

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Pharmacotoxicologie



Réf :.....

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

## **MASTER**

### *Thème*

# **Evaluation de l'activité antioxydante** *D'une plante médicinale*

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> IZERROUKEN Ibtissem & M<sup>elle</sup> KERAUCHE Souad**

Soutenu le : **26 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup> Sadaoui -Bougoffa K.</b>	<b>MCB</b>	<b>Président</b>
<b>M<sup>me</sup> Abderrahim-Khamtache S.</b>	<b>MCB</b>	<b>Encadreur</b>
<b>M<sup>r</sup> Tacherfiout M.</b>	<b>MAA</b>	<b>Examineur</b>

**Année universitaire : 2017 / 2018**



# *Remerciements*

*Avant toute chose, nous remercions le bon Dieu tout puissant pour nous avoir donné la force et la patience et de nous avoir gardé en bonne santé pour mener ce travail à terme.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme Khamtache Sabiha** pour avoir accepté de nous encadrer. Nous ne vous remercierons jamais assez pour votre patience, votre soutien et vos précieux conseils. Merci pour la confiance que vous nous avez faite.*

*Nous adressons nos profonds remerciements à **Mme Sadaoui -Bougoffa K** d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons à remercier **Mr Tacherfiout M** de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements notre co-promotrice **Mme Mezahem Tassaditqui** qui nous a dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous accordé nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Les plus chaleureux tous les docteurs et les doctorants (es) **Mr Harfi T, Mr Bribi N, Mr Belkacem N, Melle Yahiaoui S**; qui nous a inlassablement accompagnés durant tout le travail avec son soutien et ses valeureux conseils.*

*Nous profonds remerciements s'adressent à **Mlle Abbar Meriem** pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, ... tout au long de la réalisation de ce mémoire. Nous remercions également tous qui ont participé à la réalisation de ce modeste travail de près ou de loin et surtout aux membres du laboratoire Animalerie et Physicochimiques en particulier: **Naima**.*

*Nous adressons nos remerciements à toute la promotion de Pharmacologie et toxicologie et Nos chères Camarades et collègues.*

***Ibtissem et Souad***

## *Dédicaces*

*Je tiens à remercier Dieu, qui illumine ma route à chaque lever, qui me guide sur le droit chemin,  
qui approfondit et renforce ma foi et qui a fait de moi ce que je  
suis, par*

*Bismi Allah El Rahmane El Rahim !*

*بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ*

*Je dédie ce travail à:*

*A ma très chère maman qui est toujours à mes côtés et qui m'a soutenu durant mes études. Sans  
son affection, ces conseils, ces sacrifices, ces encouragements, ce travail n'aurait jamais pu être  
réalisé. Je te présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu t'accorde  
une longue vie pleine de santé et de bonheur;*

*A mes frères : Nassim, Yacine, Salim, Nacer, Azedin et sa femme (Sylvia) et sa fille (Chaïma) qui  
m'ont soutenu par leurs conseils et encouragements;*

*A Toute la famille IZERROUKEN et KHOUALDI;*

*Je dédie spécialement Lyes, pour ses encouragements, son dévouement et son appui à toutes mes  
entreprises;*

*A ma tonte (Yamina) et son mari (Abdrehman) qui sont toujours à mes côtés;*

*A mes oncles et mes tantes;*

*A mes cousines et cousins;*

*A ma chère binôme Souad qui a partagé avec moi les moments difficile de ce travail et sa  
famille;*

*A mes ami (e) s surtout: Sonia, Lynda, Kenza, Hanane, Souhila, Nabil, Walid, Adel, Fouad,  
Mouhend Sghir, Lila, Meriem, Koko, Abla, Samia, Fouzia, Kenza, Rafik, et surtout Meriem*

*Abbar pour son soutiens;*

*A toute la promo Pharmaco-Toxicologie et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*Ibtissem*

## Dédicaces

*Je tiens à remercier Dieu, qui illumine ma route à chaque lever, qui me guide sur le droit chemin,  
qui approfondit et renforce ma foi et qui a fait de moi ce que je  
suis, par*

*Bismi Allah El Rahmane El Rahim !*

*بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ*

*Je dédie ce travail à: A mes très chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon grand  
amour, mon estime, ma reconnaissance et ma profonde affection. Je ne saurais vous remercier  
pour tout ce que vous avez fait pour moi et ce que vous faites jusqu'à présent. Puisse Dieu, le  
Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue Vie;*

*A mes grands (es) parents;*

*A Toute la famille KERAOUCHE et YAHIAOUI;*

*A ma chère sœur Kahina son mari et sa fille Dania, à qui je souhaite tout le bonheur du monde;*

*A mon frère : Riad;*

*A mes oncles et tantes chacun son nom;*

*A mes cousines et cousins;*

*A ma chère Binôme « Ibtissem » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce  
travail et sa famille; A toute ma famille, proche ou éloignée;*

*Spécialement à mes fidèles amies : Nesrine, Warda, Kahina, Fairouz, Ryma, Amira, Sabrine,*

*Meriem, Lila, Koko, Abla, Samia...ect , et surtout Meriem Abbar pour son soutiens;*

*A mes collègues et à toute la promotion de Pharmaco-Toxicologie.*

*Souad*

# Table des matières

Liste des abreviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction .....1

## **Chapitre I : Revue bibliographique**

I.1. Radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants..... 3

I.1.1. Radicaux libres..... 3

I.1.2. Stress oxydant ..... 4

I.1.3. Antioxydants ..... 6

I.3.1. Polyphénols..... 7

I.2. Généralités sur les *Daphnes*..... 9

*I.2.1. Description botanique de *Daphne gnidium** ..... 9

I.2.2. Systématique ..... 10

I.2.3. Composition chimique ..... 10

I.2.4. Usages thérapeutiques ..... 11

I.2.5. Toxicité du *Daphne gnidium*..... 12

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1. Matériels ..... 13

II.1.1. Matériel végétale..... 13

II.1.2. Animaux..... 13

II.1.3. Matériel et réactifs ..... 14

II.2. Méthodes ..... 14

II.2.1. Séchage, broyage et tamisage .....	14
II.2.2. Extraction des composés phénoliques .....	15
II.2.3 Dosage des extraits éthanolique du <i>Daphne gnidium</i> .....	16
II.3. Détermination l'activité antioxydante <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> du <i>Daphne gnidium</i> .....	19
II.3.1. Détermination l'activité antioxydant <i>in vitro</i> du <i>Daphne gnidium</i> .....	19
II.3.2. Détermination l'activité antioxydant <i>in vivo</i> du <i>Daphne gnidium</i> .....	23

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Rendement d'extraction .....	28
III.2. Teneur en phénols totaux, flavonoïde et tanins.....	28
III.2.1. Teneur en polyphénols.....	28
III.2.2. Teneur en Flavonoïdes.....	30
III.2.3. Teneur des tanins totaux, condensées et hydrolysable .....	31
III.3. Détermination de l'activité anti-oxydante.....	32
III.3.1. Radical DPPH'.....	32
III.3.2. Testes ABTS (Pouvoir anti-radicalaire ABTS <sup>+</sup> ).....	34
III.3.3. Pouvoir réducteur .....	36
III.4. Etude <i>in vivo</i> de l'effet de <i>Daphne gnidium</i> sur le stress oxydatif hépatique .....	38
III.4.1. Evaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT) .....	38
III.4.2. Variation des paramètres du stress oxydatif par l'évaluation des taux hépatique du MDA.....	41
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>44</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>45</b>

### **Annexes**

- **Abs** : Absorbance
- **ABTS** : 2,2-azino- bis-3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonate
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ANOVA** : ANalysis Of Variance
- **BTH** : Butylhydroxytoluène
- **BSA**: Bovin serum albumin
- **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
- **EAT** : Equivalent Acide Tannique.
- **EQ** : Equivalent Quercétine.
- **EC** : Equivalent catéchine
- **EQ** : Equivalent de quercétine
- **ERO** : Espèces réactives de l'oxygène
- **FC** : Folin-Ciocalteu
- **IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50 %
- **M** : Molarité.
- **MDA**: Malondialdéhydes
- **nm**: Nanomètre.
- **pH** : Potentiel d'hydrogène
- **R<sup>2</sup> et r** : Coefficient de corrélation
- **RL** : Radicaux libres
- **SDS** : Sodium dodecyl sulphate
- **TEA** : Triéthylamine
- **BHA** : Butylhydroxyanisole
- **UV** : Ultra-violet



<b>Figure 1 :</b> Causes et conséquences de stress oxydant.....	4
<b>Figure 2 :</b> Mécanismes d'action des EROs sur leurs déférentes cibles.....	5
<b>Figure 3 :</b> Métabolisme de paracétamol.....	6
<b>Figure 4 :</b> Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes.....	8
<b>Figure 5 :</b> Photographies de <i>Daphne gnidium</i> (original).....	9
<b>Figure 6:</b> Quelques structures des composés de <i>Daphne gnidium</i> .....	11
<b>Figure 7 :</b> Localisation géographique de la station de récolte de <i>Daphne gnidium</i> .....	13
<b>Figure 8 :</b> Photographie de souris de souche <i>Balb /c</i> (original).....	14
<b>Figure 9 :</b> Photographie des différentes étapes de préparation de la poudre végétale (original).....	14
<b>Figure 10 :</b> Photographies des différentes étapes d'extraction des composés phénoliques (original).....	15
<b>Figure 11 :</b> Mécanisme de l'interaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	17
<b>Figure 12 :</b> Structure de DPPH• (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH (Où AH est un composé capable de céder un H au radical DPPH).....	20
<b>Figure 13 :</b> Formation du radical cationique ABTS <sup>•+</sup> à partir de l'ABTS.....	21
<b>Figure 14 :</b> Photographie des différentes étapes de l'administration (IG et IP) et les sacrifices (original).....	24
<b>Figure 15 :</b> Rendement d'extraction des racines, tiges et feuilles de <i>Daphne gnidium</i> .....	28
<b>Figure 16 :</b> Teneurs en polyphénols totaux des racines, tiges et feuilles de <i>Daphne gnidium</i> .....	29
<b>Figure 17 :</b> Teneurs en flavonoïde des racines, tiges et feuilles de <i>Daphne gnidium</i> .....	30
<b>Figure 18 :</b> Teneur en tanin totaux, tanin condense et tanin hydrolysable des racines, tiges et feuilles de <i>Daphne gnidium</i> .....	31
<b>Figure 19 :</b> Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des extraits éthanoliques des feuilles, tiges et racines de <i>Daphne gnidium</i> .....	33
<b>Figure 20 :</b> Les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits de <i>Daphne gnidium</i> et le BHA.....	34
<b>Figure 21 :</b> Histogramme représente l'activité scavenger du radical ABTS <sup>•+</sup> des extraits éthanoliques de <i>Daphne gnidium</i> et de Trolox .....	35

**Figure 22 :** Histogramme représente les IC50 des extraits de *Daphne gnidium* et de Trolox...36

**Figure 23 :** Pouvoir réducteur (FeCl<sub>3</sub>) des feuilles, tiges et racine de *Daphne gnidium*.....37

**Figure 24 :** Histogramme représente les IC50 des extraits de *Daphne gnidium* et l'acide ascorbique.....37

**Figure 25 :** Variation de la concentration sanguine des transaminases (ASAT et ALAT) chez les souris témoins traité (paracétamol) et prétraité ( les extraits de tige de *Daphne gnidium* à différentes dose).....39

**Figure 26:** Variation du taux de MDA cytosolique hépatique des souris traitées et non traitées par la forte dose du paracétamol (400 mg/kg).....41

## Liste des tableaux

<b>Tableaux 1</b> : Noms vernaculaires de <i>Daphne gnidium</i> . .....	9
<b>Tableau II</b> : Systematique de <i>Daphne gnidium</i> . .....	10

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Le mode de vie mais aussi les mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ERO dans l'organisme (**Pincemail et al., 2002 ; Haleng et al., 2007**). A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires.

Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser les défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les ERO au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides (**Favier, 2003 ; Haleng et al., 2007**).

Actuellement, beaucoup d'attention est accordée à l'utilisation d'antioxydants d'origine végétale comme les polyphénols et la vitamine C pour remplacer les molécules de synthèse (**Taviano et al., 2013**).

Les plantes ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines grâce à leurs richesses en composants de valeur thérapeutique. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. On distingue plusieurs groupes de métabolites notamment les phénols (phénols simples, acides phénoliques, flavonoïdes, flavones, flavonols, tanins et coumarines) (**Khadhri, 2013**).

Pour ces raisons, dans la présente étude, le choix de la plante a été porté sur *Daphne gnidium* comme une source d'antioxydants naturels. Cette plante médicinale est un arbuste, appartenant à la famille des Thyméléacées. Cette espèce a été largement utilisée dans la médecine traditionnelle dans les pays méditerranéens pour traiter plusieurs maladies telles que, rhumatisme chronique et affections d'arthrose. De multiples travaux ont été attribués aux différentes parties de cette plante et de nombreuses propriétés biologiques favorables ont été signalées comme anticancéreuse, antifongique, antiviral (**Chakravarty, 1976 ; Deiana et al., 2003 ; Vidal et al., 2012 ; Chaabane et al., 2012 ; Chaabane et al., 2016**).

L'objectif de cette étude est d'estimer la teneur en composés phénoliques de la plante médicinale, *Daphne gnidium*, récoltée dans la région de Kendira à Bejaïa, par dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins totaux, tannins hydrolysables et condensés, comme elle vise l'évaluation de leur activité antioxydante *in vitro* par différentes

tests à savoir DPPH, ABTS et pouvoir réducteur, ainsi que l'évaluation *in vivo* de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique contre une intoxication induite par le paracétamol chez la souris.

**Chapitre I :**  
**Revue bibliographique**



# **Chapitre II :**

# **Matériels et méthodes**



# **Références**

# **bibliographiques**

# **Conclusion et** **perspectives**

# **Annexes**

# **Chapitre III :**

# **Résultats et discussion**

# **Introduction**



























## **I.1. Radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants**

### **I.1.1. Radicaux libres**

Ce sont des espèces chimiques caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires sur leur couche de valence, ce qui les rend hautement réactives et donc instables. Le radical libre (RL) tend toujours à remplir son orbitale atomique en arrachant un électron dans les molécules avoisinantes pour devenir plus stable (**Halliwell, 1996**).

Les radicaux libre qui proviennent de l'oxygène sont appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Par contre, les RLs générées à partir de la réaction de l'oxygène avec l'azote sont appelés espèces réactives d'azote (ERN), les principaux radicaux libres et leurs structures sont résumés dans le tableau I en Annexe I (**Pham-Hua et al., 2008**).

#### **I.1.1.1. Origine des radicaux libres**

La production des espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O<sub>2</sub> pour produire de l'énergie au cours des réactions dites, respiration oxydative. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie, elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (RLO) (**Favier, 2003**).

Les autres sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories; les sources endogènes incluant principalement une altération des mécanismes biochimiques comme une réperfusion ou une ischémie de la xanthine oxydase, une surcharge en fer, des altérations mitochondriales ou encore une inflammation...etc, et les sources exogènes telles que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, une faible consommation des fruits et légumes, les réactif chimiques, les solvants industriels et la pollution (**Favier, 2003**).

#### **I.1.1.2. Rôles physiologiques et pathologiques des radicaux libres**

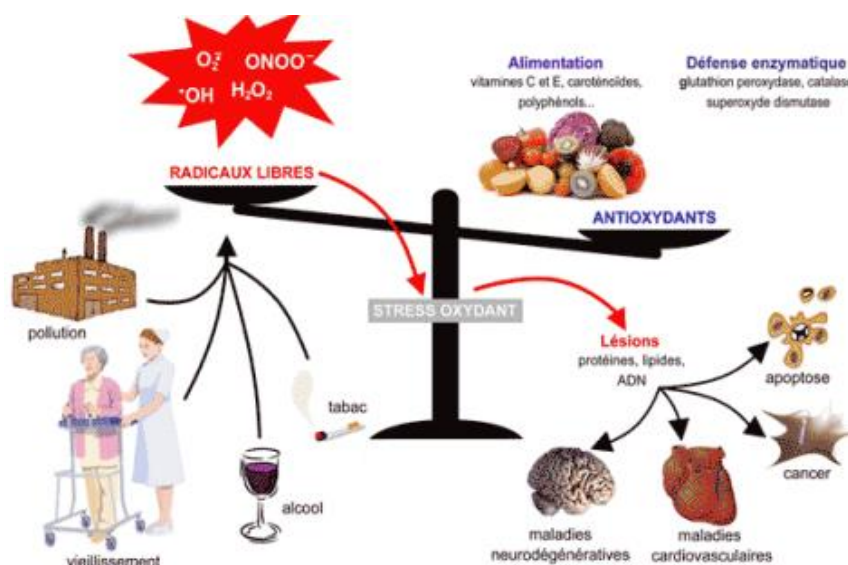
Dans des conditions physiologiques et à des concentrations normales, les EROs remplissent des fonctions biologiques très importantes, comme seconds messagers dans le mécanisme de la transduction de signale dans l'objectif d'une régulation génétique telle que la prolifération cellulaire, l'apoptose, activation du système immunitaires, ou d'un effet métabolique par l'augmentation de la vasodilatation des vaisseaux...etc. (**Dröge, 2002**).

