec 250 µL d'éthanol à différentes dilutions (0% ; 0,5% ; 1% ; 1,5% ; 2%). Après incubation à 70°C pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 660 nm.

- **Effet de la température**

5 mL d'extrait d'ovalbumine (1/25) ont été mélangés avec 250 µL de tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,6) à différentes températures (ambiante, 60, 70 et 80°C) pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 660 nm.

II.2.3.2. Mesure de l'activité anti-dénaturante des extraits de *Daphne gnidium*

- **Méthode d'ovalbumine**

L'effet inhibiteur, *in vitro*, des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* a été déterminé en utilisant la méthode de dénaturation protéique décrite par Chandra et *al*., (2012) avec certaines modifications.

400 µL d'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) de *Daphne gnidium* solubilisés dans le tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,6) (1 mg/mL), à différentes concentrations (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL et 1000 µg/mL) ont été mélangés avec 7,6 mL de la solution d'ovalbumine (1/25). Le mélange a été incubé dans un bain marie à 70°C ± 2 pendant 30 min. Les absorbances ont été mesurées à 660 nm.

Le contrôle a été préparé dans les mêmes conditions précédentes en remplaçant l'extrait par le tampon phosphate.

- **Méthode de la BSA**

Un volume de 1 mL de la solution d'albumine bovine sérique à 2%, préparé dans du tampon phosphate (0,1 M ; pH = 6,6), a été mélangé avec 1 mL de solution d'extrait végétal (feuilles, tiges et racines) de *Daphne gnidium* à différentes concentrations (125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL et 1000 µg/mL) (Rehman et *al*., 2015).

Le contrôle a été préparé en remplaçant l'extrait par de le tampon phosphate et en et en utilisant comme standard le Diclofénac de sodium. Les tubes ont été incubés pendant 20 min à température ambiante, puis chauffés à 70°C pendant 5 min, l'absorbance a été mesurée à 660 nm (Rehman et *al*., 2015).

Expression des résultats

Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique est exprimé par l'expression suivante (Rehman et *al*., 2015) :

Taux d'inhibition (%) = 100 - [(ΔAbsC - ΔAbsE / ΔAbsC)*100]

ΔAbsC: Variation de l'absorbance en absence d'extrait de *Daphne gnidium* (contrôle). **ΔAbsE:** Variation de l'absorbance en présence d'extrait de *Daphne gnidium* (essai).

II.2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vivo*

L'activité anti-inflammatoire de *Daphne gnidium* a été réalisée selon la méthode décrite par Winter et *al*., (1962), selon laquelle l'inflammation aiguë est induite par injection de la carragénine (1%) au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des souris. L'œdème causé par cet agent sera traduit en volume et mesuré par le Pléthysmomètre ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire.

- **Protocole expérimental**

Le test a été réalisé sur un effectif de 36 souris (femelles et mâles) pesant 25 ± 5g réparties en 6 lots selon les deux extraits (tige, feuille). Les souris ont été mises à jeun 16 heures avant l'expérience et privés d'eau pendant la période expérimentale pour réduire la variabilité de la réponse œdémateuse. Ensuite, les différents traitements ont été administrés par gavage à raison de 10 mL/Kg, par voie orale (Figure 5), une heure avant l'injection de la carragénine.

Lot 1 (témoin) : A reçu une solution de Carboxyméthyl cellulose (CMC 0,8%) et de l'eau physiologique.

Lot 2 (contrôle) : A reçu un anti-inflammatoire de référence le Diclofénac à la dose de 50 mg/Kg dissous dans NaCl (0,9%).

Lots 3 et 4 (traités) : Ont reçus l'extrait éthanolique de feuilles de *Daphne gnidium* à des doses de 50 et 100 mg/Kg de poids corporel respectivement, dissous dans du CMC (0,8%).

Lots 5 et 6 (traités) : Ont reçus l'extrait éthanolique de tiges de *Daphne gnidium* à des doses de 50 et 100 mg/Kg de poids corporel respectivement, dissous dans du CMC (0,8%).

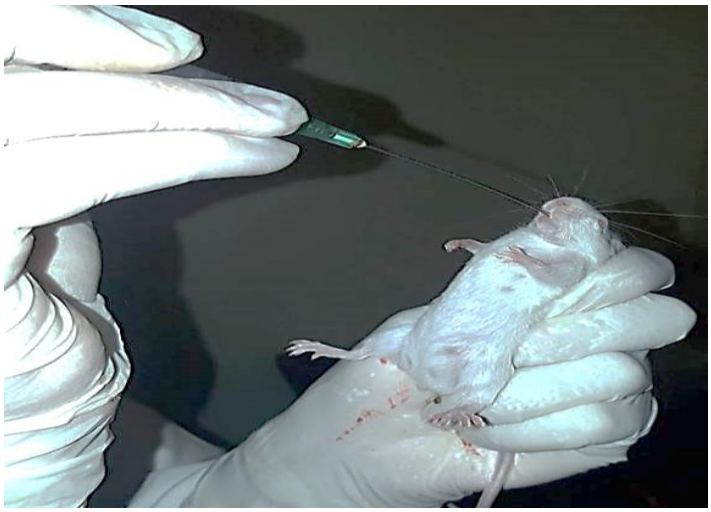


Figure 5 : Photographie d'administration par gavage des différents traitements (originale).

- **Injection de la carragénine**

Une heure après le gavage, chaque animal reçoit par injection sub-plantaire dans la patte gauche 0,25 mL d'une suspension de carragénine à 1% dissous dans l'eau physiologique (Figure 6).

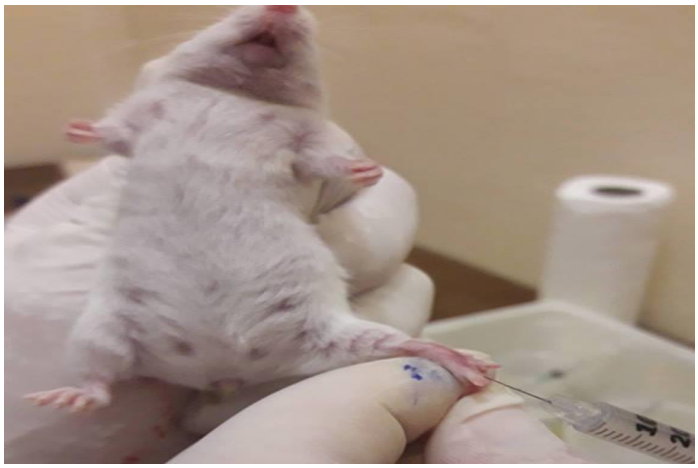


Figure 6 : Photographie d'injection sub-plantaire de la carragénine au niveau de la patte arrière gauche de la souris (originale).

- **Mesure de l'œdème**

L'évolution de l'œdème a été déterminée par mesure du volume de la patte gauche des souris (mL) chaque heure jusqu'à 6 heures par immersion dans le liquide contenu dans la cellule du pléthysmomètre avant et après induction de la carragénine. L'immersion de la patte provoque le déplacement du volume qui correspond au volume de la patte de la souris (Figure 7). Ce volume est traduit et enregistré grâce à la partie électronique du pléthysmomètre.

Figure 7 : Photographies de l'œdème inflammatoire induit par la carragénine et du pléthysmomètre (originales).

- **Calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème**

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Daud et *al.*, 2006) :

$$\% \text{ d'inhibition} = [[(V_n - V_0)_{\text{témoin}} - (V_n - V_0)_{\text{traité}})] / (V_n - V_0)_{\text{témoin}}] * 100$$

V_0: volume mesuré avant l'injection de la carragénine.

V_n: volume mesuré aux heures de relevé n =1 à 6 heures après l'injection de la carragénine.

II.3. Analyse statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous forme : moyenne ± écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Statistica. Les différences ont été considérées comme étant significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel Origin 8. L'analyse des données des régressions linéaires et des régressions non linéaires a été réalisée par l'utilisation du programme : Excel® (Microsoft Excel 2013).

Chapitre III :

Résultats et Discussion

III.1. Taux d'extraction

La méthode d'extraction par macération sous agitation à température ambiante ainsi que l'épuisement d'extrait à pression réduite permet d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leurs dénaturations ou modifications probables dûes aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Lee et *al*., 2003).

L'extraction des polyphénols totaux a été effectuée en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Le choix de solvant est basé sur sa capacité à extraire le maximum des composés bioactifs notamment les polyphénols et possède un avantage d'être moins toxique que le méthanol (Lamiable et *al*., 2004).

Le calcul des rendements (Figure 8) par rapport au poids sec de la poudre végétale a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Daphne gnidium* représente un pourcentage élevé de 39,3% par rapport aux tiges et racines qui sont de 32,56% et 22,79%, respectivement.

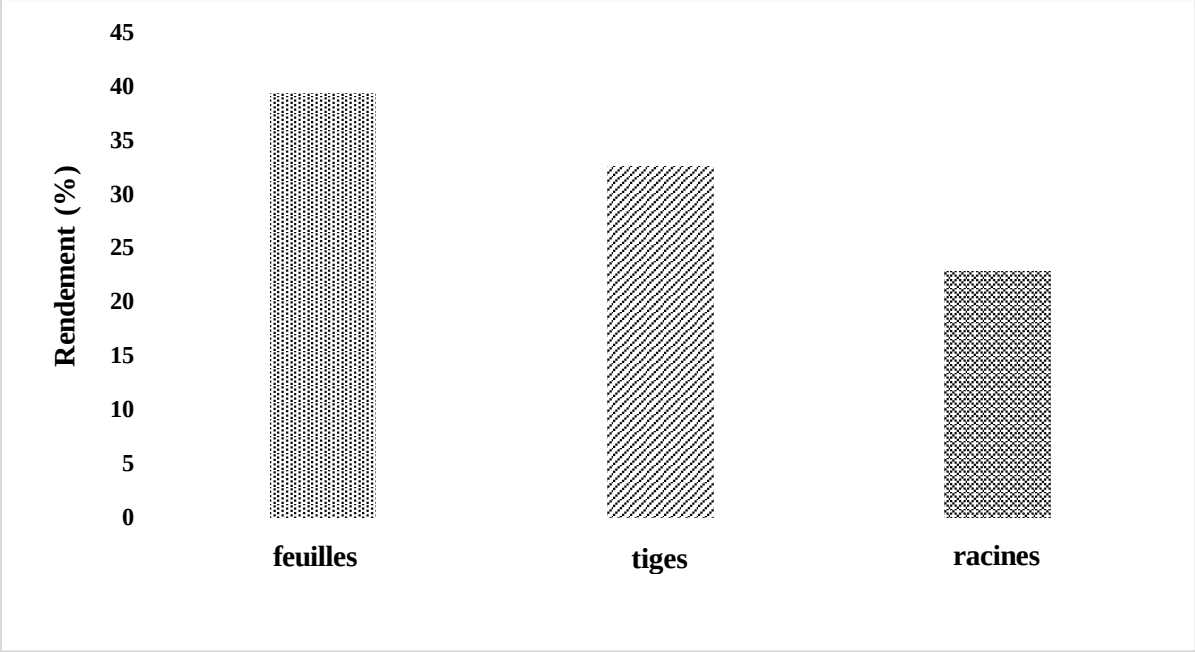


Figure 8 : Taux d'extraction des extraits bruts de différentes parties de *Daphne gnidium*.