A l'inverse, à des concentrations élevées, ces molécules deviennent dangereuses, car elles sont capables d'activer l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-

inflammatoires ou des protéines. Elles peuvent être en partie responsables de l'apparition du stress oxydatif donc en partant d'un mécanisme physiopathologique réversible vers une maladie grave irréversible, notamment : Les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et maladies neurodégénératives (**Haleng et al., 2007**).

### I.1.2. Stress oxydant

Le stress oxydatif a été défini par **Pincemail et al., (2002)** comme étant un déséquilibre profond entre les systèmes antioxydants et pro-oxydants (figure 1).



**Figure 1** : Causes et conséquences de stress oxydant (**Morandat et Kirat, 2013**).

#### I.1.2.1. Conséquences du stress oxydant

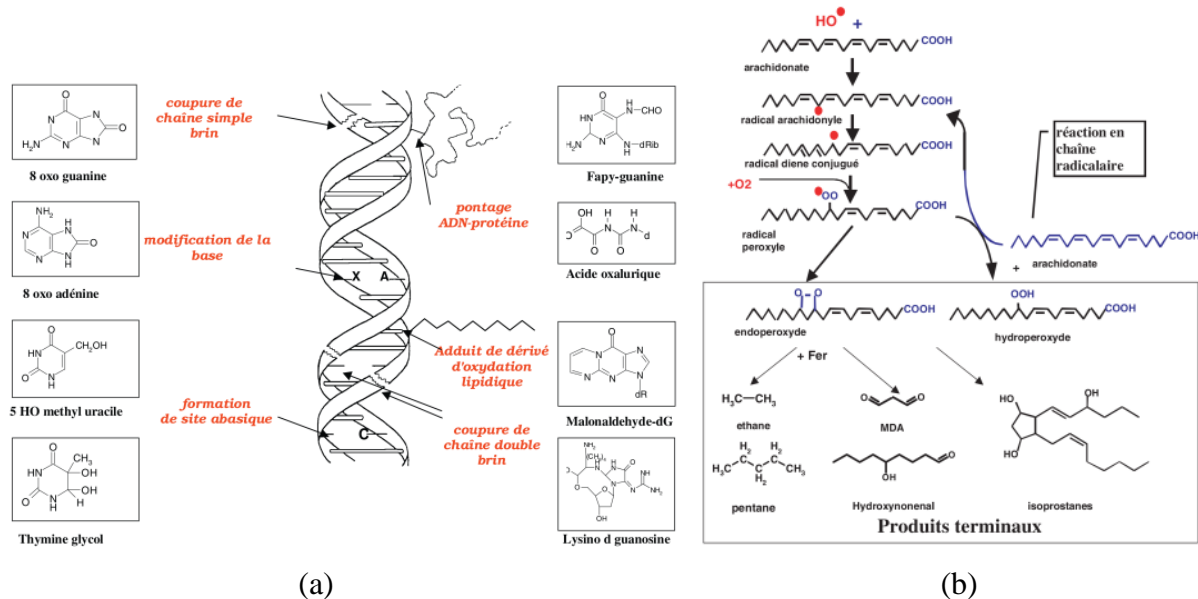
La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (lipides, protéines et ADN) (**Favier, 2003**).

- **Oxydation de l'ADN** : Les espèces réactives de l'oxygène peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Le radical libre réagit avec les bases de l'ADN en s'additionnant sur les doubles liaisons (Figure 2a) (**Haleng et al., 2007**).

- **Oxydation des protéines** : Dans les protéines tous les acides aminés sont des cibles potentielles de l'attaque par les espèces réactives de l'oxygène, particulièrement par le radical hydroxyle, de plus, l'oxydation de la chaîne polypeptidique peut conduire à des cassures ou encore à des réticulations inter ou intramoléculaire. Le dommage oxydatif des protéines peut

affecter la fonction des récepteurs, des enzymes et des protéines de transport, etc., (Haleng *et al.*, 2007).

- Oxydation des lipides :** Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des RL, car ils s'attaquent aux carbones situés entre les deux doubles liaisons, tout en arrachant un hydrogène. Cette étape, est l'un des processus dit « la peroxydation lipidique », qui a des conséquences fâcheuses sur la cellule, en altérant la fluidité de sa membrane lipidique ce qui conduit inévitablement à l'apoptose (Figure 2b) (Haleng *et al.*, 2007).



**Figure 2 :** Mécanismes d'action des EROs s sur leurs différentes cibles (Favier, 2003).

(a) Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

(b) Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.

### I.1.2.2. Stress oxydatif et paracétamol

Le paracétamol est l'analgésique le plus prescrit et vendu dans le monde. Il est également présent sous de multiples formulations, parfois vendues librement sans ordonnance. De ce fait, il reste responsable de l'exposition médicamenteuse toxique la plus fréquente. (Mégarbane, 2017).

Le paracétamol est métabolisé, essentiellement au niveau du foie selon deux voies glucuro-conjugaison (50%) ou sulfoconjugaison (40%) de la dose totale de paracétamol (Figure 03). En situation pharmacologique, seul 10 % du paracétamol est activé par les cytochromes P450 (CYP) en un métabolite réactif, le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)

très réactif qui est immédiatement neutralisé en se liant au glutathion et il est éliminé sous la forme de dérivés mercapturiques dans les urines (Albichr et Hantson, 2017).

En cas de surdosage, les voies de détoxification par glucuroconjugaison et sulfoconjugaison seront saturées. Du fait, qu'une plus grande proportion de paracétamol est oxydée par les cytochromes P450 donc la concentration en métabolite toxique dépasse les capacités de neutralisation par glutathion ce qui entraîne une déplétion en glutathion (GSH). Le NAPQI qui n'est plus détoxifié est ainsi libre, se lie aux protéines cellulaires. Ceci est l'origine d'une hépatotoxicité exprimée par une cytolysse et nécrose hépatocytaire qui correspond biologiquement à une élévation des transaminases (Albichr et Hantson, 2017 ; Mégarbane, 2017).

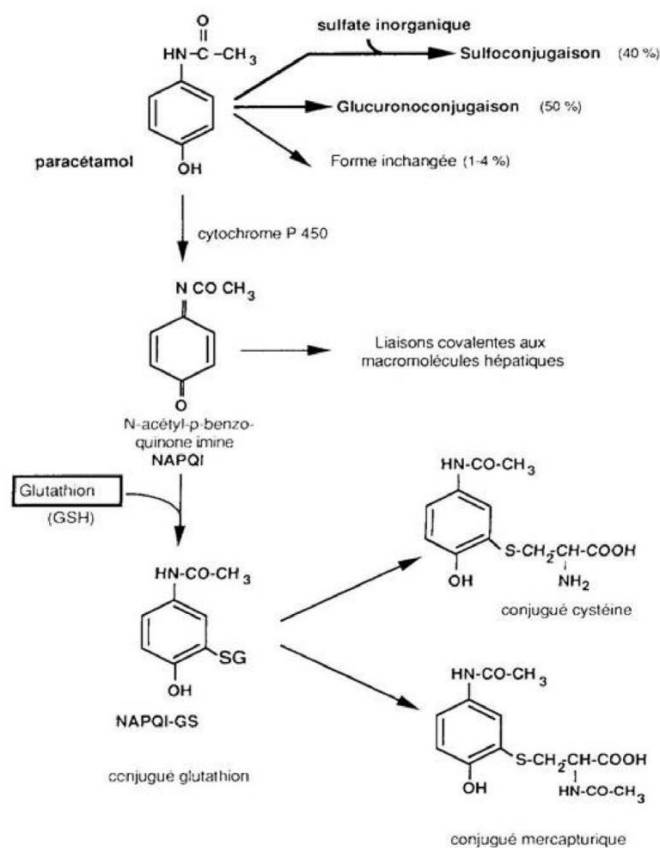


Figure 3 : Métabolisme de paracétamol (Albichr et Hantson, 2017).

### I.1.3. Antioxydants

Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble de complexes et des stratégies des conceptions de système antioxydant (Haleng et al., 2007).

Le terme antioxydant désigne toute molécule ayant la capacité de diminuer ou d'arrêter l'action d'espèces réactives oxygénées, soit directement en inhibant leur production ou bien en

limitant leur propagation, en agissant comme des piègeurs des radicaux libres pour donner finalement des composés stables (**Favier, 2003**).

Selon **Valko et al., (2006)**, un antioxydant devrait à la fois : Agir spécifiquement sur les radicaux libres, chélater les métaux de transition, agir en synergie avec d'autres antioxydants pour se régénérer, agir à des concentrations physiologiques relativement faibles.

### **I.1.3.1. Antioxydants endogènes**

Ceux-ci sont représentés par des enzymes, des protéines présentes naturellement dans l'organisme (**Haleng et al., 2007**).

- ✓ Enzymatique : Comme la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase (**Haleng et al., 2007**).
- ✓ Non enzymatique : Protéines (ferritine, transferrine et albumine), (**Haleng et al., 2007**).

### **I.1.3.2. Antioxydants exogènes**

En général, les antioxydants exogènes de synthèses sont des composés avec des structures phénoliques de divers degrés de substitution alkylique, parmi les antioxydants synthétiques : l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT). Des restrictions à l'utilisation de ces composés, cependant sont imposées en raison de leur cancérogénicité (**Velioglu et al., 1998**).

Alors que les antioxydants naturels peuvent être des composés azotés (alcaloïdes, acides aminés et amines), ou des caroténoïdes ainsi que, l'acide ascorbique, les composés phénoliques (flavonoïdes, tanins et les acides phénoliques) (**Haleng et al., 2007**).

## **I.3.1. Polyphénols**

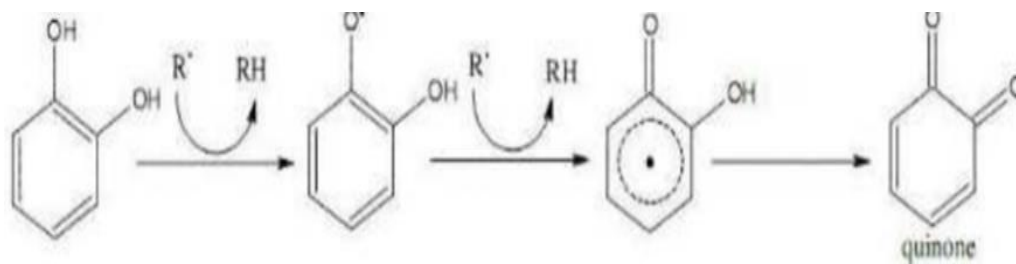
Les composés phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en phytothérapie. Ils suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leurs bénéfices, qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées aux stress oxydant (**Brenton, 2009**).

Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de molécules phénoliques simples avec un poids moléculaire bas tels que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Selon **Bruneton, (2009)**, les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique, qui est directement lié au moins à un groupe hydroxyle libre ou engagé. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées mais aussi les organes, les tissus et les stades physiologiques (**Macheix, 1996**).

Les polyphénols peuvent être regroupés en plusieurs classes selon plusieurs critères, à savoir le nombre d'atomes de carbone constitutifs et la structure de base du squelette carboné (Tableau II en annexe I) (**Macheix, 1996**).

Il a été rapporté que, les composés phénoliques présentent des propriétés anti oxydantes. Les flavonoïdes attribuent un très fort pouvoir antioxydant du fait de la multiplicité de leurs mécanismes d'action (**Fuhrman et al., 1995**). En effet, ils agissent par le biais de plusieurs mécanismes d'action différents afin d'inhiber l'oxydation. Cela se fait soit par piégeage des radicaux libres, soit par un arrachement d'un atome d'hydrogène ou d'un électron figure 4.



**Figure 4** : Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes (**Marfak, 2003**).

## I.2. Généralités sur les *Daphnes*

Le genre *Daphne* est un arbuste appartenant à la famille des Thyméléacées. C'est le genre le plus répandu en raison de leurs valeurs médicinales, Il renferme environ 70 espèces qui sont réparties en Australie, en Asie, en Europe et en Afrique du nord (**Chakravarty, 1976**). 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). *Daphne gnidium* possède plusieurs noms vernaculaire qui sont indiqués dans le tableau III (**Debelmass et Delaveau, 1983**).

**Tableau I** : Noms vernaculaires de *Daphne gnidium*.

<i>Longue</i>	<i>Nom vernaculaire</i>
<b>Nom Français</b>	Garouette, Garou, Sain-bois, Thymélée, Lin batrad, Boi d'oreille, Trintanelle ( <b>Letouzey, 1982</b> ).
<b>Nom Anglais</b>	Flax-leaved Daphne, Flax-leaved Thymelea ( <b>Marshall, 2017</b> ).
<b>Nom Kabyle</b>	Lazzaz, inif, methnane ( <b>Bnouham et al., 2002</b> )
<b>Nom arabe</b>	Arzzaz ( <b>Ballakhdar, 1997</b> ).

### I.2.1. Description botanique de *Daphne gnidium*

Arbrisseau des lieux sablonneux du midi et du sud-ouest. C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, cette plante existe dans tout le Tell de l'Algérie, elle peut atteindre 0.6 à 1.2 m de hauteur ou plus, se caractérise par des rameaux minces très feuillés. Des feuilles persistantes, épaisses de couleur vert claire. De Fleurs blanches odorantes, la floraison de mars à octobre. Le fruit est drupes rouge orangé de 5 à 10 mm de diamètre, la maturité va de juillet à novembre figure 5 (**Couplan et Estyner, 2013 ; Botineau, 2015**).



**Figure 5** : photographies de *Daphne gnidium* (originales).

### I.2.2. Systématique

La classification systématique de *Daphne gnidium* est résumé dans le tableau IV, comme suit : Pareek et sharmas, (2017) ; Dupont et Guignard, (2015); Sovrlić et Manojlović, (2016).

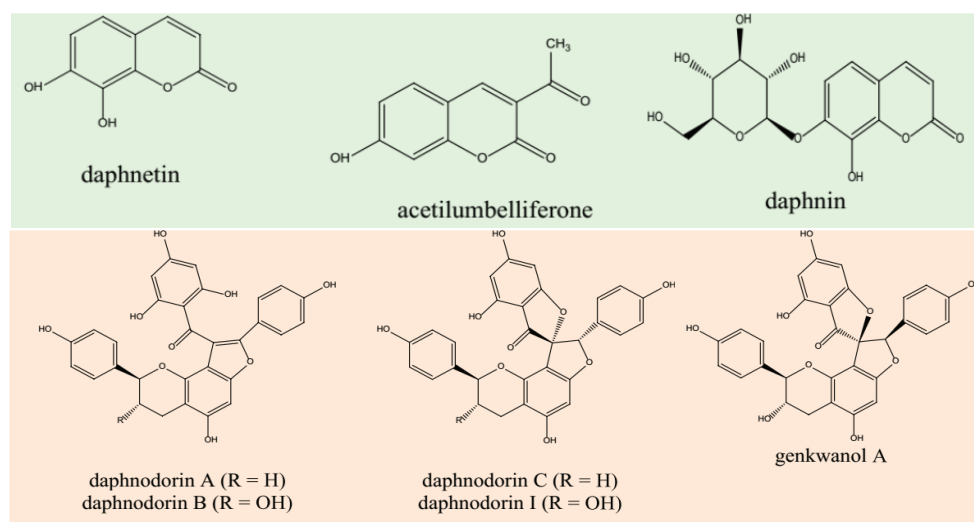
Tableau II : Systematique de *Daphne gnidium*.

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i> ( <i>Magnoliopsida</i> )
Sous- Classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Malvales</i>
Famille	<i>Thymelaeaceae</i>
Genre	<i>Daphne</i>
Espèce	<i>Daphne gnidium L.</i>

### I.2.3. Composition chimique

Les études phytochimiques sur les extraites de *Daphne gnidium*, ont révélé la présence des polyphénols, tels que coumarines (Daphnéline, daphnine, acétylumbelliféron, daphnorétine) , 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' tétrahydroxyisoflavanole et l'â-tocophérol) et des tanins (Deiana et al., 2003, Harizi et al., 2011). Les terpènes et des lignines (Chaabane et al., 2012), les travaux de Couplan et Styner, (2013), ont démontré que les graines et écorces des différentes espèces de *Daphne* renferment des diterpènes toxique, la daphnetoxine (écorce) et la mezereine (graines). Quelques structures chimiques de *Daphne gnidium* sont représentées dans la figure 6.





**Figure 6 :** Quelques structures des composés de *Daphne gnidium* (Sovrlić et Manojlović, 2016).

### I.2.4. Usages thérapeutiques

*Daphne gnidium* est une plante médicinale utilisée dans la pharmacopée actuelle et dans les utilisations traditionnelles (Hseini et Kahouadji, 2007).

Autrefois, le garou a été employé dans le traitement des maladies du système osseux, des affections dartreuses et le rhumatisme chronique. L'écorce du genre *Daphne* et plus particulièrement du *Daphne gnidium* était utilisée en France sous forme de pommade car il possède des propriétés épispastiques (Trousseau et Pidoux, 1875). Les feuilles de garou mélangées avec celles de henné sont utilisées au Maroc, sous forme de cataplasme appliqué sur le cuir chevelu contre la chute de cheveux et les pellicules (Benkhniq, 2010).

De multiples propriétés biologiques ont été attribuées aux différentes parties de cette plante. D'ailleurs, l'extrait méthanolique de l'écorce et des feuilles de *Daphne gnidium* a montré de bonnes activités antibactériennes, antimycosiques et de bonne tolérance cutanée, tandis que, celui de l'écorce a induit des dommages photochimiques au niveau de la peau (Rapisarda et al., 1998).

Cependant, 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 l'EDTA (Deiana et al., 2003).

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

. Une étude réalisée par **Chaabane et al., (2012)**, a apporté que, l' extrait de feuilles de *Daphne gnidium* possèdent une activités antioxydantes et antigénotoxiques puissantes, ceci est probablement dus à la présence de composés tels que les flavonoïdes et les phénols. Cette étude a été confirmée, par des travaux de **Chaabane et al., (2016)** qui ont montré que l'extrait méthanolique de feuilles de *Daphne gnidium*, testé *in vivo* présente des effets antigénotoxiques avec des activités antioxydantes et des effets neuroprotecteurs élevés avec l'inhibition de la buturylcholinestérase.

### **I.2.5. Toxicité du *Daphne gnidium***

Les fruites de tous les daphnés sont très toxiques à cause de la présence de mezereine dans les graines, leur ingestion provoque une ulcération de toutes les muqueuses digestives, avec nausées, spasmes violents, vomissements, hypersalivation, enrrouement et déglutition difficile, diarrhées, et éventuellement convulsions. Il a été considéré que, l'absorption d'une dizaine de fruits peut être mortelle. Même, un contact oculaire peut provoquer une kératite voire la cécité.

Un contacte répété avec l'écorce contenant de la daphnetoxine et des terpènes aux propriétés vésicantes, est susceptible de provoquer une forte réaction inflammatoire, allant jusqu'à induire des cancers cutanés (**Botineau, 2015**).

*Daphne gnidium* est classé parmi les plantes hautement toxiques en raison de la survenue fréquente de certains troubles tels que : des maux de tête, irritation, dilatation pupillaire, convulsions, troubles pulmonaires et la mort (**Bnouham et al., 2002**).



## II. Matériels et méthodes

### II.1. Matériels

#### II.1.1. Matériel végétale

Dans cette étude, les différentes parties (racines, tiges et feuilles) de l'espèce *Daphne gnidium*, ont été utilisées comme échantillons, la plante a été récoltée durant la période de floraison en mois de juillet 2017 à Tazibt (GPS : 36.653,4.967) (google map) dans la commune de Kendira dans la wilaya de Bejaia (Figure 7) et leurs identifications a été effectuée au niveau de laboratoire de biologie végétale de l'Université A/Mira de Bejaia.



**Figure 7:** Localisation géographique de la station de récolte de *Daphne gnidium* (Google map).

#### II.1.2. Animaux

L'étude de l'activité antioxydante *in vivo* a été effectuée sur des souris *Balb/c*, males, ayant un poids corporel de 23 à 30 g avec une moyenne d'âge de 6 semaines, qui ont été fournies par l'institut pasteur d'Alger.

Les souris ont été hébergées à l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université A. Mira de Bejaia, à une température ressentit, dispensé d'un éclairage artificiel faisant alterner des séquences de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les souris ont été réparties aléatoirement dans des cages en polypropylène, où ils ont accès libre à l'eau et à l'alimentation (Figure 8). Les animaux ont bénéficiés d'une période d'adaptation de

15 jours avant leur utilisation. L'aliment standard a été acheté auprès de l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaïa.



**Figure 8:** Photographie de souris *Balb/c* (Animalerie, Univ, Bejaïa) (**Original**).

### II.1.3. Matériel et réactifs

Le matériel et réactifs utilisés pour réaliser cette étude sont représentés à l'annexe I.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Séchage, broyage et tamisage

Après la récolte, les échantillons ont été lavés puis séchés à l'étuve ventilée à une température de 40°C. La matière sèche obtenue est réduite en poudre grâce à un broyeur électrique, puis tamisée en utilisant un tamiseur de granulométrie 125 µm; les fractions dont le diamètre est inférieur à 250 µm sont retenues pour l'extraction et conservées dans un bocal en verre (Figure 9).



**Figure 9:** Photographie des différentes étapes de préparation de la poudre végétale (**original**).

## II.2.2. Extraction des composés phénoliques

L'objectif de l'extraction est de récupérer les molécules bioactives présentées dans les différentes parties de *Daphne gnidium*, notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, Cette extraction a été effectuée selon le protocole décrit par **Benhammou et al., (2008)**.

L'extraction solide/liquide (Figure 10), a été réalisée par macération de la poudre végétale dans l'éthanol (70%) à une température ambiante. 100 g de la poudre végétale ont été macérées dans un volume de 1000 mL de l'éthanol sous agitation douce pendant 72h. Le macérant obtenu a été filtré sur papier Wattman, l'extraction a été répétée quatre fois. L'éthanol a été éliminé du filtrat par évaporation permettant ainsi d'obtenir un extrait sec, ce qui correspond à l'extrait brut.



**Figure 10:** photographies des différentes étapes d'extraction des composés phénoliques (**Original**).

- **Détermination du taux d'extraction**

Le taux d'extraction a été déterminé par le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétal initiale. Le pourcentage d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = (\text{Me} / \text{Mp}) \times 100$$

**D'où :**

**Me:** Masse de l'extrait sec (g).

**Mp:** Masse de la poudre végétale (g).

## II.2.3. Dosage des extraits éthanolique du *Daphne gnidium*

### II.2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

#### Principe

Le dosage des polyphénols totaux est fondé sur la réaction d'oxydo-réduction. Il a été déterminé par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-ciocalteu, qui est constitué de polyhétérocycles qui est un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Les oxydes métalliques produits sont de couleur bleue, dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'échantillon (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon la méthode de **Ryan, (2013)**.

#### Mode opératoires

Un volume de 200  $\mu$ L de l'extrait (1mg/5mL d'éthanol) a été mélangé avec 1,5 mL du réactif de Folin-ciocalteu (10%), après 5 min d'incubation à l'obscurité, 0.8 mL de solution de carbonate de sodium (7.5%) a été ajouté. Le mélange est incubé à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 2h. L'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc préparé dans les mêmes conditions sauf que l'extrait était remplacé par l'éthanol.

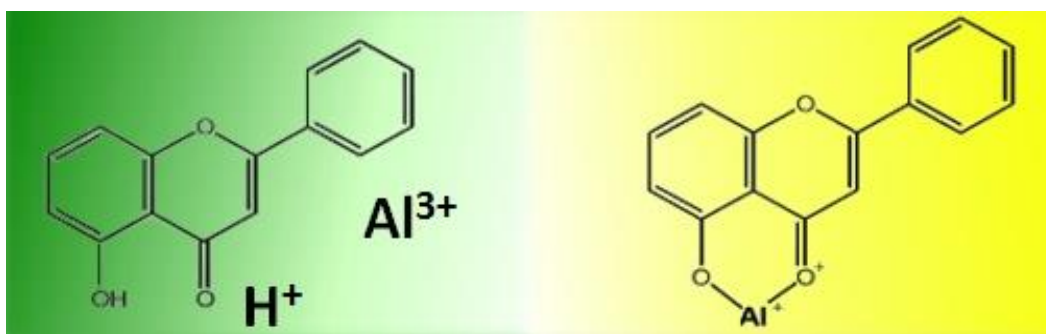
#### Expression des résultats

La concentration des polyphénols totaux a été calculée en se référant à une courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique comme standard, préparée dans les mêmes conditions (Annexe II). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/gramme de matière sèche (mg EAG/g de Ms).

### II.2.3.2. Dosage des Flavonoïdes

#### Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $Al^{+3}$ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Figure11) (**Ribereau-Gayon, 1968**). Le contenu en flavonoïdes des deux extraits a été estimé par la méthode de (**Djeridane et al., 2006**).



**Figure 11** : Mécanisme de l'interaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (**Ribereau-Gayon, 1968**).

### Mode opératoire

Un volume de 1 mL de l'extrait éthanolique (1mg/mL) a été mélangé avec 1 mL de chlorure d'aluminium (2%). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été lue à 448 nm.

### Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par g de la matière sèche (mgEQ/g Ms) (Annexe II).

## II.2.3.3. Dosage les tanins

### ➤ Dosage les 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 a été mesuré à 510 nm (**Hagerman et Butler, 1978**).

Le dosage des tannins totaux a été réalisé en utilisant la méthode de **Hagerman et Butler, (1978)**; qui est basée sur la précipitation de la protéine BSA.

#### Mode opératoire

Un volume de 0.5 mL d'extrait a été ajouté à 1 mL de BSA dissoute dans une solution tampon A (Acide acétique glacial 0.2 M, NaCl 0.17 M, pH=4,9). Après l'incubation à 4°C



pendant 24h pour l'extrait et 15 min pour l'acide tannique, le mélange a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min. Un volume de 1 mL culot a été mélangé avec 2 mL de SDS/TEA dans des tubes à essai. Après l'ajout de 0,5 mL de FeCl<sub>3</sub> dissout dans une solution d'HCl, après homogénéisation et incubation pendant 15 min l'absorbance a été mesuré à 510 nm.

### Expression des résultats

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

#### ➤ Dosage des tanins condensés

##### Principe

La méthode à la vanilline décrite par **Deshpande *et al.*, (1986)**, a été utilisée pour le dosage des tanins condensés.

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 700 nm (**Hagerman et Bulter, 1978**).

##### Mode opératoire

Un volume de 1 mL d'extrait est additionné à 5 mL vanilline/HCl après homogénéisations et incubation pendant 20 min à une température de 30°C. L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

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

#### ➤ Dosage des tanins hydrolysables

##### Principe

Le dosage des tanins hydrolysables a été réalisé par la méthode au chlorure ferrique rapportée par **Mole et Waterman, (1987)**. Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorureferrique et donnent une Coloration bleue mesurée par spectrophotométrie (**Mamadou, 2002**).

### Mode opératoire

Un volume de 1 mL d'extrait est ajouté à 3.5 mL ( $\text{FeCl}_3$  (0.01%) dans HCl (0.01M), après homogénéisation l'absorbance est mesuré à 660 nm (Mamadou, 2002).

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

## II.3. Détermination l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo* du *Daphne gnidium*

Afin de déterminer et d'évaluer le pouvoir antioxydant des différents extraits phénoliques, nous avons procédé à différents tests antioxydants:

- *in vitro* par différentes méthodes à savoir (« scavenger » du radical DPPH,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  et le pouvoir réducteur de fer )

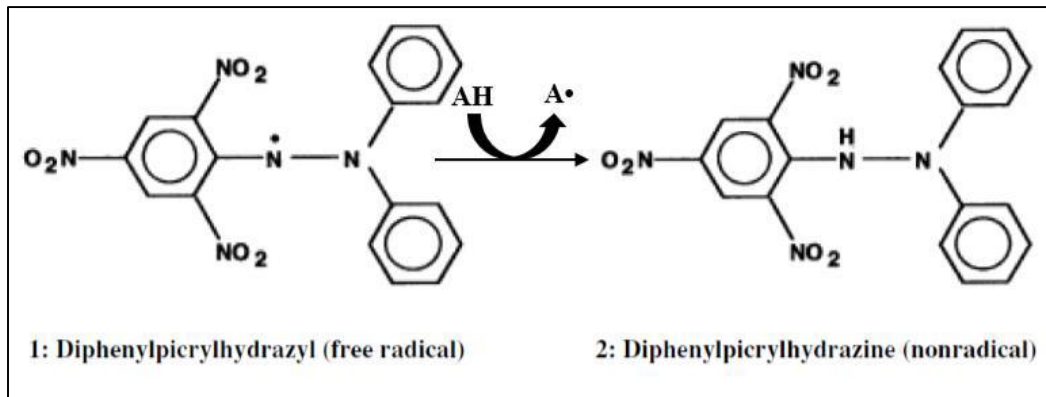
- *in vivo* par l'estimation des paramètres biochimiques des enzymes transaminases (ALAT, ASAT) et Dosage MDA dans les homogénats du foie.

### II.3.1. Détermination l'activité antioxydant *in vitro* du *Daphne gnidium*

#### II.3.1.1. Activité « scavenger » du radical DPPH

##### Principe

C'est un teste colorimétrique qui repose sur la mesure par spectrophotométrie de la capacité d'une substance antioxydant à réduire le radical « DPPH $\cdot$  ». Le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert d'hydrogène provenant d'un antioxydant sur le DPPH $\cdot$  (mauve) qui sera transformé en une molécule neutre et stable DPPH $^+$  (jaune) (Figure 12). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de l'antioxydant et au temps de la réaction, ceci est détecté à 515-518 nm (Popovici *et al.*, 2009) .



**Figure 12 :** Structure de DPPH<sup>•</sup> (radical) et sa réduction par l'antioxydant AH (Où AH est un composé capable de céder un H au radical DPPH) (Molyneux, 2004).

### Mode opératoire

L'effet «scavenger» des extraits éthanoliques des différentes parties (racines, tiges et feuilles) de *Daphné gnidium* vis-à-vis du radical DPPH est mesuré selon la méthode de Kroyer et Hegedus, (2001).

Un volume de 2,7 mL de DPPH (60 µM) est ajouté à 0,3 mL de chaque extrait (à différentes concentrations). L'absorbance a été lue à 517 nm, après une heure d'incubation à l'obscurité. Le témoin est préparé de la même manière sauf que l'extrait est remplacé par l'éthanol. La BHA est utilisé pour la préparation de la courbe standard pour quantifier l'effet scavenger (Annexe III).

### Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est exprimé par la formule suivante:

$$\% \text{ Scavenger du radical DPPH} = (A_T - A_{Ech} / A_T) \times 100$$

D'où :

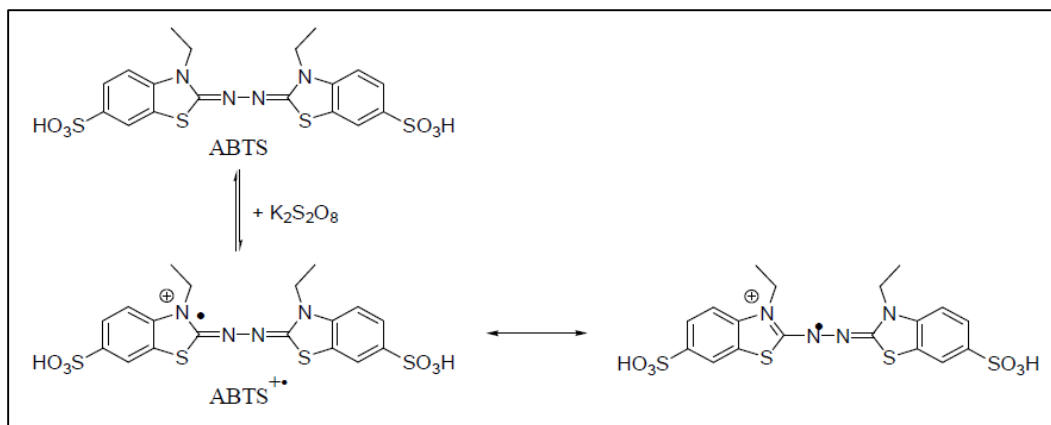
$A_T$ : Absorbance du témoin (300µL éthanol + 2700µL DPPH<sup>•</sup>).

$A_{Ech}$  : Absorbance de l'extrait (300 µL extrait + 2700µL DPPH<sup>•</sup>).

### II.3.1.2. Pouvoir anti-radicalaire ABTS<sup>•+</sup>

#### Principe

La méthode utilisant le radical ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) est l'une des tests les plus utilisés pour la détermination du pouvoir anti radicalaire des antioxydants. Elle est basée sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de couleur bleu-vert en le transformant en ABTS-H<sup>+</sup> incolore par piégeage d'un proton par l'antioxydant. la décroissance de l'absorbance reflète la capacité de capture du radical libre (Figure 13) (Alam *et al.*, 2013). L'activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup> a été mesurée en utilisant le protocole de Re *et al.*, (1999).