Des études ont été effectuées par Chaouki et *al*., (2009) et Bouyahya et *al*., (2016) montrent que les extraits méthanoliques de racines et les extraits éthanoliques de feuilles de *Daphne gnidium* représentent des taux faibles (18,11% et 21,51% respectivement), par rapport à nos résultats (39,3% et 22,79%, respectivement).

En effet, le rendement n'est pas relatif, car il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en polyphénols (Lee et *al*., 2003).

III.2. Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins

Les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins des extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium* sont estimées en se référant aux courbes d'étalonnage de l'acide gallique, la quercétine, l'acide tannique et la catéchine (Figure 9).

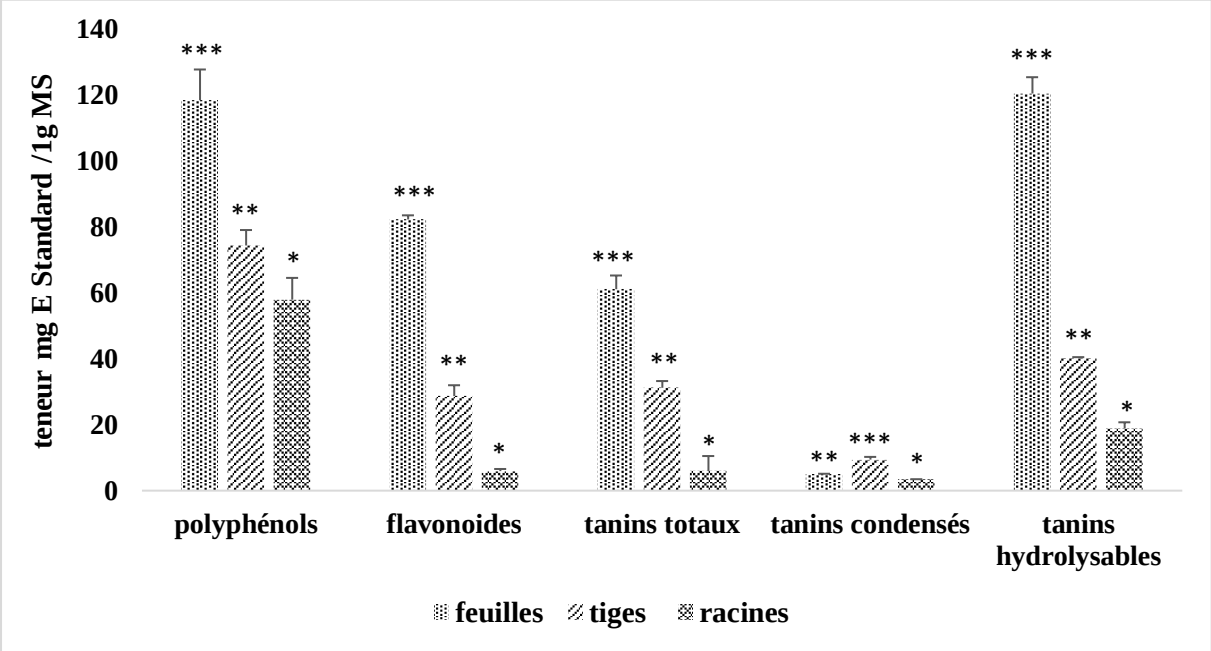


Figure 9 : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins des feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium*.

*Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=3). AVOVA-MANOVA suivie par le test Lsd : ***>**>*: représentent des différences significatives (p<0.05) ; comparé entre les teneurs en composés phénoliques entre les différentes parties de la plante.*

Les résultats d'étude statistique des teneurs en phénols totaux ont montré des différences significatives entre les différentes parties de la plante étudiée. En effet, les extraits éthanoliques de feuilles de *Daphne gnidium* sont les plus riches en phénols totaux avec la teneur de 118.42 ± 9.33 mg EAG/g MS, suivi de ceux des tiges et racines à savoir : 74,37 ± 4,69 mg EAG/ g MS ; 57,93 ± 6,61 mg EAG/ g MS, respectivement.

Les teneurs en flavonoïdes et en tanins montrent également des différences significatives importantes entre les différentes parties de *Daphne gnidium*. Cependant, les feuilles présentent la teneur la plus élevée en flavonoïdes (82,25 ± 1,26 mg EqQ/ g MS), suivie par les tiges (28,65

± 3,32 mg EqQ/ g MS), tandis que les racines révèlent les teneurs les plus faibles (05,92 ± 0,65 mg EqQ/g MS).

Les résultats de cette étude ont montré que les extraits éthanoliques de feuilles de *Daphne gnidium* présentent des quantités importantes en composés phénoliques. En effet, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes sont largement supérieures (118,42 ± 9,33 mg EAG/g MS ; 82,25 ± 1,26 mg EqQ/g MS) à celles rapportés par Bouyahya et ses collaborateurs en 2016 (83,46 ± 1,12 mg EAG/g MS ; 17,68 ± 1,23 mg EqQ/g MS) en utilisant le même solvant d'extraction.

Tandis que, les résultats obtenus par Harizi et *al*., (2011) et Chaabane et *al*., (2012) ont révélé des teneurs plus élevées en phénols totaux et en flavonoïdes (228,6 mg EAG/g MS, 266,0 mg EqQ/g MS ; 157,47 mg EAG/g MS, 114,57 mg EqQ/g MS) respectivement, en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction.

Les résultats de dosage des tanins révèlent que les extraits éthanoliques des feuilles de *D. gnidium* représentent des teneurs plus élevées en tanins hydrolysables et en tanins totaux (120,47 ± 4,94 mg EqAT/g MS ; 61,09 ± 4,17 mg EqAT/g MS) respectivement, alors que les tanins condensés représentent des taux plus faibles inférieures à 10 mg EqC/g MS).

Les études menées par Harizi et *al*., (2011) et Dif et *al*., (2014) rapportent que les extraits méthanoliques et les extraits d'acétate d'éthyle de feuilles de *D. gnidium* ont enregistré de faibles teneurs en tanins totaux et en tanins condensés respectivement, (05,40 mg EqAT/g MS; 2,4 ± 0.02 mg EqC/g MS) par rapport aux résultats obtenus dans notre étude (61,09 ± 4,17 mg EqAT/g MS; 05,05 ± 0,07 mg EqC/g MS respectivement). Cependant, aucune étude n'a permis de quantifier le taux en tanins hydrolysables.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie en raison de l'influence de divers facteurs tels que : l'origine géographique de l'échantillon, le procédé et le solvant d'extraction, le mode de séchage et les conditions de stockage qui réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les études (Benchikh et *al.*, 2014).

III.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*

La méthode d'anti-thermo-dénaturation des protéines a été utilisée pour évaluer les propriétés anti- inflammatoires des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium.*

III.3.1. Etude des effets des paramètres physico-chimiques sur la cinétique de dénaturation thermique de l'ovalbumine

L'ovalbumine est une protéine du blanc d'œuf qui représente environ 54% de ses protéines totales. Elle est fortement hydrophobe et très sensible aux conditions environnementales (pH, température…) (Chandra et *al*., 2012).

- **Effet de la concentration de l'ovalbumine**

La Figure 10 représente les absorbances de différentes dilutions d'ovalbumine 1/25, 1/50, 1/75 et 1/100 à 660 nm en fonction du temps.

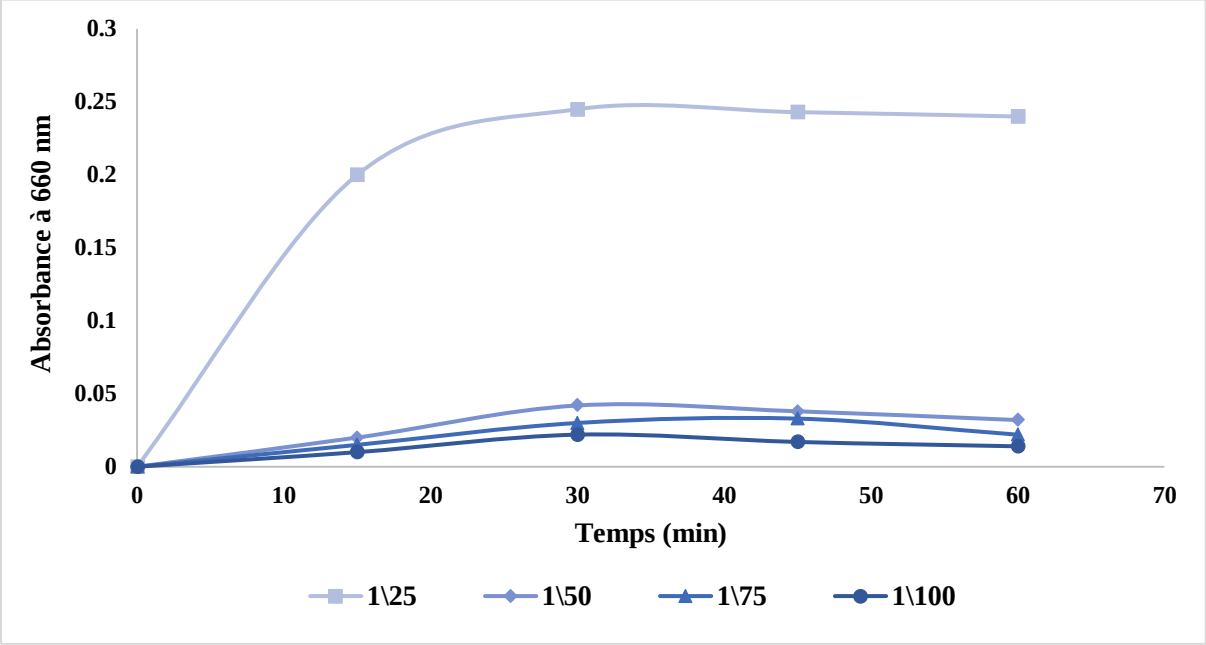


Figure 10 : Variation des absorbances de l'ovalbumine en fonction du temps à différentes concentrations.

D'après les résultats obtenus, un taux plus élevé en ovalbumine a été enregistré à la dilution 1/25 par rapport aux dilutions 1/50, 1/75, 1/100 qui représentent des absorbances similaires. Cela signifie une diminution de solubilité de la protéine qui résulte de sa dénaturation.

- **Effet de l'éthanol**

La cinétique de dénaturation thermique d'ovalbumine à différentes concentrations d'éthanol, est représentée par la variation des absorbances à 660 nm, en fonction du temps (Figure 11).

La représentation graphique montre que les absorbances sont proportionnelles aux concentrations d'éthanol, lorsque la concentration d'éthanol augmente, les absorbances augmentent. En effet, aucun effet dénaturant n'a été observé à la concentration 0% par rapport à la concentration 2,5% qui représente un effet dénaturant plus élevé (0,35). Ceci signifie que l'éthanol exerce un effet thermo-dénaturant sur l'ovalbumine.