**Figure 13 :** Formation du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> à partir de l'ABTS (Sarr *et al.*, 2015).

#### Mode opératoire

La solution du radical ABTS<sup>•+</sup> a été préparée en mélangeant 2,45 mM d'ABTS avec 7 mM de persulfate de potassium. Après 16 heures d'incubation la solution d'ABTS<sup>•+</sup> a été diluée avec l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de  $0,7 \pm 0,02$  à 734 nm.

Un volume de 1.9 mL de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> est ajouté à 150  $\mu$ L d'extrait (à différentes concentrations). L'absorbance a été lue à 734 nm après 7 min d'incubation à l'obscurité. Le témoin est préparé de la même manière sauf que l'extrait est remplacé par l'éthanol. Le Trolox est utilisé pour la préparation de la courbe standard pour quantifier l'effet scavenger (Annexe III).

### Expression des résultats

Le pourcentage de l'activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup> est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ Scavenger du radical ABTS}^{\bullet+} = (A_T - A_{Ech} / A_T) \times 100$$

D'où :

**AT**: Absorbance du témoin (1,9 mL d'ABTS<sup>•+</sup> + 150 µL d'éthanol)

**AEch**: Absorbance de l'extrait (1,9 mL d'ABTS<sup>•+</sup> + 150 µL d'extrait)

### II.3.1.3. Pouvoir réducteur

#### Principe

Le pouvoir réducteur est estimé par l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup>(FeCl<sub>3</sub>) en fer ferreux Fe<sup>2+</sup> en présence d'un agent chromogène le ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Bijoy *et al.*, 2008). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Öztürk *et al.*, 2007).

#### Mode opératoire

Le pouvoir réducteur des l'extraits éthanoliques a été déterminé selon la méthode de Lim *et al.*, (2006).

Un volume de 0.5 mL d'extrait à différentes concentration est additionné à 20 µL de tampon phosphate (0,2 mM, pH=6,6) suivi de 1 mL de ferricyanure de potassium à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis 1 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés au mélange avant d'être centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min. Un volume de 1 mL du surnageant a été mélangé avec 1 mL d'eau distillé et 0.2 mL de chlorure ferrique (0.1%) dans des tubes à essai. après homogénéisation et incubation à une température ambiante pendant 10 min, L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

L'acide ascorbique est utilisé pour la préparation de la courbe standard pour quantifier l'activité réductrice (Annexe III).

## II.3.2. Détermination l'activité antioxydant *in vivo* du *Daphne gnidium*

### II.3.2.1. Evaluation l'effet hépato-protecteur d'extrait de tige de *Daphne gnidium* contre l'intoxication par le paracétamol

#### Principe

Pour mettre en évidence l'activité hépatoprotective de l'extrait éthanolique de tige de *Daphne gnidium* (basée sur des études *in vitro*), un modèle expérimental d'hépatotoxicité induite par le paracétamol a été sélectionné.

#### Mode opératoire

La technique utilisée a été décrite par **Kanbur et al., (2009)** et **Forouzandeh et al., (2013)**.

56 souris ont été utilisés et réparties en 7 groupes de 8 chacun (Tableau III). Les extraits bruts de *Daphne gnidium* (25 et 75 mg/Kg) ainsi que le véhicule carboxyméthylcellulose (CMC à 0,8 %) et le standard (Fluimex: Acétylcystéine à 200 mg/kg) ont été administrés aux souris par voie intra-gastrique (IG), à l'aide d'une sonde gastro-œsophagienne alors que la voie intra-péritonéale (IP), a été adoptée pour le paracétamol (PCM) (400 mg/Kg).

**Groupe 1** (Véhicule / témoin) : A reçu CMC (IG) et l'eau physiologique (IP).

**Groupe 2** (Control le 25 mg/Kg) : A reçu une dose de 25 mg /kg de l'extrait de tige (IG) et l'eau physiologique (pour évaluer la toxicité de l'extrait).

**Groupe 3** (Control le 75 mg/Kg) : A reçu une dose de 75 mg /kg de l'extrait de tige (IG) et l'eau physiologique (pour évaluer la toxicité de l'extrait) (IP).

**Groupe 4** (PCM) : A reçu le CMC (IG) et une dose de 400 mg/kg de PCM (IP).

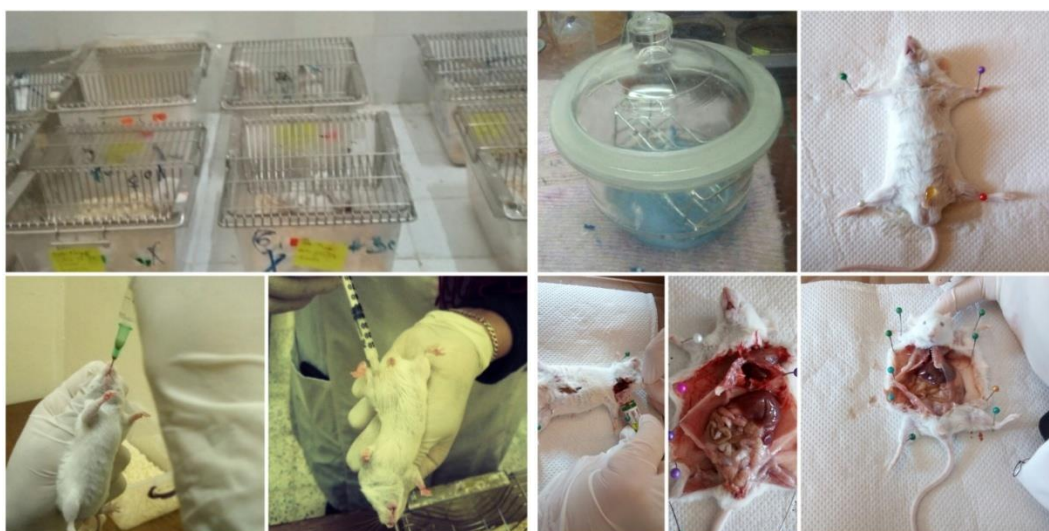
**Groupe 5** (Test 25 mg/Kg) : A reçu une dose de 25mg/kg de l'extrait de tige (IG) et 400mg/kg PCM (IP).

**Groupe 6** (Test 75 mg/Kg) : A reçu une dose de 75mg/kg de l'extrait de tige (IG) et une dose de 400 mg/kg de PCM (IP).

**Groupe 7** (Standard) : A reçu une dose 200mg/kg de médicament de référence (Fluimex) (IG) et une dose de 400mg/kg de PCM (IP).

L'effet préventif de l'extrait contre l'hépto-toxicité induite par le paracétamol a été évalué après administration de l'extrait brut des tiges de *Daphne gnidium* pendant 5 jours. Au 5<sup>ème</sup> jour, le paracétamol a été injecté 1h après administration de la dernière dose de l'extrait. 24h après, les souris ont été sacrifiées par décapitation sous légère anesthésie à la vapeur de chloroforme, cela après un jeûne nocturne.

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la jugulaire et mis dans des tubes héparinés et les foies ont été récupéré après dissection, homogénéisé et utilisé pour une analyse ultérieure (Figure 14).



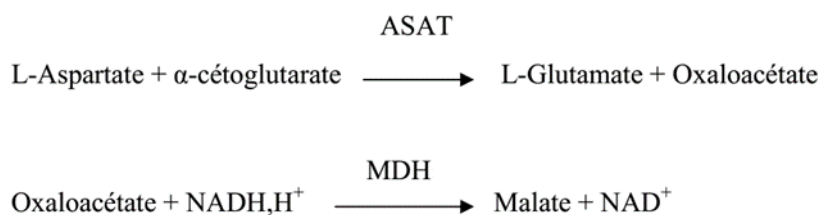
**Figure 14:** Photographie des différentes étapes l'administration (IG et IP) et les sacrifices (original).

### II.3.2.1.1. Estimation des paramètres biochimiques

Le dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT) a été analysé selon les instructions de fabrication de la fiche technique du Kit SPINREACT (Espagne). La concentration de ces enzymes est exprimée en unité internationale par litre de substrat (UI/L). (1UI correspond à la quantité d'enzymes qui transforment 1 $\mu$ mol de substrat/min) ( $\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L}$  de AST ou ALAT).

#### ❖ Principe Aspartate aminotransférase (ASAT)

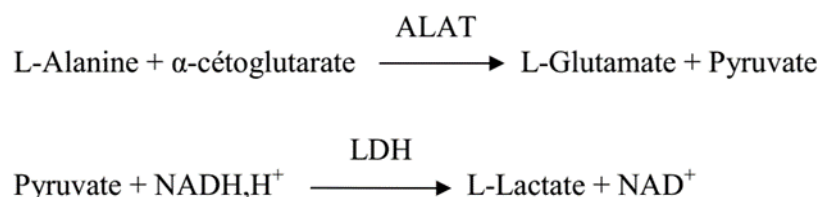
L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi le glutamate oxaloacétate transaminase (TGO) catalyse le transfert d'un groupe aminé d'aspartate vers l' $\alpha$ -cétoglutarate avec formation de glutamate et d'oxaloacétate. Ce dernier est réduit en malte déshydrogénase (MDH) et NADH,H<sup>+</sup> (Nicotinamide adénine dinucléotide).



Le taux de diminution de la concentration en  $\text{NADH,H}^+$  mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ASAT (Davila et al., 1989).

#### ❖ Principe Alanine amino transférase (ALAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT) appelée aussi le glutamate-pyruvate transaminase (TGP) catalyse le transfert d'un groupe animique vers la  $\alpha$ -cétoglutarate avec la formation de glutamate et pyruvate. Ce dernier est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogéné (LDH) et  $\text{NADH,H}^+$ .



Le taux de la diminution de la concentration en  $\text{NADH,H}^+$  mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, est proportionnel à l'activité catalytique de ALAT (Davila et al., 1989). Le mode opératoire est représenté dans l'annexe I.

### II.3.2.1.2. Dosage hépatique du malondialdéhyde MDA

#### Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux de la peroxydation lipidique formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres.

La détermination de la concentration de MDA est réalisée par la réaction de celui-ci avec deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide et à chaud. Cette réaction forme un complexe de couleur rose. Ce complexe extractible par les solvants organiques, comme le n-butanol, qui absorbe à 532 nm (Lefèvre et al., 1998). Afin d'évaluer le taux hépatique du MDA, le protocole de Ohkawa et al., (1979) a été suivi avec quelques modifications.



### Mode opératoire

#### ❖ Préparation de la fraction cytosolique

Après les sacrifices et la dissection, le foie des souris a été récupéré dans de l'eau physiologique puis pesé grâce à une balance de précision, 2g de foie a été écrasé à l'aide d'un mortier en porcelaine puis homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur avec 6 mL de tampon phosphate (0.15M à pH7.4) contenant du KCL 1.15%. L'homogénat a été centrifugé à 10000 tr/min pendant 20 min à 4°C dans le but d'éliminer les débris nucléaire (Olaleye *et al.*, 2014). Le surnageant final a été ensuite récupéré pour l'utilisé comme source d'enzymes cytolitiques et mis dans des eppendorfs qui ont été conservés à -80 °C jusqu'à usage ultérieur.

#### ❖ Dosage hépatique du malondialdéhyde

1 mL de TBA d'acide thiobarbiturique (0.67%) et 0.5 mL d'acide trichloroacétique à 20% (TCA) ont été additionnés à 0.5 mL de solution cytosolique et le mélange a été chauffé à 100°C pendant 15 min, après refroidissement, 4 mL de n-Butanol a été ajouté au mélange réactionnel puis centrifugé à 3000 Tr/min pendant 15 min. L'absorbance des différents échantillons ont été mesurés à 530 nm par un spectrophotomètre. Contre un blanc préparé dans les mêmes conditions sans l'homogénat. La quantité de MDA ont été exprimés en nmoles MDA / mg de tissu hépatique en utilisant le coefficient d'extinction molaire du complexe MDA-TBA ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Le tetraetoxypropane (TEP) est utilisée pour la préparation de la courbe standard pour quantifier la tenure MDA (Annexe III).

## II.4. Analyses statistiques

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais et les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  l'écart type. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant logiciel Origine 8. Les données expérimentales ont été analysées à l'aide de l'Excel 2007.

Les résultats ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA/MANOVA) suivie d'une comparaison multiple des moyennes par le bais du logiciel Statistica (5.5) et la comparaison des données est prise à la probabilité (**P<0,05**).

P>0,05 la différence n'est pas significative ns ;

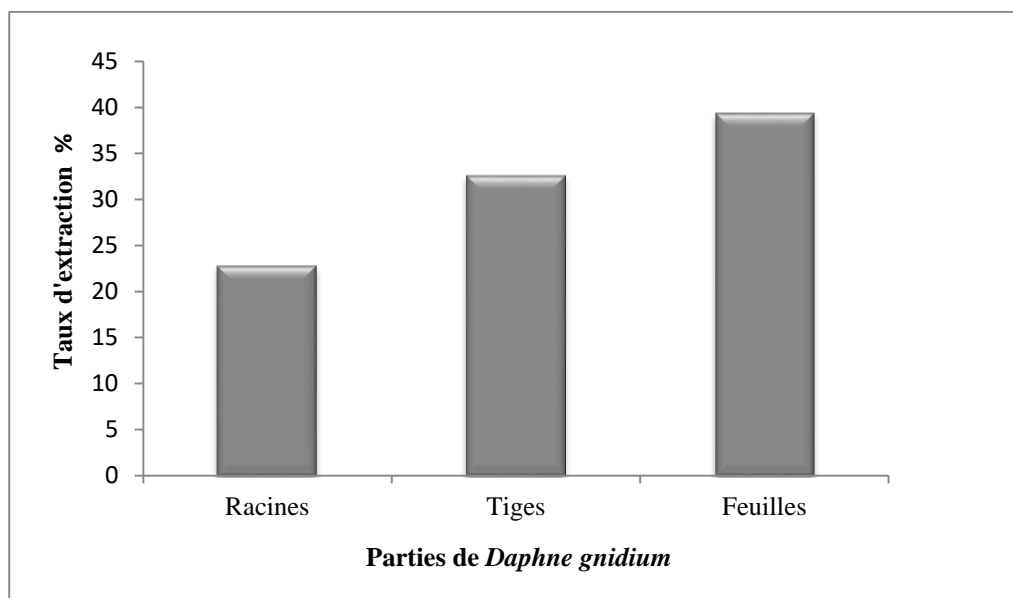
$0,05 > P > 0,01$  différence significative \* ;

$0,05 > P > 0,001$  différence hautement significative \*\*

$P < 0,001$  différence hautement significative \*\*\*

### III.1. Taux d'extraction

Les résultats obtenus ont montré que de l'extrait éthanolique des feuilles de *Daphne gnidium* ont donné un meilleur rendement d'extraction avec un pourcentage de 39.3% suivies par les tiges 32.56 % et les racines 22.79 % (figure 15).



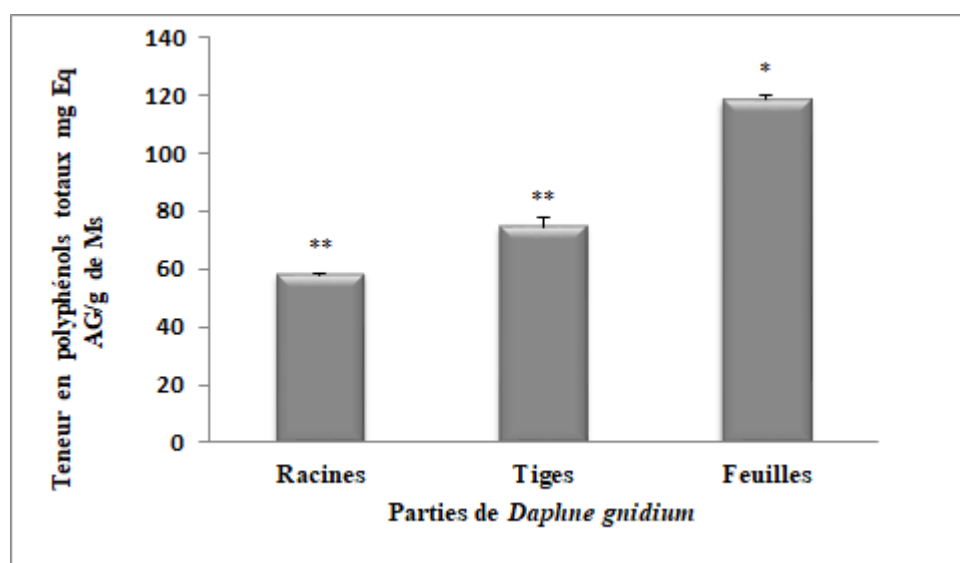
**Figure 15 :** Taux d'extraction des racines, tiges et feuilles de *Daphne gnidium*.

Des travaux réalisés par **Ameni et al., (2015)**, ont montré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Daphne gnidium* a donné un taux d'extraction inférieur (13.65%) à ceux obtenus au cours de cette étude. En effet, la période de la récolte, la procédure de séchage, la granulométrie des particules, la température d'extraction, le temps de macération, le volume ainsi que la nature du solvant, constituent les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'extraction (**Riberau-Gayon, 1968**).

### III.2. Teneur en phénols totaux, flavonoïdes et tanins

#### III.2.1. Teneur en polyphénols

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, la quantification du taux des polyphénols totaux présents dans l'extrait éthanolique des différentes parties racines, tiges et feuilles de *Daphne gnidium* a été estimée à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe II). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 16.



**Figure 16** : Teneurs en polyphénols totaux des racines, tiges et feuilles de *Daphne gnidium*.

L'extrait éthanolique des feuilles a montré une teneur élevée en polyphénols ( $301.47 \pm 1.26$  mg EAG/g Ms), suivies par les racines ( $254.32 \pm 0.64$  mg EAG/g MS), puis les tiges ( $228.54 \pm 3.32$  mg EAG/g MS).

L'analyse statistique a révélé une différence significative entre les racines et les tiges, entre les tiges et les feuilles et une grande différence significative entre les feuilles et les racines ( $p < 0,05$ ).

Cependant, les valeurs obtenues au cours de cette étude, sont supérieurs aux teneurs obtenues par **Chaabane et al., (2012)** lorsqu'ils ont travaillé sur les extraits méthanolique ( $157.47$  mg EAG/g de MS) et d'acétate d'éthyle ( $227.75$  mg EAG/g de MS) des feuilles de la même espèce. De même, pour les résultats rapportés par **Amine et al., (2015)**, sur les extraits chloroformique ( $129,65 \pm 4.82$   $\mu$ g EAG/g de MS) et méthanolique ( $137,08 \pm 7,66$   $\mu$ g EAG/g de MS) des partie aériennes de *Daphne gnidium*.

La quantité des polyphénols totaux peut varier selon un certain nombre de facteurs : elle due à L'origine géographique, la période de la récolte, l'organe végétal utilisé, ainsi que, la méthode d'extraction, la nature du solvant utilisé et le protocole de dosage (**Hayouni et al., 2007**; **Sultana et al., 2007**).

### III.2.2. Teneur en Flavonoïdes

L'analyse statistique a montré une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les teneurs en flavonoïdes de tous les organes de la plante. Les résultats sont représentés dans la figure 17.

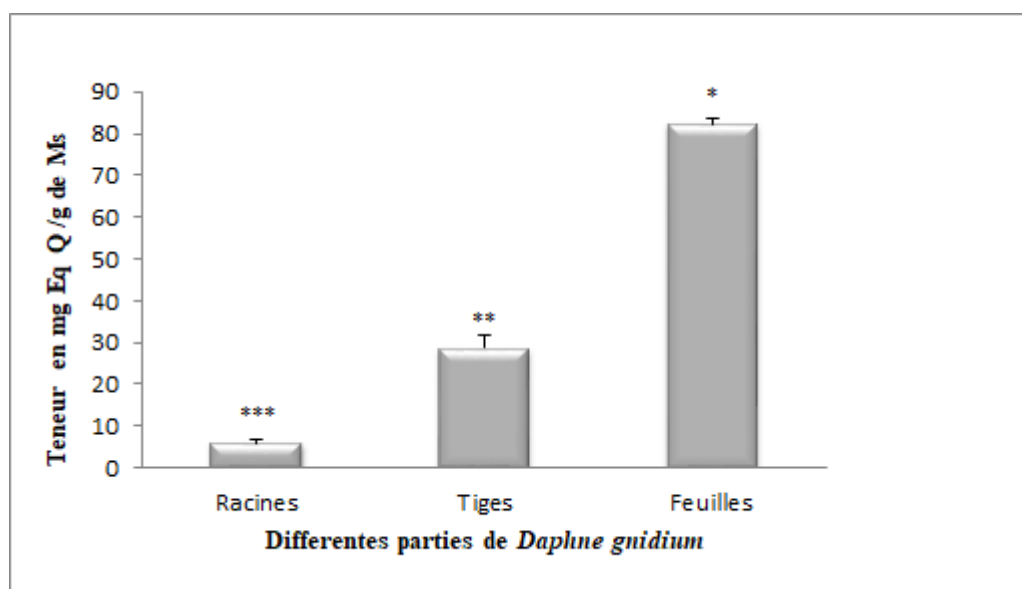


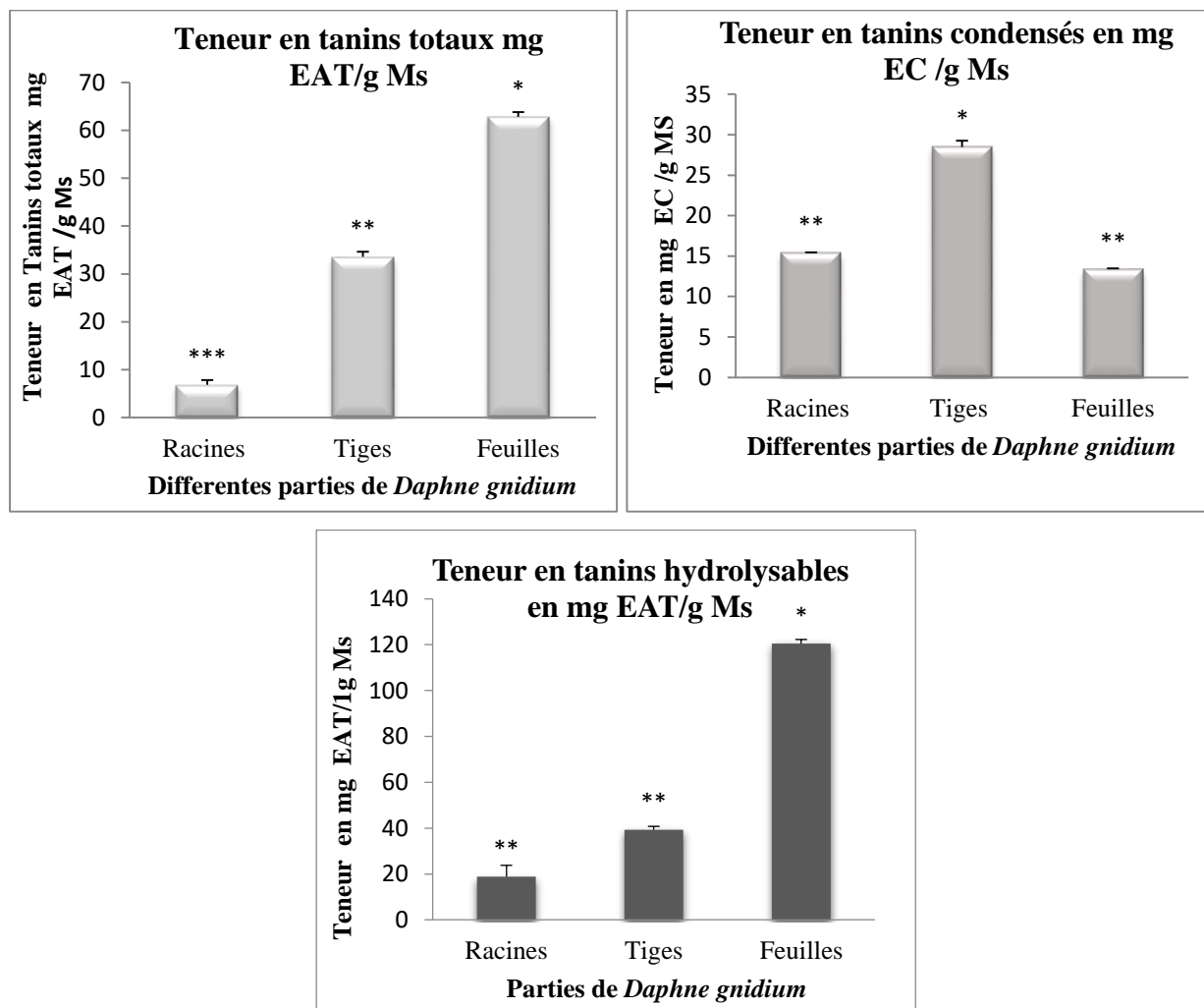
Figure 17 : Teneurs en flavonoïde des racines, tiges et feuilles de *Daphne gnidium*.

L'extrait éthanolique de feuilles a présenté la teneur en flavonoïdes la plus élevée qui est de  $82.26 \pm 1.26$  mg EQ/g de MS, suivi par l'extrait des tiges avec une teneur de  $28.65 \pm 3.32$  mg EQ/g de MS, puis l'extrait de racines qui renferme une teneur plus faible en flavonoïde de l'ordre de  $5.92 \pm 0.64$  mg EQ/g de MS. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, les flavonoïdes se localisent généralement dans les parties aériennes des végétaux (feuilles, fruits et tiges), vu qu'ils jouent un rôle important dans la protection.

En modifiant, le solvant d'extraction, **Chaabane et al., (2012)**, ont obtenu des extraits méthanolique ( $114.57$  mg EAG/g de MS) et d'acétate d'éthyle ( $264.57$  mg EAG/g de MS) de feuilles de *Daphne gnidium* plus riches en flavonoïdes. De même, **Amine et al., (2015)**, en travaillant sur la même espèce, ont obtenu des teneurs plus faibles en flavonoïdes ( $22.22 \pm 1.48$   $\mu$ g EAG/g de MS) pour l'extrait méthanolique de tiges, et ( $36.55 \pm 1.721$   $\mu$ g EAG/g de MS) pour l'extrait chloroformique des feuilles. Cette différence peut être attribuée aux différents facteurs tels que l'origine de la plante, conditions de stockage, méthode d'extraction et solvant d'extraction (**Bruneton, 1999**).

### III.2.3. Dosages des tanins totaux, condensés et hydrolysables

Les taux en tanins totaux, tanins hydrolysables et tanins condensés des extraits éthanoliques ont été déterminés par différentes méthodes. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 18.



**Figure 18 :** Teneur en tanins totaux, tanins condensés et tanins hydrolysables des racines, tiges et feuilles de *Daphne gnidium*.

D'après les résultats obtenus pour tanins totaux, l'analyse statistique montre une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les différentes parties de la plante.

D'après la figure 18, il a été constaté que les feuilles sont plus riches en tanins totaux avec une teneur de  $62.86 \pm 3.96$  mg EAT/g Ms, suivies par les tiges ( $33.61 \pm 1.94$  mg EAT/g MS) et une faible teneur avec les racines ( $6.79 \pm 2.36$  mg EAT/g MS).

D'après les résultats obtenus pour tanins hydrolysables, aucune différence significative n'a été révélée entre les racines et les tiges. Une différence significative par contre a été constatée

entre les feuilles et les racines ( $p < 0.05$ ). En effet, les feuilles ont obtenues une teneur très importante de  $120.44 \pm 1.85$  mg EAT/g Ms, suivies par les tiges et les racines qui ont données des teneurs de l'ordre de  $39.31 \pm 1.44$  et  $18.81 \pm 4.95$  mg EAT/g Ms respectivement.

Pour les tanins condensés, aucune différence significative n'a été présentée entre les feuilles et les racines ( $p < 0.05$ ), mais une différence significative a été signalée entre les tiges et les autres organes de la plante ( $p < 0.05$ ). Les tiges sont les plus riches en tanins condensés avec une teneur de  $28.48 \pm 0.77$  mg EC/g Ms, suivies par les racines ( $15.43 \pm 0.046$  mg EC/g MS) et les feuilles ( $5.27 \pm 0.07$  mg EC/g MS).

Les résultats pour tanins totaux de l'extrait éthanolique des feuilles sont inférieurs à ceux obtenus à partir d'une étude menée par **chaabane et al., (2012)** sur la même espèce, l'extrait d'acétate d'éthyle a donné une valeur de 136.64 mg EAT/g MS et l'extrait méthanolique a obtenu 116 mg EAT/g MS. Mais, elle est supérieur à celle menée par **Harizi et al., (2011)** sur les extraits d'acétate d'éthyle des feuilles de *Daphne gnidium* qui ont obtenus une teneur de 54 mg EAT/g MS.

L'extrait éthanolique des tiges de *Daphne gnidium* a exhibé une teneur en tanins condensés de l'ordre de  $28.48 \pm 0.77$  mg EC/g MS, qui est nettement supérieur à celle rapportée par **Dif et al., (2014)** ( $3.5$  mg EC/g Ms) obtenu avec l'extrait méthanolique des feuilles de la même espèce.

Les écarts trouvés entre les résultats obtenus et ceux de la bibliographie sont probablement due aux conditions d'extraction, provenance géographique de l'espèce et paramètres biotiques...etc (Ribereau-Gayon, 1968).

La présente étude a montré que les tanins hydrolysables sont majoritaires mai aucune étude sur le dosage des tanins hydrolysables n'a été rapportée dans la littérature.

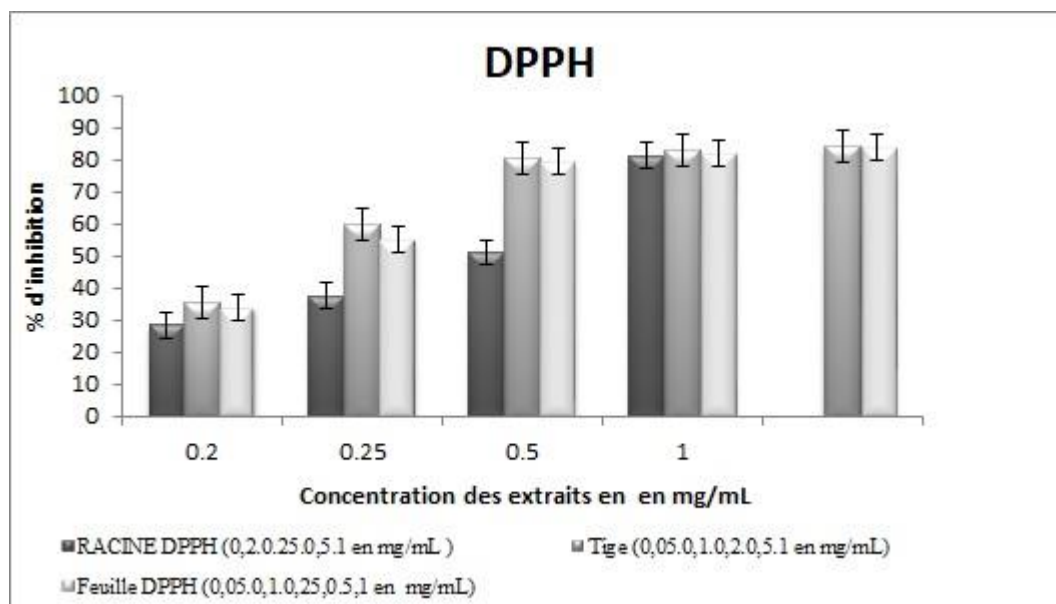
### III.3. Détermination de l'activité antioxydante

Dans la présente étude, l'activité antioxydante des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* a été évaluée *in vitro*. Trois tests ont été utilisés, les deux premiers consistent à évaluer la capacité de transfert d'électron et/ou de proton par les radicaux DPPH et ABTS. Le troisième est le pouvoir réducteur qui mesure la capacité de transfert d'électron par la réduction des ions fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ).

#### III.3.1. Activité scavenger du radical DPPH

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité anti-radicalaire dont la méthode utilisant le radical DPPH• (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyle). C'est une méthode simple, rapide et largement utilisée pour estimer la capacité des substances d'agir en tant que piègeurs

des radicaux libres ou donateurs d'hydrogène, et d'évaluer ainsi leur activité antioxydante (Milardovic et al., 2006). Les pourcentages d'inhibitions de l'extrait sont représentés dans la figure 19.



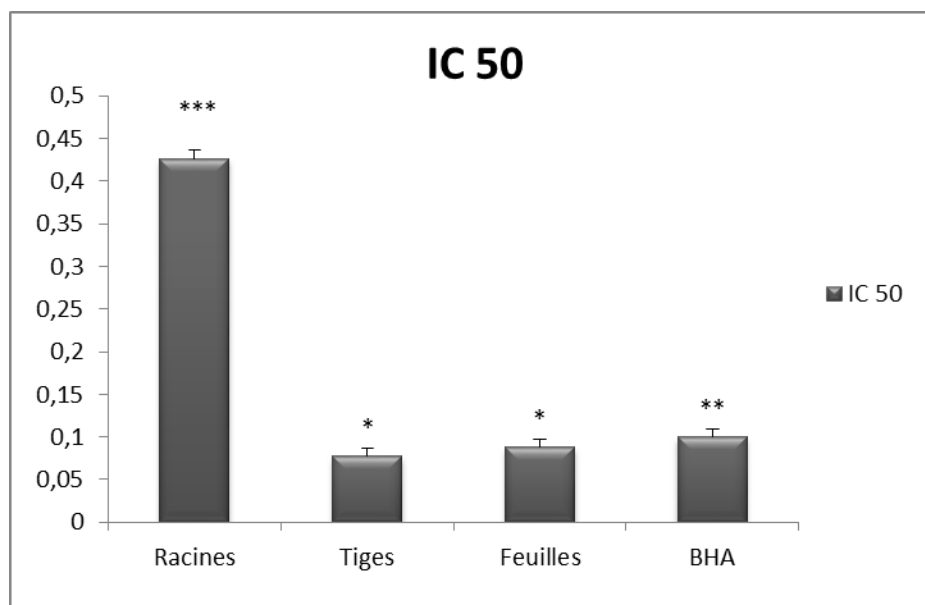
**Figure 19** : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH\* par les extraits éthanoliques des feuilles, tiges et racines de *Daphne gnidium*.