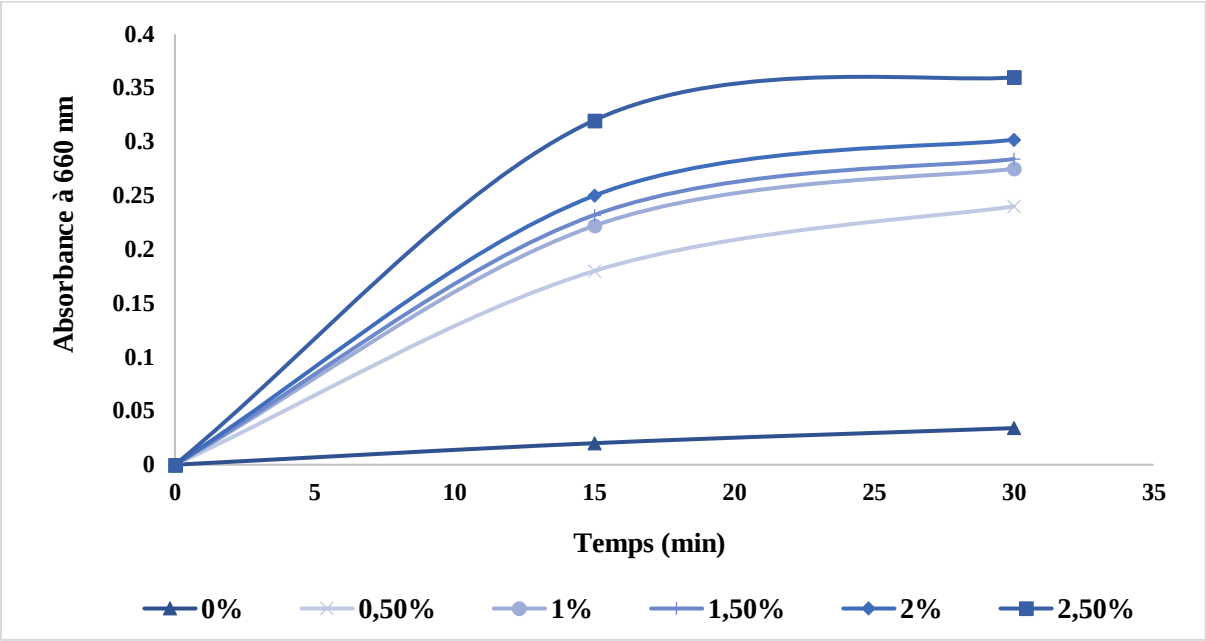


Figure 11 : Variation des absorbances de l'ovalbumine en fonction du temps pour différentes concentrations d'éthanol.

- **Effet de la température**

La cinétique de dénaturation d'ovalbumine est exprimée en variation des absorbances en fonction du temps à différentes températures : ambiante, 60°C, 70°C et 80°C est présentée dans la Figure 12.

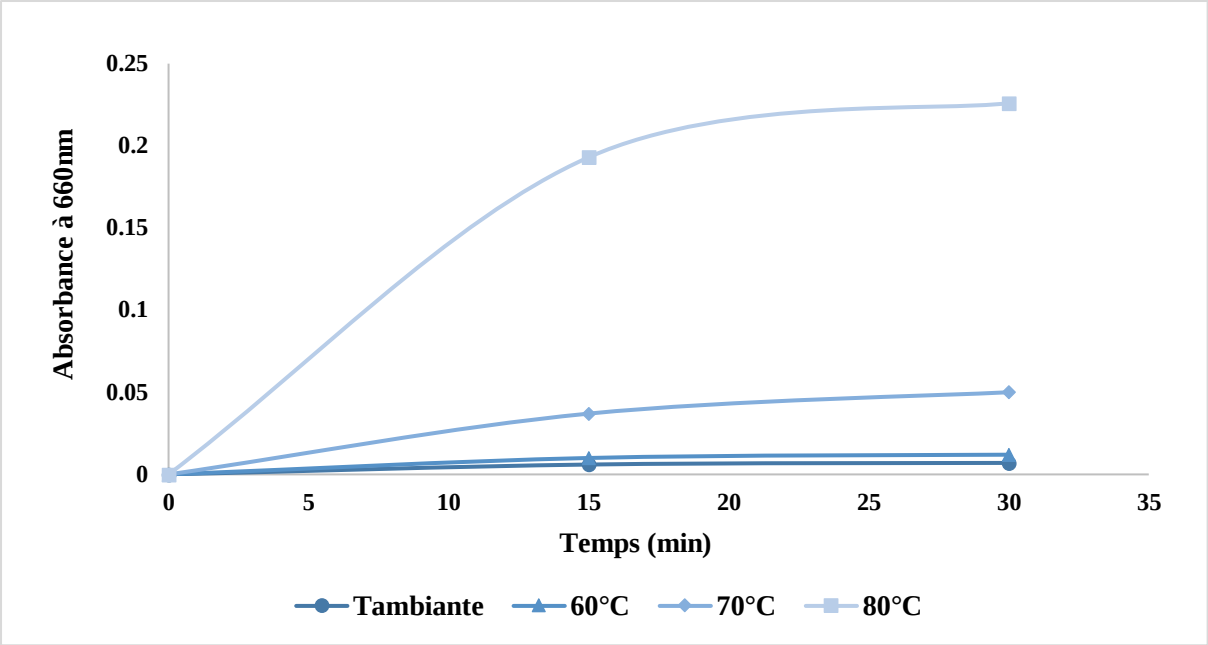


Figure 12 : Variation des absorbances de l'ovalbumine incubé à différentes températures (ambiante, 60°C, 70°C et 80°C) en fonction du temps.

D'après les résultats de la variation des absorbances de l'ovalbumine à différentes températures, on déduit que, plus la température augmente les absorbances augmentent, c'est-à-dire la cinétique de dénaturation de la protéine est importante, mais aucun effet thermo-dénaturant significatif n'a été enregistré à la température ambiante.

L'augmentation de la dénaturation thermique de l'ovalbumine pourrait être expliquée par la rupture des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes, ainsi que les ponts disulfures. Ce qui conduit au dépliement de la structure générale de la protéine, et par conséquence la perte de sa fonction (Naotoshi et *al.*, 2001).

III.3.2. Effet inhibiteur des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* sur la dénaturation thermique de l'ovalbumine et de l'albumine bovine sérique

Dans la présente étude, l'effet anti-inflammatoire, *in vitro*, des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* a été évalué par rapport à la dénaturation de l'ovalbumine du blanc d'œuf et de la BSA. Les résultats sont résumés dans les Figures 13 et 14 respectivement.

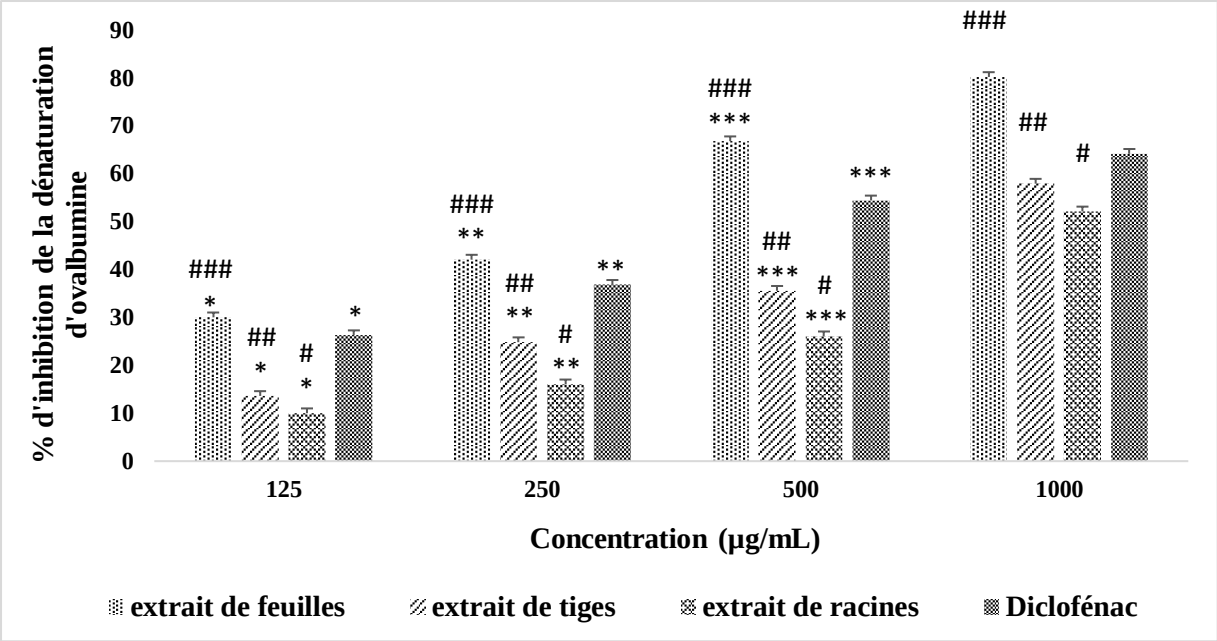


Figure 13 : Représentation graphique de taux d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine à différentes concentrations d'extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium.*

*Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=3). AVOVA-MANOVA suivie par le test Lsd : ***>**>*: représentent des différences significatives (p<0.05) ; comparé entre les différentes concentrations d'extraits et du Diclofénac et ###>##>#: représentent des différences significatives (p<0.05); comparé au Diclofénac à la même concentration.*

Ces résultats montrent que le taux d'inhibition augmente significativement avec l'augmentation des concentrations des extraits et du Diclofénac, où une forte activité anti-thermodénaturante a été mise en évidence dans les extraits éthanoliques de feuilles (80,26 %) par rapport aux extraits de tiges et racines (57,97% et 52,17%, respectivement) par comparaison au Diclofénac qui représente un taux d'inhibition de 64,21% à la même concentration (1 mg /mL).

En parrallèle, l'étude de l'activité anti-thermodénaturate réalisée par la méthode de la BSA a montré des résultats similaires à ceux obtenus avec l'ovalbumine du blanc d'ouef, avec un taux d'inhibition proportionnel à la concentration. Ceci témoigne que l'inhibition de la dénaturation est dépendante de la concentration.

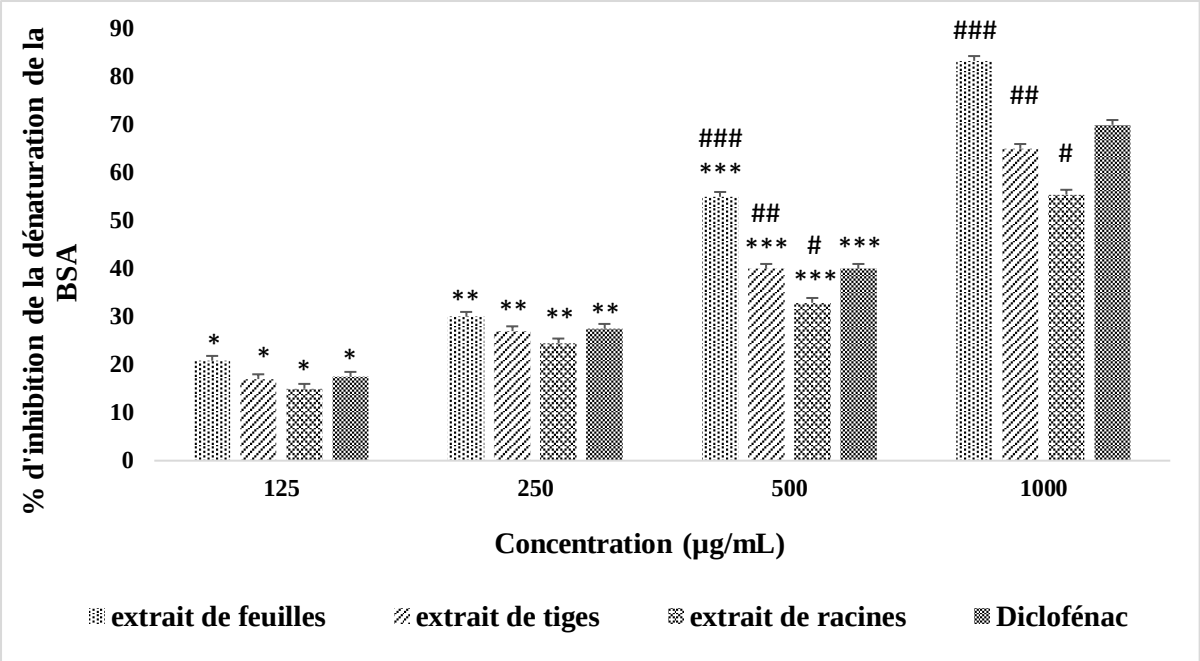


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA à différentes concentrations d'extraits éthanoliques de *Daphne gnidium.*

*Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=3). AVOVA-MANOVA suivie par le test Lsd : ***>**>*: représentent des différences significatives (p<0.05) ; comparé entre les différentes concentrations d'extraits et du Diclofénac et ###>##>#: représentent des différences significatives (p<0.05) ; comparé au Diclofénac à la même concentration.*

La dénaturation protéique est parmi les causes de l'inflammation durant laquelle la protéine perd sa structure tridimensionnelle, suite à son exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique, induisant l'exposition de certains sites qui vont devenir des auto-antigènes. La production des auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques peut être dûe à la dénaturation des protéines, *in vivo* (Rehman et *al*., 2015).

Les résultats obtenus suggèrent que les extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* sont capables de contrôler la production d'auto-antigènes par l'inhibition de la dénaturation des protéines, ceci pourrait être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les polyphénols.

L'étude de l'effet protecteur des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* sur la dénaturation thermique des proteines nous a permis de mener une étude, *in vivo,* sur le modèle animal.

III.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vivo*

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des différents extraits éthanoliques de feuilles et tiges de *Daphne gnidium* a été réalisée sur le modèle de l'œdème aigüe de la patte de souris induit par la carragénine (1%). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament le Diclofénac, qui est un anti-inflammatoire non stéroïdien et à ceux du témoin (Tableau V).

Tableau IV: Evolution de l'œdème (mL) induit par la carragénine en fonction du temps.

	H0	**H1**	**H2**	**H3**	**H4**	**H5**	**H6**
Témoin							
Eau physiologique	0,17	0,32	0,35	0,37	0,35	0,29	0,25
CMC 0.8%	0,17	0,32	0,35	0,37	0,35	0,29	0,25
Carragénine 0,1%							
Standard							
Diclofénac 50mg/kg	0,17	0,30	0,32	0,32	0,25	0,18	0,18
Extrait de feuilles de *D. gnidium*							
Dose 50mg/kg	0,17	0,28	0,30	0,30	0,27	0,20	0,18
Dose 100mg/kg	0,17	0,27	0,28	0,28	0,26	0,18	0,17
Extrait de tiges de *D. gnidium*							
Dose 50mg/kg	0,17	0,30	0,32	0,32	0,28	0,22	0,20
Dose 100mg/kg	0,17	0,29	0,30	0,31	0,27	0,21	0,18

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des souris entraîne une augmentation progressive du volume de l'œdème induit chez les souris en fonction du temps jusqu'à atteindre une valeur maximale à la troisième heure, puis diminue d'une façon significative ($p<0,05$).

D'après les résultats illustrés dans le tableau V, l'œdème évolue de façon significative chez le lot témoin ($p<0,05$), et sa diminution par la suite pourrait être expliquée par l'intervention des médiateurs anti-inflammatoires et des hormones stéroïdiennes.

A la première heure, les résultats obtenus sont significativement différents ($p<0,05$) entre le lot témoin et les lots traités par les extraits éthanoliques et le Diclofénac, par contre, aucune différence significative n'a été observée entre les lots traités. A partir de la troisième heure, les extraits éthanoliques de feuilles et tiges de *Daphne gnidium* (50 et 100 mg/Kg) provoquent une diminution significative ($p<0,05$) du volume de l'œdème proche à celle du Diclofénac (50 mg/Kg).

L'analyse statistique a révélé qu'à la 6ème heure, le Diclofénac (50 mg/Kg) et les doses 50 et 100 mg /Kg d'extraits éthanoliques de feuilles et tiges de *Daphne gnidium* ont inhibé d'une façon significative l'œdème induit par la carragénine ($p<0,05$). Le pourcentage d'inhibition le plus important a été obtenu avec le Diclofénac (94,68%) suivi par la dose 100 mg/Kg (91,25%) puis la dose 50 mg/Kg (85,97%) d'extrait éthanolique de feuilles, alors que, les doses 50 et 100 mg/Kg d'extrait de tiges exercent le pouvoir inhibant le plus faible (68,56 et 84,78%), respectivement (Figure 15).

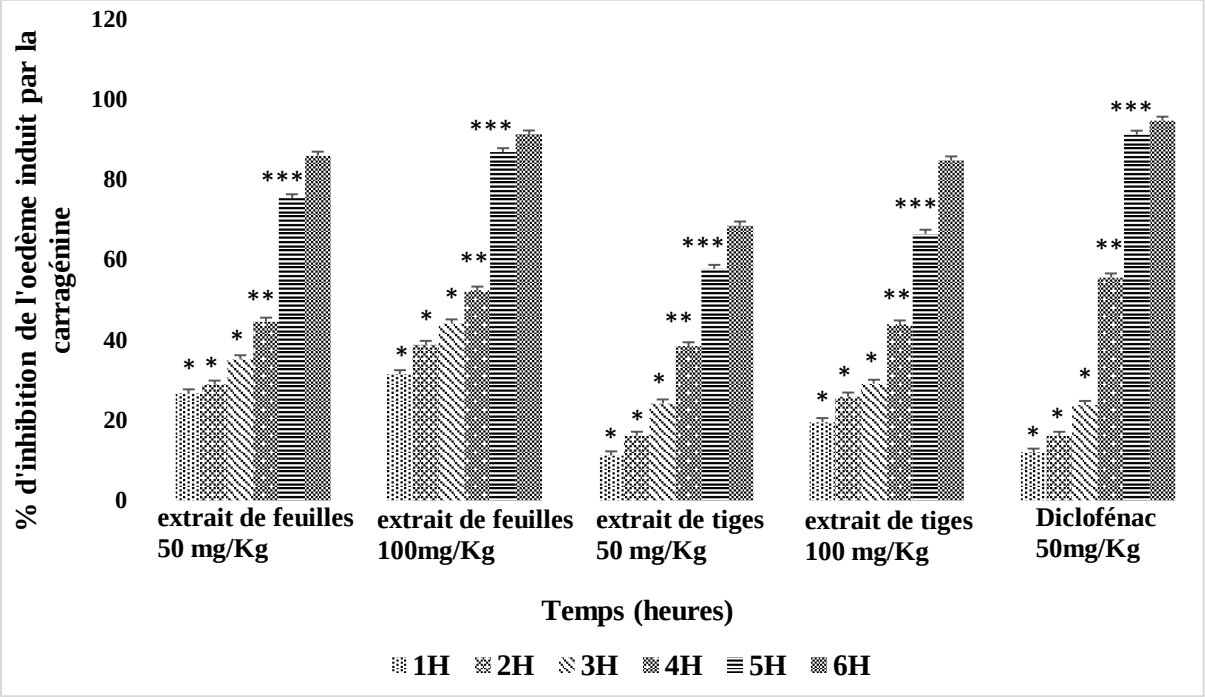


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème par les extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* et le Diclofénac en fonction du temps.

*Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne ± SEM (n=6). AVOVA-MANOVA suivie par le test Lsd :***>**>* : représentent des différences significatives (p<0.05) ; comparé entre les extraits et le Diclofénac par rapport à la sixième heure.*

L'œdème induit par la carragénine au niveau de la patte gauche des souris est considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et un paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés. Cette technique a été sélectionnée en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'induction des symptômes caractéristiques de l'inflammation et également en raison de sa reproductibilité (Winter et *al.*, 1962 ; Chatter-Riahi et *al.*, 2011).

En effet, l'évaluation du volume de l'œdème suite à l'injection de la carragénine comporte trois phases distinctes (Wantana et *al.*, 2009); une première phase (1-2h) caractérisée par la libération d'amines vaso-actifs comme l'histamine et la sérotonine qui favorisent la vasodilatation, la transsudation plasmatique et l'œdème; une seconde phase (2-3h) qui fait appel aux kinines plus exactement les bradykinines comme médiateurs qui augmentent la perméabilité vasculaire ; et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure associées à la migration leucocytaire dans la zone enflammée (Sanogo et *al.*, 2006 ; Wantana et *al.*, 2009).

Par ailleurs, l'administration du Diclofénac à la dose de 50 mg/Kg par voie orale prévient de façon significative l'augmentation du volume de la patte des souris, ceci est expliqué par l'inhibition des cyclo-oxygénases ; enzymes responsables de la synthèse des prostaglandines (Jouzeau et *al.*, 2004).

Les extraits éthanoliques de feuilles et tiges de *Daphne gnidium* exercent un effet inhibiteur significatif ($p<0,05$) du développement de l'œdème induit par la carragénine de manière dose-dépendante. L'activité anti-inflammatoire de ces extraits est probablement dûe à sa composition en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes qui possèdent des propriétés anti-inflammatoires en agissant sur les cyclo-oxygénases (Sanogo et *al.*, 2006).

III.5. Corrélations entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité anti-inflammatoire, *in vitro*

La Figure 16 représente les corrélations obtenues entre les teneurs en composés phénoliques et les IC50 de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *Daphne gnidium*. Les IC50 sont représentées dans le Tableau VI.

Tableau V : IC50 de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*.