D'après les résultats obtenus dans les figures 19 ci-dessus, il a été constaté que, le pourcentage de réduction du DPPH augmente en fonction de la concentration d'extrait étudié, les pourcentages d'inhibition les plus élevés ont été obtenus avec les tiges ( $84.3 \pm 3.1\%$ ), les feuilles ( $83.94 \pm 4.6\%$ ) et les racines ( $81.11 \pm 2.6\%$ ) à une concentration de 1mg/ml.

L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus à partir des tiges, racines et feuilles de *Daphne gnidium* et du standard a été exprimée en IC50, qui est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel, Plus la valeur d'IC50 est faible plus la capacité réductrice est forte (Falleh et al., 2008).

Selon les résultats illustrés en figure 20, les tiges de *Daphne gnidium* sont dotées d'un pouvoir antioxydant puissant avec une IC50 de l'ordre de 0.077mg/mL, suivies par les feuilles (0.087 mg/mL). Ces valeurs indiquent une capacité inhibitrice plus puissante par rapport à la BHA qui a donné une IC50 de 0.167 mg/mL. Les racines ont exhibé l'IC50 la plus faible qui est de l'ordre de 0.4266 mg/mL. Donc l'efficacité anti-radicalaire est classée comme suit : tiges > feuilles > Racines.





**Figure 20 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> exercées par les extraits de *Daphne gnidium* et de BHA.

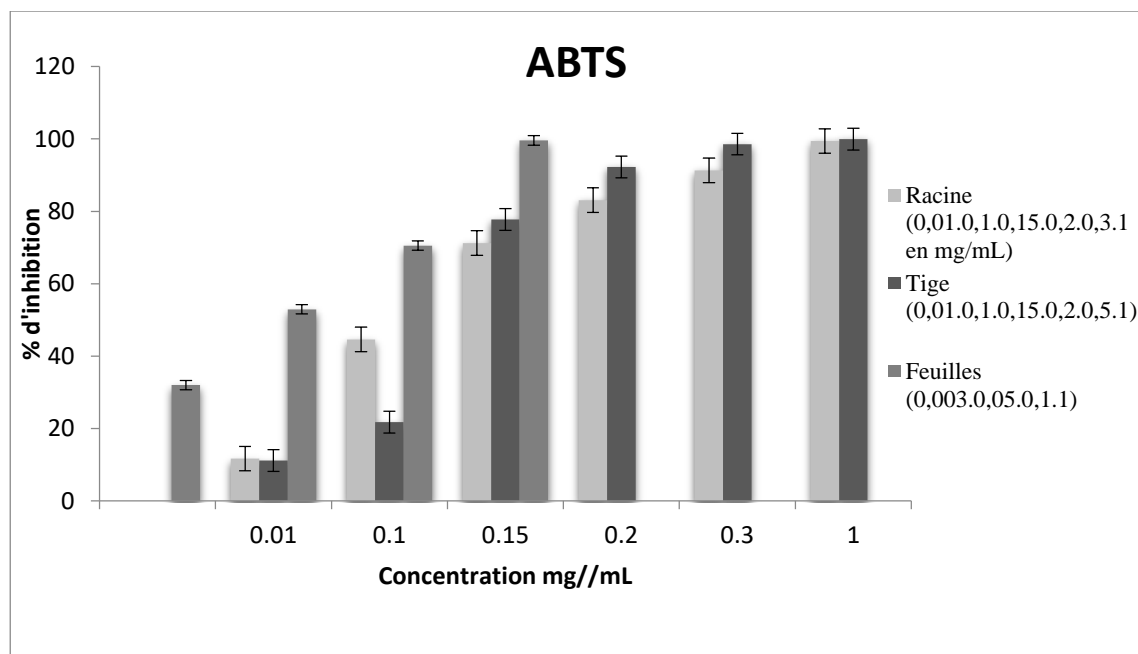
Une étude menée par **Sanda et al., (2015)**, sur l' extrait méthanolique de *Daphne gnioides* a montré des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0.48, 0.46 et 0.27 mg/mL pour les feuilles, tiges et racines respectivement, et des IC<sub>50</sub> de l' extrait méthanolique de *Daphne pontica* de l'ordre 1 mg/mL, 0.38 mg/ml et 0.2 mg/mL pour les feuilles, tiges et racines respectivement. Ces résultats sont hautement inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude.

**Manojlovic et al., (2014)** ont rapporté que les extraits de Chloroforme de *Daphne blagayana*, récoltée en Kopaonik en Serbie, ont donné des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 25.24 µg/mL et 20.25 µg/mL pour les feuilles et tiges respectivement, de même leur extraits méthanoliques de tiges et de feuilles ont montré des IC<sub>50</sub> de 21.09 µg/mL et de 20.95 µg/mL respectivement.

La présence des composés phénoliques est probablement responsable de l'activité antioxydante des extraits étudiés, car il a été démontré que, les molécules antioxydantes réduisent et décolorent le DPPH<sup>•</sup> en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**Gheffour et al., 2015**).

### III.3.3. Activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup>

Les pourcentages d'inhibition du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> pour une concentration de 0.1 mg/ml de l' extrait éthanolique des racines, tiges et feuilles sont représentés dans la figure 21.

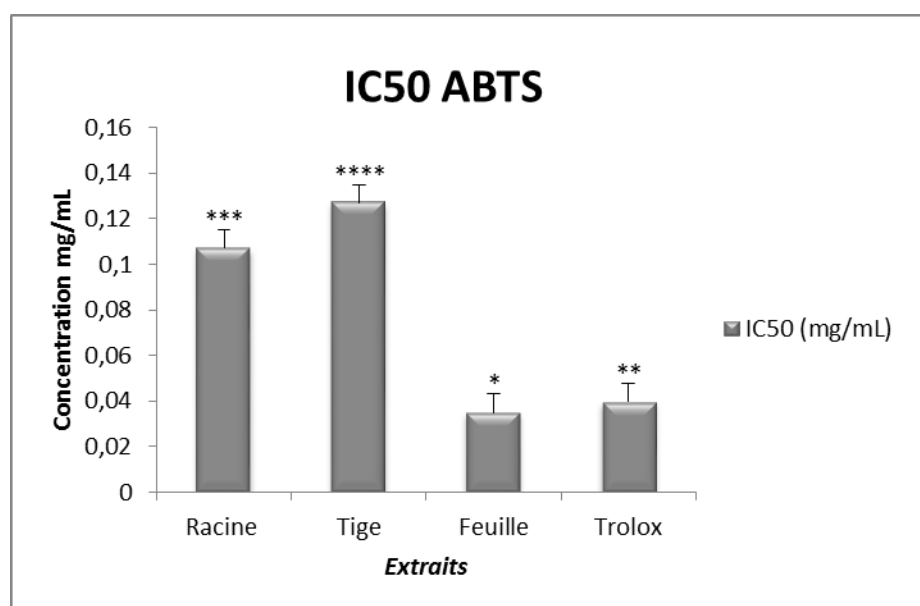


**Figure 21** : Histogramme représentant l'activité scavenger du radical ABTS<sup>•+</sup> des extraits éthanoliques de *Daphne gnidium* et de Trolox.

Il a été constaté que le pourcentage de réduction augmente en fonction de la concentration d'extrait étudié, la concentration la plus élevée (0.1mg/1mL) a donné un pourcentage d'inhibition de 70.52±3.4% pour les feuilles, 44.6±4.23 % pour les racines et 21.76 ±2.1% pour les tiges. Le Trolox, par contre, a montré un pourcentage d'inhibition de 99.84± 7.01% à une concentration de 1 mg/mL.

Les études statistiques ont révélées une différence significative entre les différentes parties de la plante ( $p < 0.05$ ).

Les feuilles de *Daphne gnidium* sont dotées d'un pouvoir antioxydant puissant avec un IC<sub>50</sub> de 0.035 mg/mL, qui est proche de celle du Trolox qui a donné une IC<sub>50</sub> de 0.0397 mg/mL. Par contre, les tiges et les racines ont présenté des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 0.127 et 0.109 mg/mL respectivement, ces organes sont moins actifs. Donc l'efficacité anti-radicalaire est de l'ordre suivant : feuilles > racines > tiges (figure 22).



**Figure 22** : Histogramme représentant les IC50 des extraits de *Daphne gnidium* et de Trolox.

Il a été constaté que, l'extrait éthanolique des feuilles de *Daphne gnidium* possède une activité anti radicalaire importante par rapport à celles trouvées par **Juskovic et al., (2017)**, sur les feuilles de *Daphne laureola*, en utilisant des différents solvants (extrait méthanolique:  $0.70 \pm 0.01$  mg/mL, extrait chloroforme:  $0.91 \pm 0.03$  mg/mL et extrait méthanol-chloroforme:  $0.79 \pm 0.04$  mg/mL). Une étude menée par **Balkan, (2016)** sur *Daphne Oleoides* a montré des IC50 de  $8.83 \pm 0.82$  et  $1.39 \pm 0.21$  mg/mL pour les extraits aériens en utilisant l'hexane et le méthanol comme solvants d'extraction.

### III.3.2. Pouvoir réducteur

D'après les résultats constatés dans la figure 23, les absorbances augmentent en fonction de la concentration, les résultats révèlent que les feuilles présentent une importante activité réductrice de 0.739 à une concentration de 0.2 mg/ml, suivie par les tiges (0.613) et une faible absorbance par rapport à la racine (0.397).

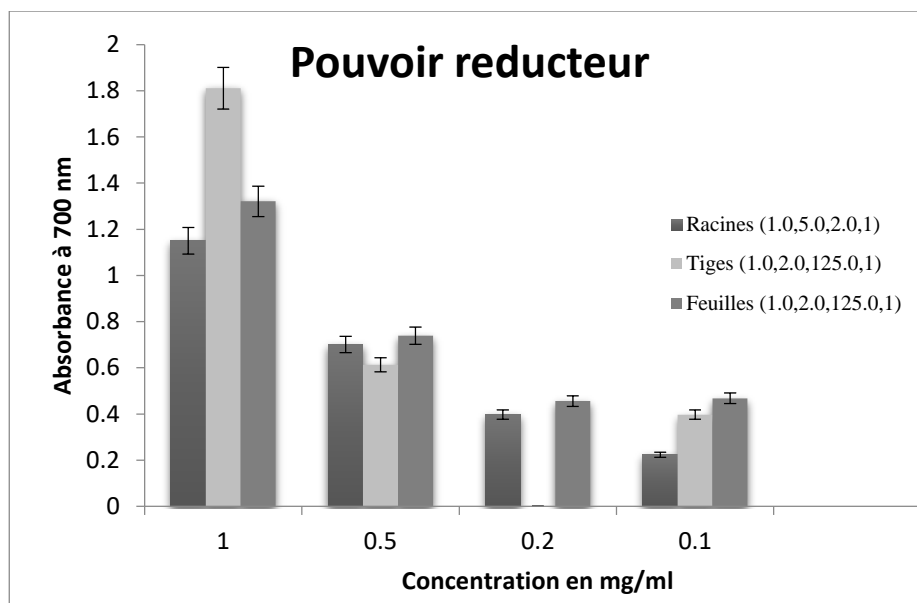


Figure 23 : Pouvoir réducteur de fer des feuilles, tiges et racine de *Daphne gnidium*.

Les résultats obtenus (figure 25), ont indiqué que les feuilles de *Daphne gnidium* est dotée d'un pouvoir antioxydant puissant suivies par les tiges et les racines avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0.1314, 0.1661 et 0.2794 mg/mL respectivement, par comparaison à l'acide ascorbique qui a une IC<sub>50</sub> de 0.43 mg/mL, ce qui démontre une capacité inhibitrice plus puissante de cet extrait par rapport au standard. Donc l'efficacité anti-radicalaire et de l'ordre suivant : feuilles > tiges > Racines (Figure 24).

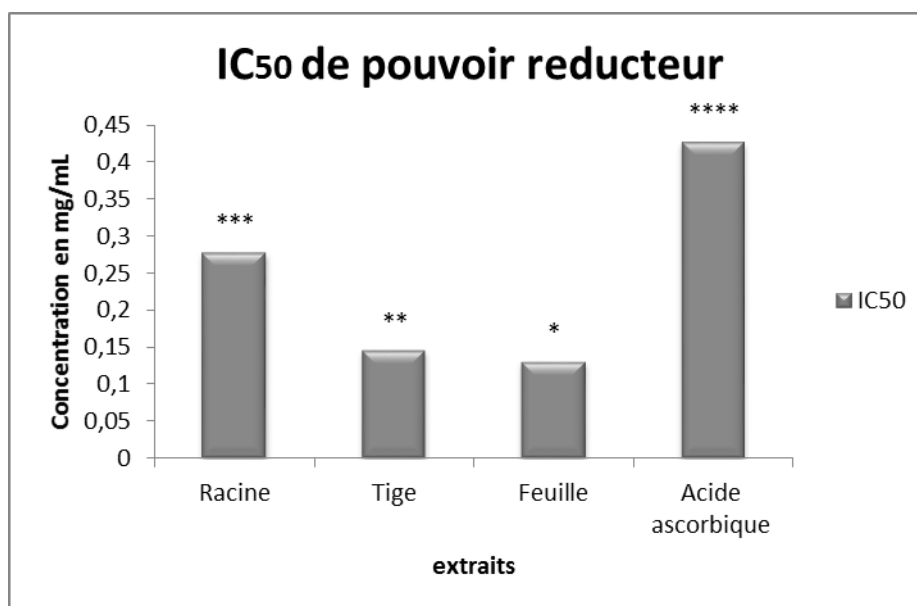


Figure 24 : Histogramme représentant les IC<sub>50</sub> des extraits de *Daphne gnidium* et de l'acide ascorbique.

Selon l'analyse statistique, une différence significative a été indiquée entre les différentes parties de la plante et le standard ( $p < 0.05$ ).

Aucune étude n'a été effectuée sur le pouvoir réducteur de cette espèce.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré que les extraits de *Daphne gnidium* possèdent une bonne activité antioxydante, ceci pourrait s'expliquer par la richesse de la plante en flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libre (Yang et al., 2008).