Parties de *Daphne gnidium*	IC50 d'ovalbumine	IC50 de la BSA
Feuilles	362,5332064	362,533206
Tiges	643,0166547	632,6391032
Racines	722,435902	690,5694007

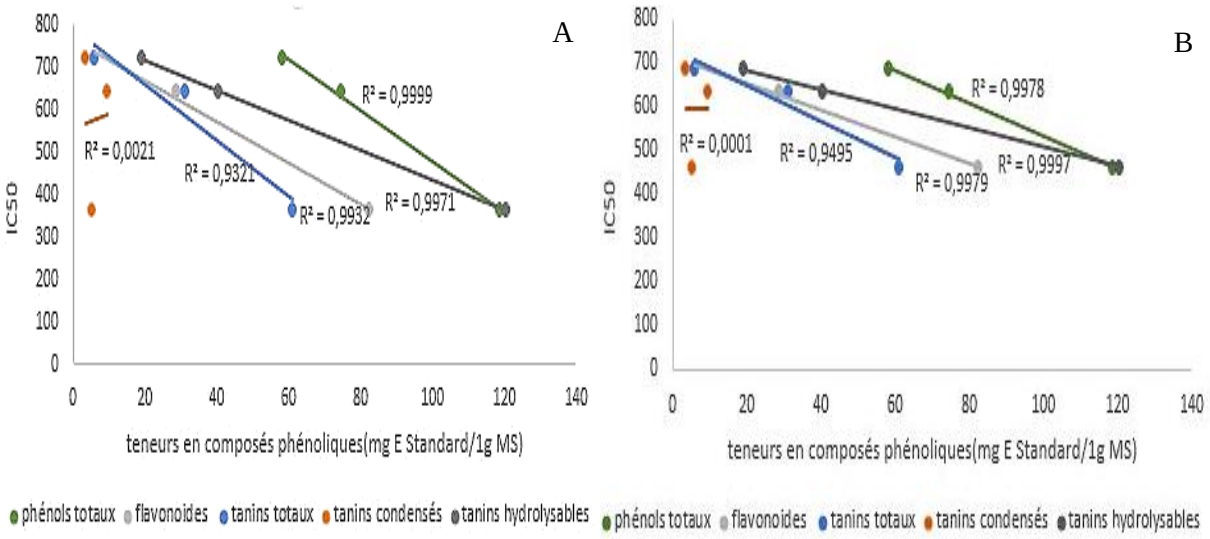


Figure 16 : Corrélations entre les composés phénoliques et les IC50 de l'activité inhibitrice de la dénaturation de l'ovalbumine (A) et de la BSA (B) par les extraits de *Daphne gnidium*.

D'après les résultats obtenus (figure 16 A et B), il a été constaté qu'il y a une forte corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et les teneurs en phénols totaux (R^2 = 0,9999 ; R^2 = 0,9978), en flavonoïdes (R^2 = 0,9932 ; R^2 = 0,9979), en tanins totaux (R^2 = 0,9321 ; R^2 = 0,9495) et en tanins hydrolysables (R^2 = 0,9971 ; R^2 = 0,9997), mais aucune corrélation n'a été enregistrée pour les tanins condensés. Ceci permet de déduire que la capacité inhibitrice de la dénaturation par les extraits de *Daphne gnidium* étudiés est dûe à la participation de 99,99% ; 99,78% des phénols totaux, 99,32% ; 99,79% des flavonoïdes, 93,21% ; 94,95% des tanins totaux et 99,71% ; 99,97% des tanins hydrolysables, respectivement. Il semble aussi que les capacités protectives des différentes extraits étudiés soient liées à la concentration des polyphénols est plus particulièrement à celle des flavonoïdes, ce qui confirme les données bibliographiques où les extrais de *Daphne gnidium* évoquent une richesse élevée en flavonoïdes.

Par ailleurs, Il n'est pas évident qu'une forte teneur en polyphénols exhibe une puissante activité (Moure et *al.*, 2001), mais des rapports plus importants peuvent être exister à des faibles concentrations. La seule explication à l'absence de corrélation entre les tanins condensés et l'activité anti-inflammatoire est dûe à la synergie des composés phénoliques dans les extraits éthanoliques et la dépendance de l'activité anti-inflammatoire de la concentration et notamment de la structure de ces molécules (Rice-Evans et *al.*, 1997).

Conclusion et perspectives

Ce présent travail contribue à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vitro,* et *in vivo,* des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium*.

L'extraction des polyphénols totaux par macération à l'éthanol a montré que les extraits de feuilles de *Daphne gnidium* présente un meilleur rendement de l'ordre de 39.3 % tandis que les extraits de tiges et racines ont fourni un rendement de 32,56% et 22,79%, respectivement.

En effet, les différents extraits ont révélé une inhibition efficace de la dénaturation thermique de l'ovalbumine du blanc d'œuf et de l'albumine bovine sérique, les extraits de feuilles ont représenté des pourcentages plus élevés par rapport au Diclofénac à la même concentration 1 mg/mL.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire, *in vivo,* a montré que les extraits de *D. gnidium* réduisent de façon significative l'œdème de l'inflammation, induit par la carragénine au niveau de la patte des souris, en comparaison avec le Diclofénac de sodium. Ces propriétés anti-inflammatoires sont en corrélation avec la teneur en phénols totaux plus particulièrement les flavonoïdes qui agissent en inhibant les cyclo-oxygénases.

Ce travail est préliminaire et nécessite des études plus approfondies afin de :

- ✓ Séparer et caractériser, les différents constituants de cette espèce par des méthodes d'investigations telles que : la chromatographie sur colonne, HPLC, GC-MS et RMN ;
- ✓ Elucider les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces composés et l'évaluation de leurs effets sur le processus inflammatoire ;
- ✓ Etudier leurs toxicités pour une modération de sécurité dans l'utilisation de cette plante.

Références bibliographiques

Adrach Verma M., Ajay Kumar P., Kavitha D. et Anurag KB. (2011). Anti denaturation and antioxidant activity of *Annon cherimola in vitro. International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2 (2): 1-6.

Ashley NT., Weil ZM. et Nelson RJ. (2012). Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43: 385-406.

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

Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J. et Younos C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacologie*, 35: 123-143.

Benchikh Y., Louailache H., George B. et Merlin A. (2014). Changes in bioactives phytochemical content and *in vitro* antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua L.)* as influenced by fruit ripening. *Industrial Crops and Products*, 60: 298-303.

Benhammou N., Atik Bekkara F. et Kadifkova Panovska T. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2 (2): 022-028.

Bnouham M., Mekhfi H., Legssyer A. et Ziyyat A. (2002). Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *International Journal of Diabetes and Metabolism*, 10: 33-50.

Borris RP., Blasko G. et Cordell GA. (1988). Ethnopharmacologic and Phytochemical Studies of the Thymelaeaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 24: 41-91.

Botineau M. (2015). *Fruit rouge à maturité, Garou.* In : *Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques*. Paris : Lavoisier. 114 p.

Boucher C. et Doux Y. (2011). Daphné. In : *Guide des arbres et arbustes de méditerranée*. Paris : Delachaux et Niestlé. 208-209 p.

Bouyahya A., Abrini J., El-Baabou A., Bakri Y. et Dakka N. (2016). Determination of phenol content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from North-West of Morocco. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7: 1-4.

Bruneton J. (1987). *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*. Paris : Lavoisier. 136-162 p.

Calder PC., Albers R., Antoine JM., Blum S., Bourdet-Sicard R., Ferns GA., Folkerts G., Friedmann PS., Frost GS. et *al*. (2009). Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101: 1-45.

Chaabane F., Boubaker J., Loussaif A., Neffati A., Kilani-Jaziri S., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2012). Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *Daphne gnidium* leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(153): 1-10.

Chaabane F., Krifa M., Matera E., Loussaeif A., Dijoux-Franca MJ., Ghedira K., Dumontet C. et Chekir-Ghedira L. (2014). *In vitro* antileukaemic activity of extracts from *Daphne gnidium* leaves against sensitive and multidrug resistant K562/R7 cells. *Tumor Biology*, 35(9): 8991-8998.

Chaabane F., Mokdad-Bzeouich I., Sassi A., Mustapha N., Majouli R., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2015). Genoprotective and neuroprotective effects of *Daphne gnidium* leaf methanol extract, tested on male mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 39 (3): 297-302.

Chaabane F., Mustapha N., Mokdad-Bzeouich I., Sassi A., Kilani-Jaziri S., Dijoux Franca MG., Michalet S., Fathallah M., Krifa M. et *al*. (2015). *In vitro* and *in vivo* anti-melanoma effects of *Daphne gnidium* aqueous extract via activation of the immune system. *Tumour Biology*, 37(5): 6511-6517.

Chaabane F., Pinon A., Simon A., Ghedira K. et Chekir-Ghedira L. (2013). Phytochemical potential of *Daphne gnidium* in inhibiting growth of melanoma cells and enhancing melanogenesis of B16-F0 melanoma. Cell Biochemistry and Function, 31(6): 460-467.

Chandra S., Chatterjee P., Dey P. et Bhattacharya S. (2012). Evaluation of anti-inflammatory effect of Ashwagandha: A preliminary study *in vitro*. *Pharmacognosy Journal*, 4(29): 47-49.

Chaouki W., Leger DY., Liagre B., Cherrah Y., Beneytout JL. et Hmamouchi M. (2009). Roots of *Daphne gnidium* L. inhibit cell proliferation and induce apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmazie*, 64: 542–546.

Chaouki W., Meddah B. et Hmamouchi M. (2015). Antiproliferative and apoptotic potential of *Daphne gnidium* L. root extract on lung cancer and hepatoma cells. *Pharmazie*, 70: 205-210.

Chatter-Riahi R., Tarhouni S. et Kharrat R. (2011). Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer mediterranée. *Les Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88(1-4): 19-28.

Cole GM., Lim GP., Yang F., Teter B., Begum, A., Ma Q., Harris-White ME et Frautschy SA. (2005). Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. *Neurobioogy Aging,* 26 (1): 133-136.

Cottiglia F., Loy G., Garau D., Floris C., Casu M., Pompei R., et Bonsignore L. (2001). Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8(4): 302-305.

Couplan F. et Styner E. (2013). Thyméleacées. In **:** *Les plantes sauvages, comestibles et toxiques*. Paris : Delachaux et Niestlé. 362-363p.

Crozier A., Jaganath IB. et Clifford MN. (2006). Phenols, Polyphenols and Tannins. In : Crozier A., Clifford MN., Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Singapore: Blackwell Publishing Ltd. 1-20 p.

Dangoumau J., Moore N., Molimard M., Fourrier-reglat A., Latry K., Haramburu F., Miremont-Salame G. et Titier K. (2006). Anti-inflammatoires hormonaux ou stéroïdiens (corticoïdes). In : *Pharmacologie générale*. Bordeaux : Copyright ISBN. 315 p.

Datta P., Bhattacharjee S., Nath A., Das R., Bhattacharjee C. et Datta S. (2009). Separation of ovalbumin from chicken egg white using two-stage ultrafiltration technique. *Separation and Purification Technology,* 66 (2): 353-361.

Daud A., Habib N. et Riera AS. (2006). Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. *Journal of Ethnopharmacology,* 108 (2): 198-203.

Deiana M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L. et Dessì MA. (2003). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts from *Daphne gnidium* L. *Journal of the American Oil Chemists' Society,* 80 (1): 65-70.

Deshpande SS., Cheryan M., Salunkhe DK. et Luh BS. (1986). Tannin analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 24 (4): 401-449.

Dif MM., Toumi FB., Benyahia M., Bouzid K., Rahmani M. et Sellam F. (2014). First determination of polyphenol variation in *Daphne gnidium* L. leaves depending on altitude and slope at Tessala mounts (North-West Algeria). *Revue d'écologie,* 69 :338-344.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4): 654-660.

Espinosa E., Chillet P. et Valitutti S. (2006). *Immunologie*. Paris: Ellipses. 432 p.

Gomez-Caravaca AM., Gomez-Romero M., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A. et Fernandez-Gutierrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220 -1234.

Hagerman AE. et Butler LG. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (4): 809-812.

Halda JJ. (1998). Some taxonomic problems in the genus *Daphne* L. *Acta Musei Richnoviensis Section Nature*, 5: 133-160.

Hanasaki Y., Ogawa S. et Fukui S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6): 845-850.

Harizi H., Chaabane F., Ghedira K. et 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.

Hawkey CJ. (1999). COX-2 inhibitors .*The Lancet*, 353: 307-314.

Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1): 3-6.

Henrotin Y., Deby-Dupont G. et Reginster JY. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Revue Médecine Liège*, 56 (6): 433-442.

Jouzeau JY., Daouphars M., Benani A. et Netter P. (2004). Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterologie Clinique Biologique*, 28: C7-C17.

Kabera JN., Semana E., Mussa AR. et He X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 377-392.

Kupchan SM., Shizuri Y., Sumner WC., Haynes HR., Leighton AP. et Sickles BR. (1976). Isolation and structural elucidation of new potent antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia* species. *Journal of Organic Chemistry*, 41(24): 3850-3853.

Lamiable D., Hoizey G., Marty H. et Vistelle R. (2004). Acute methanol intoxication. *EMC-Toxicologie Pathologie*, 1: 7-12.

Leclerc H. (1999). Essai de la thérapeutique par les plantes française. In : *Précis de phytothérapie*. 5ème Edition. Paris : Elsevier Masson. 270 p.

Lee KW., Kim YJ., Lee HJ. et Lee CY. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxydant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51(25): 7292-7295.

Lipsky P., Abramson SB., Crofford L., Dubois RN., Simon LS. et Van de Putte LB. (1998). The classification of cyclooxygenase inlnbitors. *Journal of Rheumatology*, 25(12): 2298-2303.

Mamadou B. (2002). *Actions pharmacologiques des tanins*. Thèse de Doctorat, Pharmacie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 57 p.

Martin PY. et Desmeules J. (2001). Risques rénaux des anti-inflammatoires non stéroïdiens COX 2 sélectifs. *Douleur et Analgésie*, 14(3): 163-167.

Miara MD., Ait Hammou M. et Hadjadj Aoul S. (2013). Phytothérapie et taxonomie des plantes médicinales spontanées dans la région de Tiaret (Algérie). *Phytothérapie*, 11: 206-218.

Mohammedi Z. et Atik F. (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.

Mole S. et Waterman PG. (1986). Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition substrat deprivation ? *Phytochemistry*, 26(1): 99-102.

Moure A., Cruz JM., Franco D., Dominguez JM., Sineiro, J., Dominguez H., Núñez MJ. et Parajo JC. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.

Naotochi M., Hidekazu T. et Takeshi M. (2001). Some structural properties of ovalbumin heated at 80°C in the dry state. *Food Research International*, 34 :229-235.

Nowik W. (2005). HPLC-PDA characterisation of *Daphne gnidium* L. (Thymeleacea) dyeing extracts using two different C-18 stationary phases. *Journal of Separation Science*, 28(13): 1595-1600.

Quettier-Deleu C., Gressier B., Vasseur J., Dine T., Brunet C., Luyckx M., Cazin M., Cazin JC., Bailleul F. et *al.* (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of

buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 35-42.

Quezel P. et Santa S. (1963). Thymélacées. In : *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*. Tome II. Paris : Centre National de la recherche scientifique. 631-633 p.

Rasmussen SE., Frederiksen H., Struntze Krogholm K. et Poulsen L. (2005). Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molucular Nutrition and Food Research*, 49(2): 159-174.

Reynaud J. (2002). Thymélacées. In : *La flore du pharmacien*. Paris : Lavoisier. 211-213 p.

Ribereau-Gayon P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris : Dunod. 254 p.

Rice-Evans CA., Sampson J., Brameley PM. et Holloway DE. (1997). Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Radical Research*, 26: 381-398.

Risser, A., Donovan, D., Heintzman, J. et Page, T. (2009). NSAID prescribing precautions. *American Family Physician*, 80(12): 1371-1378.

Russo-Marie F., Peltier A. et Polla BS. (1998). *L'inflammation*. Paris: John Libbey Eurotext. 565 p.

Ryan I. (2013). Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *International Journal of Food Science and Technology*, 1: 1-6.

Sanogo R., Maiga A. et Diallo D. (2006). Activités analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *Maytenus senegalensis, Stereospermum kuntrianum et Tricrilia Emetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali. *Pharmacopée et Médecine Traditionnelle Africaine*, 14: 123-136.

Sovrlić MM. et Manojlović NT. (2016). Plants from the genus *Daphne* : A Review of its traditional uses, Phytochemistry, Biological and Pharmacological Activity. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 18 (1): 69-80.

Ullah AHM., Zaman S., Juhara F., Akter L., Tareq SM., Masum EH. et Bhattacharjee R. (2014). Evaluation of antinociceptive, in-vivo & in-vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* rhizome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:346.

Vidal V., Potterat O., Louvel S., Hamy F., Mojarrab M., Sanglier JJ., Klimkait T., et Hamburger M. (2012). Library-Based Discovery and Characterization of Daphnane Diterpenes as Potent and Selective HIV Inhibitors in *Daphne gnidium*. *Journal of Natural Products*, 75: 414-419.

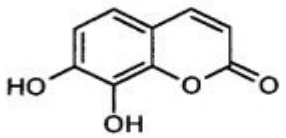
Weill B. et Batteux F. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. Bruxelles : De Boeck. 12-32 p.

Winter CA., Risley EA et Nuss GW. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 111: 544-547.

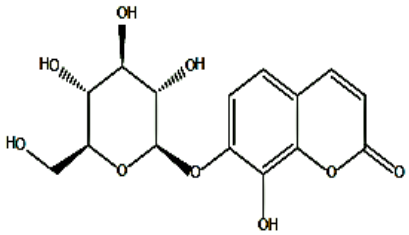
Yougbaré-Ziébrou MN., Ouédraogo N., Lompo M., Bationo H., Yaro B., Gnoula C., Sawadogo WR. et Guissou IP. (2015). Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of an aqueous extract of *Saba senegalensis* Pichon stems with leaves (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 14(4): 213-219.

Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M. et Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 58: 45-54.

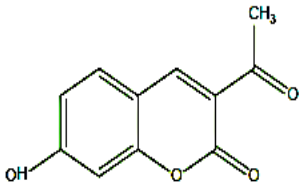
Annexes



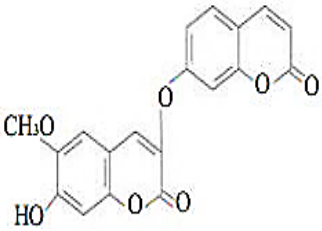
Daphnétine



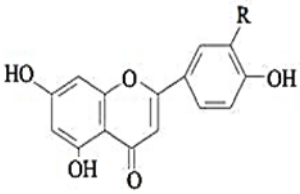
Daphnine



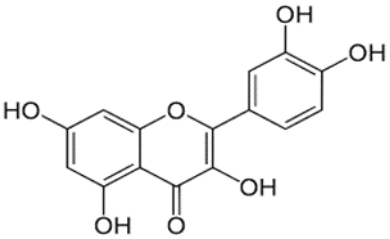
Acétylumbelliférone



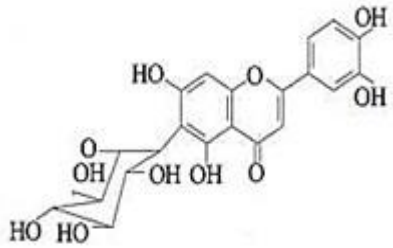
Daphnorétine



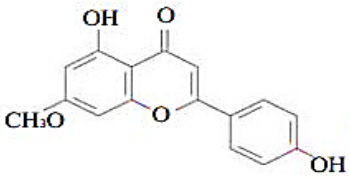
Apigénine (R = H)
Lutéoline (R = OH)



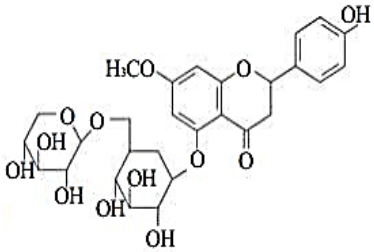
Quercétine



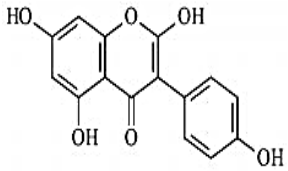
Isoorientine



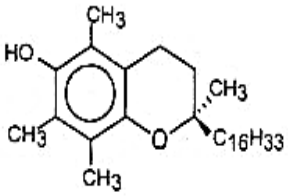
Genkwanine



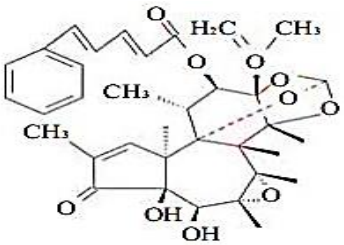
D-primeverosyl genkwanine



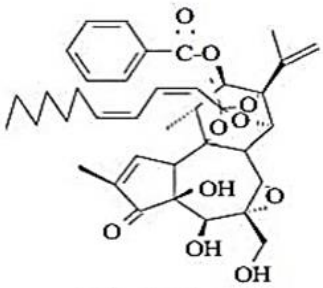
Tétra-hydroxy-isoflavanol



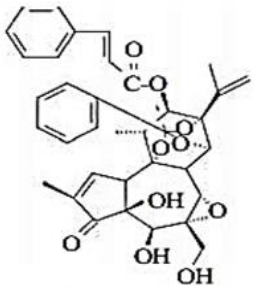
α-tocophérol



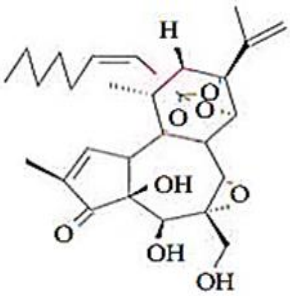
Mézéréine



Gnidicine



Gniditrine



Excoecariatoxine

Annexe 1 : Structures de la composition chimique de *Daphne gnidium* (Deiana et *al*., 2003 ; Nowik, 2005 ; Vidal et *al*., 2012).