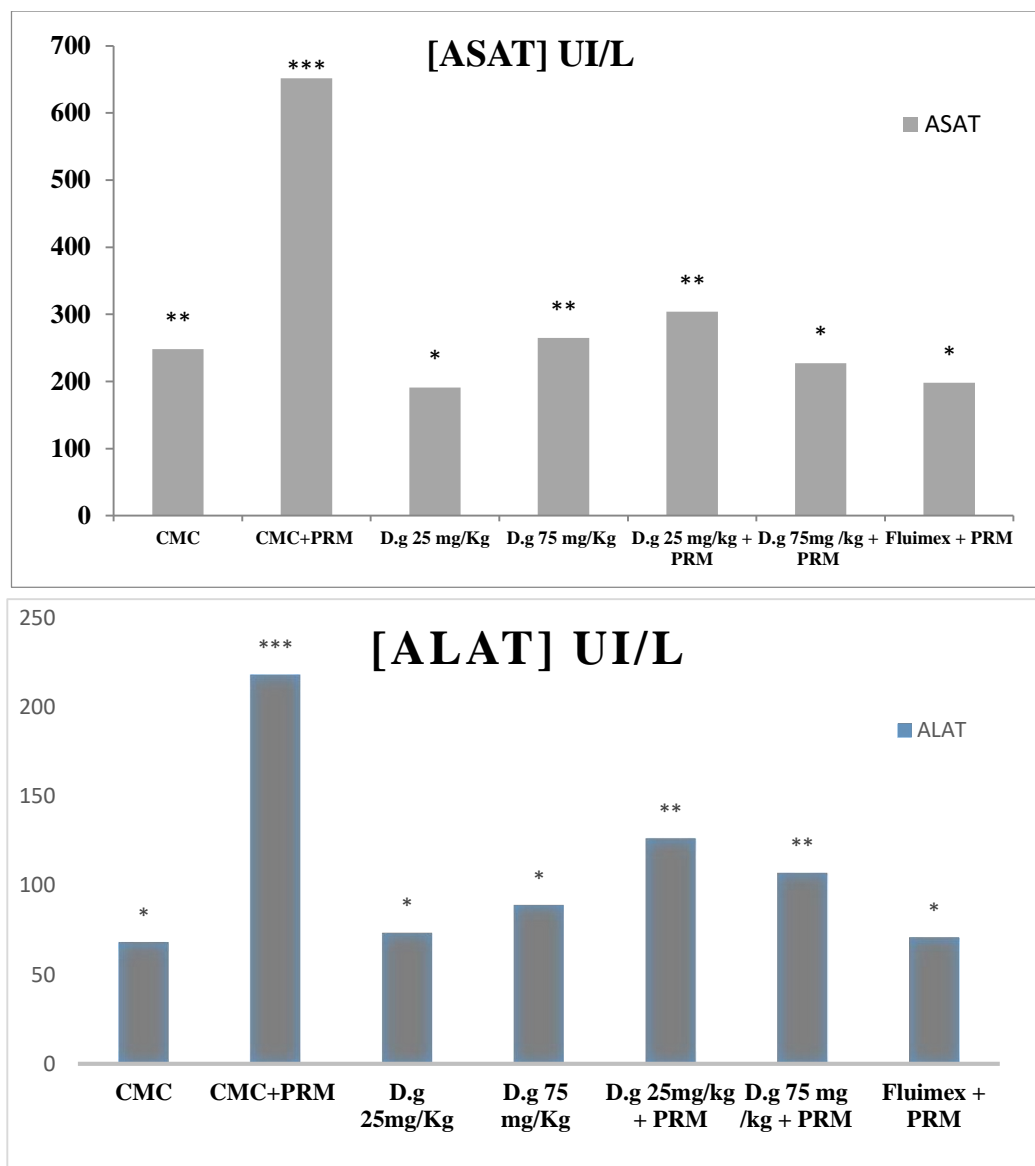
### III.4. Etude *in vivo* de l'effet de *Daphne gnidium* sur le stress oxydatif hépatique

L'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait des tiges de *Daphne gnidium* contre le stress hépatique créée par une forte dose du paracétamol, a été effectuée on se basant sur l'évaluation de l'influence de ce traitement sur les paramètres biochimiques, par le dosage des transaminases ainsi que l'enzyme de la peroxydation lipidique le MDA.

#### III.4.1. Evaluation des taux sériques des transaminases (ALAT et ASAT)

Le Tableau VI et la figure 25 résumant la variation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT/ALAT) chez les souris témoins, traitées par le paracétamol et prétraitées par les extraits des tiges de *Daphne gnidium*.

Les résultats illustrés dans la figure 25, montrent des différences significatives importantes des taux des transaminases entre les différents groupes traités et non traités. Car, le traitement des souris par le paracétamol par rapport au groupe témoin, provoque selon ces résultats une augmentation hautement significative du taux des transaminases ( $181.24 \pm 07$  UI/L et  $651.74 \pm 9$  UI/L), l'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT) respectivement, après le traitement par une forte dose du paracétamol.



**Figure 25 :** Variation de la concentration sanguine des transaminases (ASAT et ALAT) chez les souris témoins traitées (paracétamol) et prétraitées (l'extrait de tiges de *Daphne gnidium* à différentes doses).

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ), ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative \*\*\* $p<0.05$  très significative \*\* $p<0.05$  moyennement significative, \* $p<0.05$  faible significative. (analyse statistique a été faite en comparant avec le groupe CMC+ PRM).

Aucune différence significative dans les taux de ALAT ( $97.44 \pm 17$  UI/L;  $73.05 \pm 9$  UI/L) et ASAT ( $193.13 \pm 23$  UI/L;  $231.12 \pm 34$  UI/L) n'a été enregistrée dans les groupes contrôles, les groupes traitées par l'extrait de *Daphne gnidium* avec des doses de 25 mg/kg et 75 mg/kg, comparativement au groupe témoin dont les taux de ALAT et ASAT sont  $68.22 \pm 3$  UI/L et  $248.13 \pm 23$  UI/L respectivement. Par contre une diminution hautement significative a été enregistrée chez les souris prétraitées par les extraits de *Daphne gnidium* à différentes doses 25 mg/kg ( $138.45$

$\pm 13$  UI/L de ALAT et  $294.78 \pm 9$  UI/L de ASAT) et  $75$  mg/kg ( $117.16 \pm 04$  UI/L de ALAT et  $243.33 \pm 16$  UI/L de ASAT) (Figure 25).

En tant qu'organe de désintoxication, le foie est le premier organe qui rencontre tous les matériaux qui sont absorbés par le tractus gastro-intestinal. Il a été démontré qu'il réagissait aux effets toxicologiques de plusieurs façons, y compris la dégénérescence cellulaire et la nécrose (Onu *et al.*, 2013). Plusieurs rapports scientifiques, réalisés sur des souris, ont montré que le paracétamol peut induire une destruction du foie par l'élévation des taux sanguins des transaminases (ASAT/ ALAT) (Hozayen *et al.*, 2014).

Au cours de la lésion hépatique, les enzymes ont tendance à s'écouler dans la circulation sanguine en raison de leur emplacement cytoplasmique, ce qui facilite leur mise en circulation en réponse à des dommages à l'intégrité structurelle du foie (Afroz *et al.*, 2014).

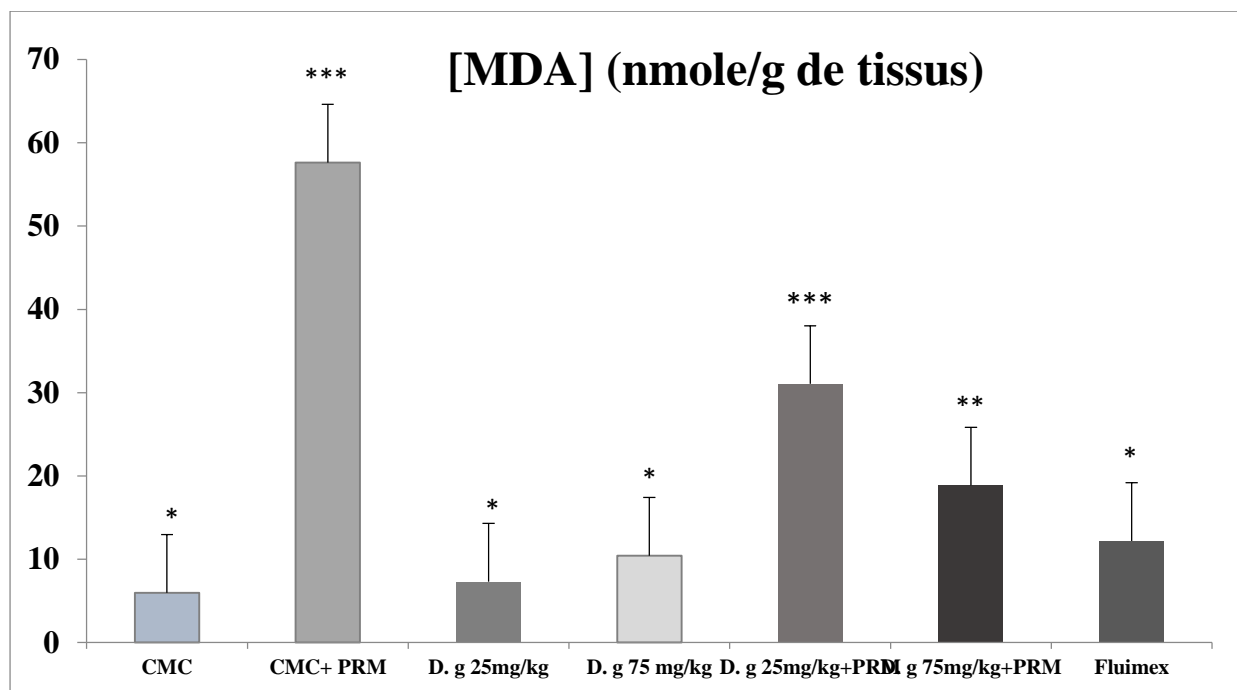
Les résultats obtenus révèlent, une augmentation du taux des transaminases (ASAT/ALAT) après un traitement par une dose élevée du paracétamol, ils sont comparables à plusieurs travaux précédents (Forouzandeh *et al.*, 2013). Selon Farag *et al.*, (2010); cette augmentation peut être due pratiquement à des lésions tissulaires dans le foie, en raison de modification de perméabilité de la membrane cellulaire ou également à une augmentation de la synthèse ou une diminution du catabolisme des transaminases.

Dans la présente étude, l'augmentation de l'activité des transaminases est enregistrée suite aux conditions drastiques causées par l'activité toxique des accumulations du produit du métabolisme de paracétamol: le N-acétyl p-benzoquinone-imine (NAPQI) dans le foie, ce qui peut provoquer une destruction cellulaire ou augmenter la perméabilité des cellules hépatiques. De plus, les ROS générés suite au cycle redox du NAPQI peut endommager les membranes hépatiques (Hozayen *et al.*, 2014).

La réduction des effets toxiques de la forte dose du paracétamol, par les molécules antioxydantes a été évaluée dans plusieurs études précédentes (Kanbur *et al.*, 2009, Forouzandeh *et al.*, 2013). Dans la présente étude, le prétraitement par l'extrait de tiges de *Daphne gnidium* a normalisé l'activité enzymatique des transaminases, par comparaison au témoin. Cette normalisation peut être expliquée par l'effet protecteur des antioxydants de *Daphne gnidium*, cette dernière a protégé les cellules hépatiques contre les effets toxiques de NAPQI. Ces résultats sont en accord avec d'autres études où les extraits de plantes ont prouvés leur effets hépato-protecteurs, chez les souris après exposition à une forte dose du paracétamol ou à d'autres molécules hépatotoxiques (doxorubicine, CCL4,...) (Omar *et al.*, 2016).

### III.4.2. Variation des paramètres du stress oxydatif par l'évaluation des taux hépatiques du MDA

La figure 26 illustre la variation du MDA cytosolique dans le foie chez les souris prétraitées ou non par l'extrait de tige de *Daphne gnidium*, les résultats sont exprimés en nmole/g de foie en utilisant une courbe standard de tétraoxypropane (TEP) (Annexe III).



**Figure 26 :** Variation du taux de MDA cytosolique hépatique des souris traitées et non traitées par la forte dose du paracétamol (400 mg/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type (n=3), ANOVA-MANOVA suivit par le teste LDS ont été utilisés pour l'analyse statistique. La différence est significative \*\*\*p<0.05 très significative, \*\*p<0.05 moyennement significative, \*p<0.05 faible significative (analyse statistique a été faite en comparant avec le groupe CMC+ PRM)

D'après les résultats obtenus, il a été constaté une élévation hautement significative (P<0,05) du MDA chez les souris traitées par le paracétamol (400 mg/kg) ( $57,64 \pm 5.28$  nmole/L) par rapport au groupe témoin (CMC) ( $5,98 \pm 2.51$  nmol/L). Par ailleurs, une variation significative (P<0,05) du taux du MDA est constatée chez les souris prétraitées par les extraits de *Daphne gnidium* à la dose de 25 mg/kg et 75 mg/kg avec une diminution des taux de MDA de  $31,05 \pm$  nmol/L et  $18,87 \pm 3.25$  nmol/L respectivement, et cela par rapport au groupe traité. Ces résultats expliquent la protection hépatique par les extraits de tige de *Daphne gnidium* d'une façon significative en fonction de la dose administrée (Figure 26)



Etant donné que, les phospholipides membranaires sont des cibles majeures de dégâts oxydatifs, la peroxydation lipidique est souvent le premier paramètre analysé pour prouver l'atteinte des radicaux libres. La peroxydation lipidique est le processus de dégradation oxydante des acides gras polyinsaturés. Elle produit une perte progressive de l'intégrité de la membrane cellulaire, une altération de la fonction de transport membranaire et une perturbation de l'homéostasie des ions cellulaires (**Hinson et al., 2010**).

Le stress oxydant est caractérisé par les ROS qui induisent la peroxydation lipidique, le MDA est un produit secondaire généré au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (**Misra et al., 2009**).

Les résultats de la présente étude montrent l'augmentation du taux du MDA cytosolique dans le tissu hépatique, dans le groupe traité par le paracétamol. L'augmentation de la peroxydation lipidique, indiquée par le taux élevé du MDA, ceci montre bien que l'administration d'une forte dose du paracétamol est capable de provoquer la génération des ROS, qui se traduit par une peroxydation lipidique dans le tissu hépatique. Les lipides de la membrane cellulaire hépatique sont sensibles aux lésions des radicaux oxygénés induit par le produit de dégradation du paracétamol le NAPQI (**Reid et al., 2005**). Dans les conditions aérobies, le radical NAPQI est capable de provoqué la génération des ROS, y compris le radical hydroxyle, qui peut affecter profondément les lipides, induisant ainsi une peroxydation lipidique (**Hinson, 2010**). Dans le même contexte, des études précédentes, ont montré que l'administration d'une forte dose du paracétamol, induit une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau du tissu hépatique (**Mitchell et al., 2011**).

Dans les états de stress oxydatif, le glutathion réduit la (GSH) est converti en glutathion oxydé (GSSH) et l'épuisement entraîne une peroxydation lipidique (**Meister et Anderson, 1983**). La SOD est connue pour inhiber la production de radicaux HO<sup>·</sup> en éliminant O<sub>2</sub><sup>-</sup>, et entraînerait donc sa réduction tout en inhibant la peroxydation lipidique. En outre, l'augmentation de la peroxydation lipidique est associée à une diminution de l'activité de la SOD (**Tandon et al., 1995**).

Par ailleurs, le prétraitement par les extraits de tiges de *Daphne gnidium* diminue le taux du MDA cytosolique, ce qui permet de dire que, les extraits de tiges de *Daphne gnidium* protègent le tissu hépatique contre les effets toxiques du stress oxydant, dans la peroxydation lipidique, cet effet protecteur peut être dû à la réduction des molécules de MDA par l'extrait de tiges de *Daphne gnidium*. En effet, le *Daphne gnidium* présente une activité antilipoperoxydative, par son effet de

balayage des radicaux peroxydes, par la capacité de chélation des ions et sa capacité à réduire le  $Fe^{+2}$  et inhiber ainsi la réaction de Fenton et la peroxydation des lipides.

Les activités antioxydantes exercées par les extraits de *Daphne gnidium* peuvent être expliquées par la richesse de cette plante en molécules antioxydantes comme les polyphénols qui sont à l'origine des bienfaits de la plante.

## Conclusion et perspectives

La présente étude a été consacrée au dosage des polyphénols et flavonoïdes de la plante médicinale de la flore Algérienne *Daphne gnidium*, suivi par l'évaluation de leur activité antioxydante et hépatoprotectrice contre l'intoxication induite par le paracétamol.

Le rendement d'extraction des polyphénols, à partir des différentes parties de *Daphne gnidium* à savoir racines, tiges et feuilles sont respectivement de 22.79 % et 32.56% et 39.3%.

L'étude statistique des résultats a révélé que les teneurs en composés phénoliques ont présenté une différence significative qui varie en fonction de l'organe étudié et de la concentration utilisée  $P < 0,05$ .

L'activité antiradicalaire du DPPH a montré que les tiges de *Daphne gnidium* sont dotées d'une forte activité antioxydante suivies par les feuilles avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 0.0774 et 0.0875mg/ml respectivement par comparaison à la BHA.

L'extrait de feuilles a exhibé une importante activité reductrice du radical ABTS avec une  $IC_{50}$  de 0.035mg/ml, qui est proche de celle du standard Trolox ( $IC_{50}$  de 0.0397 mg/ml).

Le pouvoir réducteur le plus élevé a été obtenu avec l'extrait de feuilles ( $IC_{50}$  de 0.131 mg/ml), suivis par les extraits de tiges et racines avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 0.166 et 0.279 mg/ml respectivement.

L'activité hépatoprotectrice a révélé que le prétraitement des souris à des doses de 25 et 75 mg/kg par les extraits de *Daphne gnidium* a réduit de manière significative ( $p < 0,05$ ) les taux des transaminases et du MDA comparativement au groupe PCM. Aussi, les taux des transaminases et du MDA mesurés en présence de l'extrait éthanolique ont été comparables à ceux obtenus avec le standard (fluimex). Donc *Daphne gnidium* exerce un effet hépatoprotecteur dose dépendante et qui similaire à celui exercé par les molécules de référence (fluimex®).

Ces résultats restent préliminaires, il est intéressant d'élargir ce travail avec des études complémentaires et approfondies à savoir, une caractérisation des différents composés bioactifs de *Daphne gnidium*, afin d'établir une relation structure activité et comprendre les divers mécanismes d'action, dans le but de valoriser et exploiter la plante dans le domaine de pharmacologie.