Annexe 2 : Réactifs

Tableau I : Réactifs utilisés et leurs propriétés (http://fr.m.wikipedia.org)

Produits	Propriétés
Acide acétique ($C_2H_4O_2$)	M = 60,05 g/mol
Acide chlorhydrique (HCl)	M = 36 g/mol
Acide gallique monohydrate ($C_7H_6O_5H_2O$)	M = 188,14 g/mol
Acide tannique ($C_{76}H_{52}O_{46}$)	M = 1701 g/mol
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)	M = 105,98 g /mol
Catéchine ($C_{15}H_{14}O_6$)	M = 290,26 g/mol
Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$)	M = 241,43 g/mol
Chlorure ferrique ($FeCl_3$)	M = 162,21 g/mol
Chlorure de sodium (NaCl)	M = 58,4 g/mol
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4)	M = 119,98 g/mol
Ethanol (C_2H_6O)	M = 46,068 g/mol
Folin-Ciocalteu	d = 1,22
Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	M = 141,96 g/mol
Quercétine ($C_{15}H_{10}O_7$)	M = 302 g/mol
Sodium dodecyl sulfate ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)	M = 288,372 g/mol
Triéthylamine ($C_6H_{15}N$)	M = 101,19 g/mol
Vanilline ($C_8H_8O_3$)	M = 152,15 g/mol

Annexe 3 : Appareils

Tableau II *:* Appareils utilisés, leurs marques et caractéristiques

Appareils	Caractéristiques et marques
Etuve	Binder Venticell, Tmax=320°C
Rota-vapeur	Heidolph Hei-VAP Value
Balance électronique	RADWAG, PS 600/C/2 max: 600g min 0,02g
Spectrophotomètre ultraviolet-visible	RayLeigh
Micropipette	De 20 à 200 µl, 100 à 1000µl

pH mètre	BOECO Germany BT -675
Bain marie	Raypa Thermostatic BATH
Tamiseur électrique	Retsch
Broyeur électrique	Moulinex
Plaque agitatrice	VELP Scientifica AM4 (rotation 1100)
Centrifugeuse	Bench top low speed centrifuge (6000 rpm)

Annexe 4 : Préparation des solutions

Solutions	Réactifs
Tampon A	11,4 ml Acide acétique (0,2 M) 9,86 g de NaCl (0,17 M) pH ajusté à 4,9 avec NaOH Ajusté jusqu'à 1L d'eau distillé.
Folin Ciocalteau 10%	10 mL de Folin ajusté à 100 mL avec l'eau distillé.
Chlorure ferrique ($FeCl_3$) 0,1%	0,1 g de chlorure ferrique dans 100 mL d'eau distillée.
Chlorure ferrique ($FeCl_3$) 0,01 M	1.62 g dans 1L d'eau distillée.
Solution de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ (2%)	2 g d'AlCl3 100 mL d'eau distillée.
Solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5%)	7,5 g de Na_2CO3 100 mL d'eau distillée.
HCl 0,01 M	0,85 mL HCl 36% ajusté jusqu'à 1L d'eau distillé.
Vanilline 5,8%	5,8 g dans 100 mL d'eau distillé.
Solution SDS /TEA	50 mL TEA 10 g SDS Ajusté à 1 L avec l'eau distillé.
Tampon phosphate (0,1 M, pH = 6,6)	14,196 g de Na_2 HPO_4 11.92 g de NaH_2 PO_4 Ajouter 1L d'eau distillée.
BSA 2%	2 g dans 100 mL du tampon phosphate (0,1 M, pH = 6,6).
NaCl 0,9%	0,9 g NaCl dans 100 mL d'eau distillé.
CMC 0,8%	0,8 g CMC dans 100 mL d'eau distillé.
Carragénine 1%	1 g dans 100 mL d'eau physiologique.

Annexe 5 : Courbes d'étalonnage

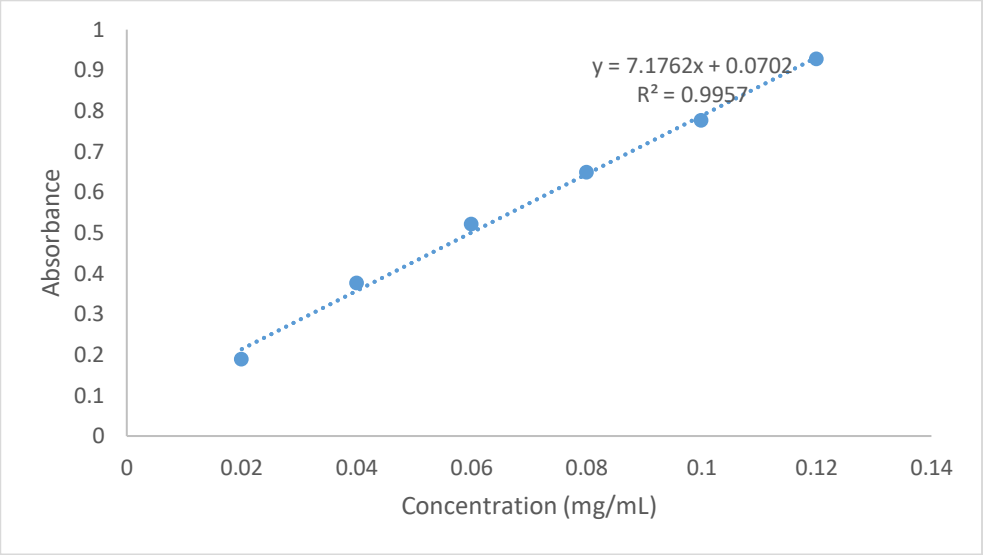


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

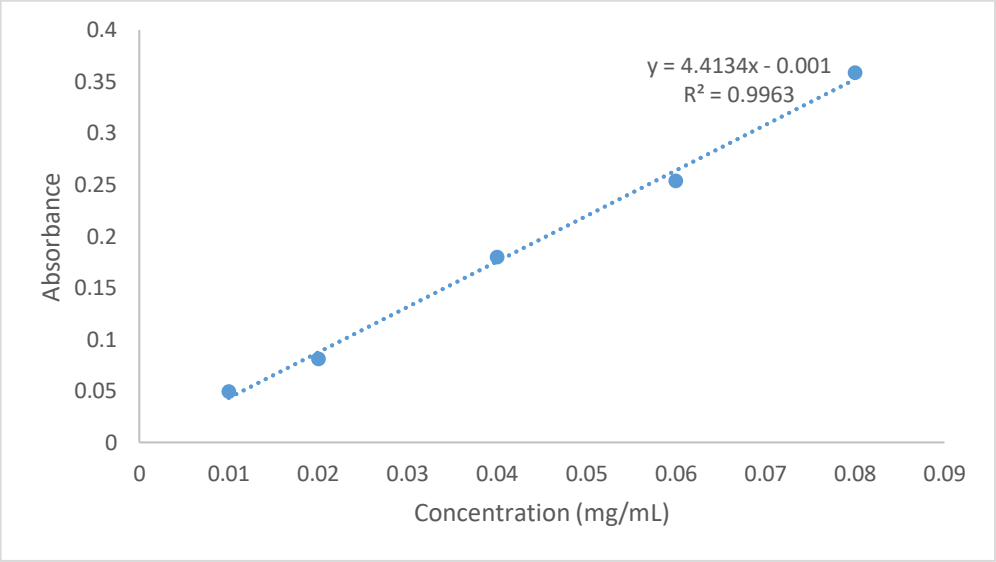


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

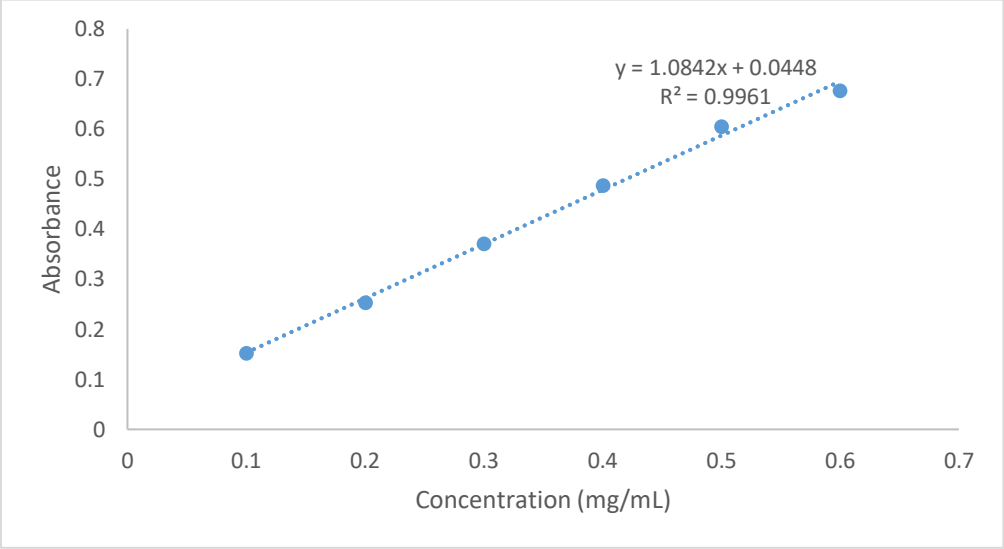


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins totaux.

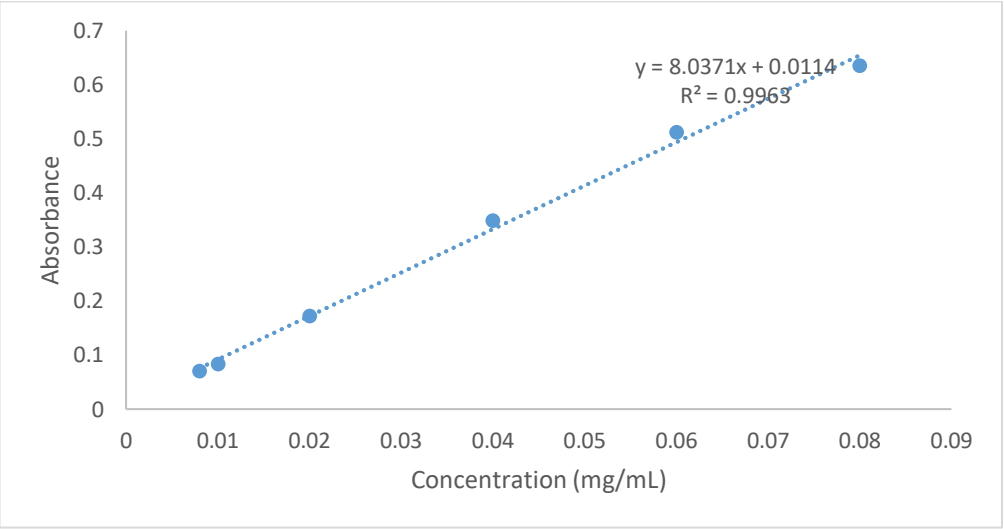


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés.

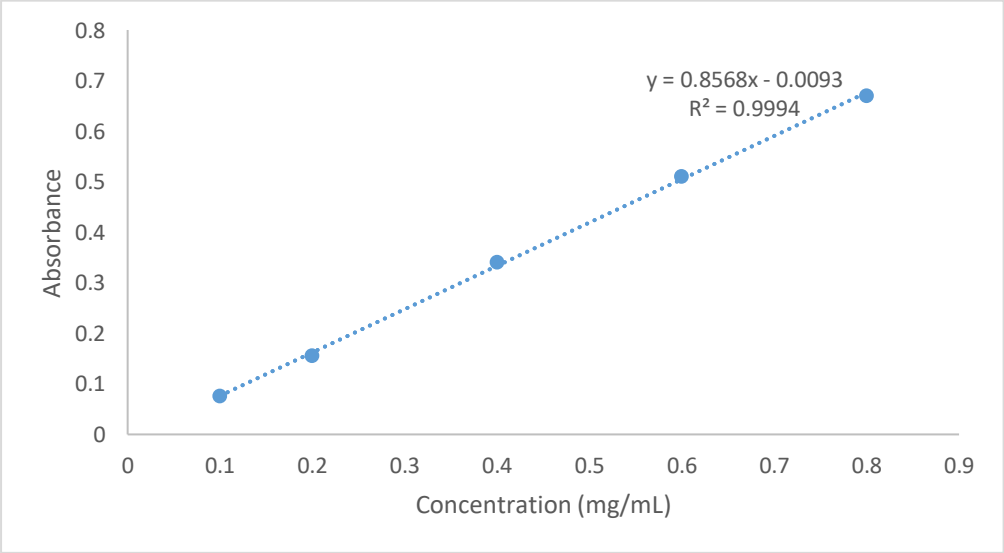


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tanins hydrolysables.

Glossaire

Glossaire botanique

Alterne : disposition isolée des organes spécialement les feuilles sur la tige.

Baie : fruit charnu, souvent mou, a graines nombreuses disséminées dans la pulpe.

Caduque : se dit d'un organe, notamment les feuilles, se détachant et tombant à chaque saison.

Coriace : qui a la consistance et l'aspect du cuir.

Cuspide : insensiblement atténué en une pointe raide et aiguë.

Garrigue : désigne une formation végétale caractéristique des régions dans lesquelles règne un climat méditerranéen.

Herbacée : toute plante vivace, qui n'a pas de tige ligneuse persistante au-dessus du sol, ou dont l'aspect est de la nature de l'herbe verte par opposition à ce qui est ligneux.

Lancéolée : se dit d'une feuille en forme de fer de lance.

Tomenteuse : se dit d'une plante ou d'une partie de plante recouverte de poils épais, à la façon d'un feutre.

Glossaire médicale

Affection dartreuse : relatif aux dartres, nom de diverses maladies de la peau qui produisent une desquamation.

Aflatoxine : toxine produite par le champignon *Aspergillus flavus* pouvant contaminer les arachides et provoquer des intoxications alimentaires du bétail et des oiseaux de basse-cour nourris avec des tourteaux d'arachides.

Analgésique : est un médicament qui prévient ou diminue la sensation de douleur.

Antiallergique : qui est utilisé dans le traitement ou la prévention des allergies.

Antibactérienne : substance possédant la capacité de tuer des bactéries.

Antifongique : molécule qui permet de lutter contre les champignons, également appelés mycoses.

Antigénotoxique : est un produit chimique, ou un rayonnement électromagnétique, qui peut provoquer des dommages à l'ADN et peut donc entraîner des modifications génétiques, des mutations.

Antioxydants : sont des substances qui empêchent les radicaux libres d'oxyder les protéines, acides gras et autres molécules du corps. Ils permettent donc de protéger le corps de l'oxydation.

Antipyrétique : médicament utilisé dans le traitement de la fièvre.

Antiseptique : produit utilisé pour lutter contre les germes de la peau et des muqueuses.

Bradykinine : hormone composée de neuf acides aminés. Elle est sécrétée à partir du kininogène, lui-même synthétisé par le foie.

Buturyl-cholinestérase : enzyme tissulaire et plasmatique capable d'hydrolyser l'acétylcholine et d'autres substrats.

Cellules endothéliales : cellules qui tapissent la face interne des vaisseaux, qui sont en contact direct avec le sang et qui assure l'intégrité des vaisseaux.

Cicatrisant : phénomène naturel de reconstruction d'une zone lésée. Il peut s'agir de la régénération d'un tissu ou d'un organe,

Convulsion : contraction brusque et involontaire des muscles squelettiques s'accompagnant parfois de contractions des muscles lisses, qui peut être localisée à un ou plusieurs muscles ou généralisée à tout le corps.

Déglutition : action et effet de déglutir ou d'avaler ; passage de substances solides, liquides ou gazeuses de la bouche à l'estomac.

Dépurative : action de débarrasser l'organisme des substances nocives ou inutiles.

Diurétique : une substance qui entraîne une augmentation de la sécrétion urinaire.

Épispastique : agit sur la peau, y détermine de la chaleur, de la rougeur et un afflux de sérosité qui soulève et détache l'épiderme.

Exsudation : est la libération, à partir des vaisseaux sanguins vers un tissu ou à la surface d'un tissu, d'un liquide contenant des cellules, du pus et des quantités importantes de protéines.

Fibrine : globuline filamenteuse insoluble, qui se forme à partir du fibrinogène sous l'action de la thrombine. Elle n'existe pas dans le sang circulant, mais se dépose après coagulation spontanée du sang, de la lymphe et de certains exsudats.

Hépatome : tumeur du foie développée aux dépens des hépatocytes, de nature bénigne (adénome) ou maligne.

Mélanome : tumeur mélanique ou pigmentée. Ce terme recouvre aussi bien les mélanomes bénins que les mélanomes malins.

Œdème : infiltration de sérosité dans les tissus, en particulier dans les tissus sous-cutané et sous-muqueux. Elle peut être due à diverses causes : diminution de la pression osmotique du plasma par réduction de la protéinémie, augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires, augmentation de la perméabilité des parois capillaires ou obstruction des voies lymphatiques.

Purgatif : médicament qui, administré par voie orale, a une action évacuatrice du contenu intestinal. Les purgatifs reçoivent différents noms selon la modalité de leur action : hydragogues, cholagogues, drastiques.

Rubéfaction : rougeur intense et passagère de la peau provoquée par un agent rubéfiant.

Sclérose en plaques : maladie inflammatoire, chronique et progressive du système nerveux central (cerveau et moelle épinière).

Syphilis : maladie infectieuse dangereuse, à déclaration obligatoire, très contagieuse, qui est présente à l'échelle mondiale. L'agent pathogène (la bactérie *Treponema pallidum*).

Troubles biliaires : ensemble des troubles occasionnés par une insuffisance de sécrétion de la bile par le foie, à un obstacle sur les voies biliaires ou encore à un dysfonctionnement de la vésicule biliaire.

Vénérien: qui se rapporte ou qui est dû aux rapports sexuels.

Vésicante : agent topique qui provoque des phlyctènes cutanées.

Résumé :

L'objectif de ce travail est de quantifier la teneur en polyphénols et d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* des extraits éthanoliques de feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium.* L'estimation quantitative des composés phénoliques par spectrophotométrie a montré que les extraits éthanoliques de feuilles sont les plus riches en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins (118,42 ± 9,33 mg EqAG/g MS ; 82,25 ± 1,26 mg EqQ/g MS ; 61,09 ± 4,17 mg EqAT/g MS respectivement). L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de *Daphne gnidium* a révélé la présence de propriétés protectrices contre la dénaturation thermique de l'albumine du blanc d'œuf et de l'albumine bovine (BSA) à la concentration (1 mg/mL). D'autre part, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* a montré que les deux doses utilisées des extraits éthanoliques de feuilles et de tiges de *Daphne gnidium* ont inhibé de façon significative la formation de l'œdème aiguë de la patte des souris, induit par la carragénine par comparaison au Diclofénac, l'anti-inflammatoire de référence. Ces résultats justifient l'usage de cette plante en médecine traditionnelle.

Mots clés : *Daphne gnidium*, polyphénols, anti-inflammatoire, albumine, carragénine, Diclofénac.

Abstract :

The aim of this work is to quantify the polyphenol content and to evaluate the anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* of ethanolic extracts of *Daphne gnidium* leaves, stems and roots. Quantitative estimation of phenolic compounds by spectrophotometry showed that the ethanolic leaves extracts are the richest in total phenols, flavonoids and tannins (118,42 ± 9,33 mg EqAG / g MS ; 82,25 ± 1,26 mg EqQ / g MS ; 61,09 ± 4,17 mg EqAT / g MS respectively). The study of the *in vitro* anti-inflammatory activity of *Daphne gnidium* extracts revealed the presence of protective properties against thermal denaturation of ovalbumin and bovine albumin (BSA) at the concentration (1 mg / mL). On the other hand, the evaluation of *in vivo* anti-inflammatory activity showed that both doses used ethanolic extracts of *Daphne gnidium* leaves and stems significantly inhibited the formation of acute paw edema of mice induced by carrageenan compared to Diclofenac, the standard anti-inflammatory drug. These results justify the use of this plant in traditional medicine.

Keywords : *Daphne gnidium*, polyphenols, anti-inflammatory, albumin, carrageenan, Diclofenac.

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو تحديد محتوى البوليفينول وتقييم النشاط المضاد للإلتهابات في المختبر وفي الجسم الحي لمستخلصات الإيثانول لأوراق وسيقان وجذور اللزاز. أظهر التقدير الكمي للمركبات الفينولية بواسطة القياس الطيفي أن مستخلصات الإيثانول للأوراق هي الأغنى بالفينولات الكلية، الفلافونويد والعفص (118,42 ± 9,33 مغ ما يعادل حمض الغال/غ من المادة الجافة، 82,2 ± 1,26 مغ ما يعادل الكيرسيتين/غ من المادة الجافة، 61,09 ± 4,17 مغ ما يعادل حمض التانيك/غ من المادة الجافة على التوالي). كشفت دراسة النشاط المضاد للإلتهابات في المختبر لمستخلصات اللزاز وجود خصائص وقائية ضد التمسخ الحراري لزلال البيض والألبومين البقري (BSA) عند التركيز (1مغ / مل) من ناحية أخرى، أظهر تقييم النشاط المضاد للإلتهابات في الجسم الحي أن كلا من الجرعة المستخدمة من المستخلصات الإيثانولية لأوراق وسيقان اللزاز تثبط بشكل كبير تكوين وذمة حادة من مخالب الفئران الناجمة عن الكاراجينان بالمقارنة مع الديكلوفيناك الذي يعد مرجعا مضادا للإلتهابات. هذه النتائج تبرر إستخدام هذا النبات في الطب التقليدي.

الكلمات المفتاحية : لزاز، البوليفينول، النشاط المضاد للالتهابات، بروتين الألبومين، الكاراجينان، ديكلوفيناك.