**A**

**Afroz R., Tanvir E M., Hossain M F., Gan S H., Parvez M., Aminul Islam M. and Khilil M I. (2014).** Protective effect of sandarbane honey against acetaminophen-induced acute hepatonephrotoxicity in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8.

**Alam M.N., Bristi N.J. and Rafiquzzaman M. (2013).** Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical*, 21 (2): 143-152.

**Albichr I S., Hantson P. (2017).** Le paracétamol à dose thérapeutique : Quelles populations à risque d'hépatotoxicité ?. *Toxicologie analytique et Clinique*, 30 (1): 19-34.

**Ameni D., Baghiani A., Boumerfeg S. And Dahamna S. (2015).** Profils phytochimiques, capacité Antioxydante et effet Protecteur Contre la souris induite par la souris ayant des dommages A L'Erythrocyte de *Daphne gnidium L.* Extraits de shoots. *International journal Pharmaceutical*, 7(11) :148-156.

**B**

**Balkan I A., Taskin T., Tugba Dogan H., Deniz I., Akaydin G. and Yesilada E. (2016).** A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant parts of *Daphne oleoides* schreb. Subsp. *Oleoides*. *Industrial crops and products*, 95:695-703.

**Bellakhdar J. (1997).** La pharmacopée arabo-islamique hier et aujourd'hui. Société française d'Ethnopharmacologie, Maroc. 118.

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

**Benkhniq O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. and Douira A. (2010).** Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ bel ksiri (région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonensia*, 53:191-216.

**Bijoy M., Jayati S., Probir K S. (2008).** Antioxidant activities of soybean as affected by bacillus- fermentation to kinema. *Food Research International*, 41(6): 586-593.

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

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

**Brunrton J. (2009).** Composés phénoliques. In : *Pharmacognosie (phytochimie plantes medicinales)*, Paris : Lavoisier. 263-482.

### C

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

**Chaabane F., Mokdad-Bzeouich I., Sassi A., Mustapha N., Majouli R., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. (2016).** Genoprotective and neuroprotective effects of *Daphne gnidium* leaf methanol extract, tested on male mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 39 (3): 297-302.

**Chakravarty H. L. (1976).** Plant wealth of Iraq (A Dictionary of Economic Plants). Baghdad: Ministry of agriculture and agrarian reform. 190.

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

**Crozier A., Clifford M N., Ashihara H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford. Blackwell Publishing. 194.

### D

**Davila J C., Lenherr A. and Acosta D. (1989).** Protective effect of flavonoids on druginduced hepatotoxicity *in vitro*. *Toxicology*, 57: 267-286.

**Debelmass AM. et Delaveau P. (1983).** Daphné. In : *Guide des plantes dangereuses*. Maloine S A. Paris. 119-120.

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

**Deshpande S S., Cheryan M., et Salunkhe D K. (1986).** Tannin analysis of food products. *Jornal CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 24 (4): 401–449.

**Dif M M., Toumi F B., Benyahia M., Bouzid K., Rahmani M. and 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'Ecologie*, 69(3-4):338-344.

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

**Dröge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1): 47-95.

**Dupont F, guignard J L. (2015).** Rosidees. In : *Botanique (les familles de plantes)*. Issy les Moulinaux : Elevier Masson SAS. 247.

## *F*

**Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331 (5): 372-379.

**Farag A G A., Elhalwagy M E A. and Farid H E A. (2010).** Effect of ginger supplementation on developemental toxicity induced by fenitrothion insecticide and/ or lead in albinos rats. *Pesticide biochemistry and physiology*, 97(3):267-274.

**Favier A, (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-111.

**Forouzandeh H., Azemi M.E., Rashidi I., Goudarzi M. and Kalantari H. (2013).** Study of the Protective Effect of *Teucrium polium* L. Extract on Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice. *Pharmaceutical Research*, 12 (1): 123-129.

**Fuhrman B., Lavy A. and Avirm M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61 (3): 549-554.

## G

**Ghaisas M.M., Navghare V V., Takawale A R., Zope V S., Deshpande A D. (2008).** *In-vitro* antioxidant activity of *Tectona grandis* Linn. *Pharmacologyonline*, 3: 296-305.

**Gheffour K., Boucherit K., Boucherit-Otmani Z. (2015).** Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of extracts of *Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13: 288-294.

## H

**Hagerman A E. and Butler L G. (1978).** Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4): 809-812.

**Haleng J., Pincemail J., Defraigne J O., Calier C. et Chapelle J P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liege*, 62(10): 628- 638.

**Halliwell B. (1996).** Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*, 44(1):6-13.

**Harizi H., Chaabane F., Ghedira K and Chekir-Ghedira L. (2011).** Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cellular Immunology*, 267: 94–101.

**Hayouni E A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105 (3): 1126-1134.

**Hinson J A., Roberts D W. and James L P. (2010).** Mechanisms of acetaminopheninduced liver necrosis. *Handbook of experimental pharmacology*, 196: 369-405.

**Hseini S and Kahouadji A. (2007).** Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental). *LAZAROA*, 28: 79-93.

**Hozayen W G., Abou Seif H S. and Amin S. (2014).** Protective effects of ruitn and / or hesperidine against Doxorubicin-Induced hépatotoxyciy. *International Journal of clinical nutrition*, 2(1): 11-17.

*J*

**Juskovic M., Zarab-Popovic A., Matejic J., Mihajilov-Krstev T., Manojlovic N., Vasiljvic P. (2017).** Phytochemical screening, Antioxydants and Antimicrobial potential of leaves of *Daphne laureola* L. *Oxidation Communications*, 40(3): 1058–1069.

*K*

**Kanbur M., Eraslan G., Beyaz L., Silici S., Liman B.C., Altnordulu S., Atasever A. (2009).** The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61: 123–132.

**Kroyer G et Hegedus N. (2001).** Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2: 171 – 174.

*L*

**Lefèvre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J P., Théron P et Torrelles J. (1998).** Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thiobarbituricacid-reactive substances. *Annales de Biologie Clinique*, 56 (3): 305-319.

**Letouzey R. (1982).** Manuel de botanique forestiere: Afrique tropicale; botanique generale. Centre Technique Forestier Tropical. University of Minnesota.

**Lim T T., Lim Y Y., Tee J J. (2006).** Antioxydant properties of several tropical fruits: Comparative study. *Food chemistry*, 103 : 1003-1008.

*M*

**Macheix J J. (1996).** Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle?. *Journal Acta Botanica Gallica*, 134(6) : 473-479.

**Mamadou B. (2002).** Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat en pharmacie de l'Université cheikh anta diop de Dakar.57.

**Manojlovic N., Miroslav S., Maškovic P., Vasiljevic P. and Juškovic M. (2014).** Phenolic and Flavonoid Content and Antioxidant Activity of *Daphne Blagayana* Growing in Serbia. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 15 (1): 21-27.



**Marfak A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges, 1-18.

**Marshall W. (2017).** Planting and ornamental gradening; A practical treatise. Cambridge University Pres. London. 152.

**Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51: 304–315.

**Mégarbane B. (2017).** Intoxication par paracétamol : Quoi de neuf ?. *Médecine Intensive Réanimation*, 26 (5): 383-395.

**Meister A. and Anderson M E. (1983).** Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 711-760.

**Milardovic S., Ivekovic. And Bozidar S G. (2006).** A nouvel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochistry*, 68:175-180.

**Mitchell S J., Kane A E. and Hilmer S N. (2011).** Age-related changes in the hepatic pharmacology and toxicology of paracetamol. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 4: 1-14.

**Misra M K., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. (2009).** Oxydative stress and ischemic myocardial syndromes. *Meddical science monitor*, 15(10): 209-219.

**Mole S, and Waterman P G. (1987).**Tannic acid and proteolitic enzyne: Enzyme inhibition or substrate deprivation?. *Photochemistry*, 26(1): 99-102.

**Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal. Science. Technology*, 26(2): 211-219.

**Morandat S. and El Kirat. (2013).** Les antioxydants et membranes lipidique: effet sur la peroxydation, localisation de fraction antioxydante et quantification de l'interaction. *Colloque Cosmetopée*. 03.

## O

**Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979).** Assay for l'ipod peroxidation in animal tissus bythiobarbituric acide reaction. *Analytical of Biochemistry*, 95: 351-358.

**Olaleye M T., Amobonye A E., Komolafe K. and Akinmoladun A C. (2014).** Protective effects of *Parinaricuratellifolia* flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21: 486-492.

**Omar N A A., Allithy ANEA., Baghdadi H., Zolaly M., Abdelhaleem M., Helmy M M., Ayat M M A. And El Sayed S M. (2016).** Hepatoprotective Effects by propolis against Doxorubicin-induced Rat Liver Toxicity: A Biochemical and Hystopathological Study. *American Journal of Cncer Prevention*, 4(3):36-40.

**Onu A, Saidu Y, Ladan MJ, Bilbis LS, Aliero AA, Sahabi SM. (2013).** Effet of aqueous stem bark extract of *khayasenegalensis* on some biochemical, haematological and histopathological parameters of rats. *Journal of Toxicology*, 10.

**Öztürk M., Aydoğmuş-Öztürk F., Emin dura M. and Topçu G. (2007).** Antioxidant activity of stem and root of extract of rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103 (2): 623-630.

*P*

**Pareek O P. and Sharma S. (2017).** Systematic Pomology. Amazon France: Scientific Publishers. 5-669.

**Pham-Huy L. A., He H., Pham-Huy C. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2):89-96.

**Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 233–239.

**Popvici C., Saykova L., Tylkowski B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Genie Industrielle*. (4) : 25-39.

*R*

**Rapisarda A., German M P., Iauk L., La Rosa M., Sanogo R. and Ragusa S. (1998).** *Daphne gnidium* L. Bark and Leaf Extracts: Skin Damage by Topical Application. *Phototherapy Research*, 12 (1): 49–51.

**Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9): 1231-1237.

**RIBEREAU-GAYON P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris : 254.

**Reid A B., Kurten R C., McCullough S S., Brock R W. and Hinson J A. (2005).** Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: Role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312 (2): 509- 516.

**Ryan L. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *International Journal of Food Science*, 6.

### S

**Sanda M. A., Zengin G., Aktumsek A., Cakmak Y. S. (2015).** Evaluation of antioxidant potential of two *Daphne* species (*D. gnidioides* and *D. pontica*) from Turkey. *Food and Agriculture*, 27(6): 488-494.

**Sarr S O., Fall A D., Gueye R., Diop A., Diatta K., Diop N., Ndiaye B. and Diop, Y.M. (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9 (3): 1263-1269.

**Sovrlić M M and Manojlović N T. (2016).** Plants from the genus *Daphne*: A review of its traditional uses phytochemistry, biological and pharmacological activity. *Serbian Journal of Experimental and Clinica Research*, 18 (1): 69-79.

**Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R. (2007).** Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, 104 (3): 1106-1114.

### T

**Tandon S K., Sood, A., Andrews J E., Dennis P F. (1995).** Palaeoenvironments of the dinosaur-bearing Lameta Beds (Maastrichtian), Narmada Valley, Central India. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 117: 153 184.

**Taviano M F., Marino A., Trovato A., Bellinghieri V., Melchini A., Dugo P., Cacciola F., Donato P., Mondello L., Guvenc A., De-Pasquale R. and Miceli N. (2013).** *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. “berries” from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 22-29.

**Trousseau A., Pidoux H. (1875).** *Traite de thérapeutique et de matière médicale*. Paris : Paul, Constantin. 755.

*V*

**Valko M., Rhodes C J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.

**Velioglu Y S., Mazza G., Gao L. and Oomah B D. (1998).** Antioxidants activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grains products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46(10): 4113-4117.

**Vidal V., Potterat., Louvel S., Hamy F., Mojarrab M., Sanglier J J., Klimkait T. and Hamburger M. (2012).** Library-Based Discovery and Characterization of Daphnane Diterpenes as Potent and Selective HIV Inhibitors in *Daphne gnidium*. *Journal Natural Products*, 75(3): 414–419.

*Y*

**Yang J., Guo J., and Yuan J. (2008).** *In vitro* antioxydante properties of rutin. *LWT Food Science and Technology*, 41: 1060-1066.

## Annexes I Matériels, Réactifs utilisés et tableaux

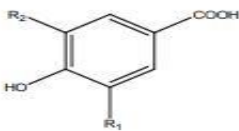
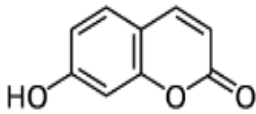
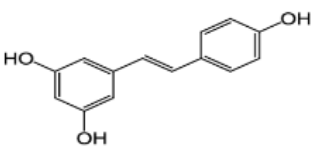
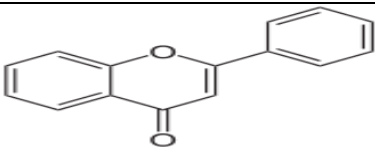
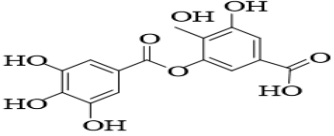
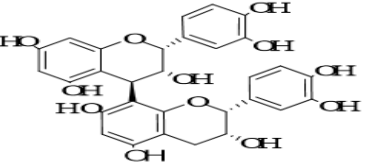
### Matériels

Les appareillages et matériels	Produit chimique
Etuve (WTC BINDER) Agitateur magnétique (VELP scientifica) Bécher Barreau magnétique Tube Balance (RADOIG) Balance de précision (Adventrer™) pH mètre Bain- marin (TRADE RAYPA®) Spectrophotomètre (RAYLEIGH VIS - 723G) Haute Erlenmeyer Plaque chauffante agitatrice (VELP Scientifica) Micropipettes (1000/200ul) Centrifugeuse (SIGMA 1-6) Embouts Hydrodistillateur (GFL 2001-4) Papier fileter wattman Papier absorbant Papier aluminium Papier fille Cuves Tamiseur électrique Réfrigérateur (CONDOR) Kit SPINREACT (Espagne) Seringue Sonde gastrique Trousse de dissection	Ethanol Folin-ciocalteu Carbonate de sodium Chlorure d'aluminium BSA SDS/TEA HCl Vanilline/HCl FeCl3 Acide tanique DPPH BHA ABTS Tompon phosphate Acide trichloracetique Eau distillé Chlorure ferrique Acide ascorbique Eau physiologique KCl TBA TCA N-butanol CMC Formol Paracétamol® (effervescent 500mg) Chloroforme Fluimex® (200 mg/kg)

**Tableau I** : Principaux radicaux libres et leurs structures chimiques (Pham-Hua et al., 2008).

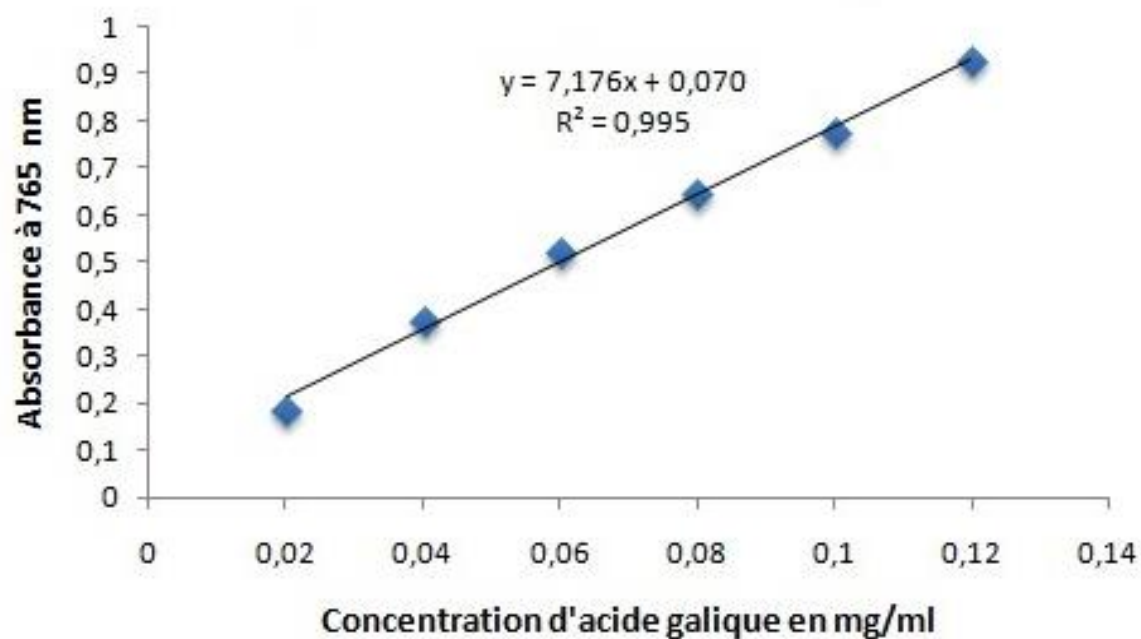
<b>Radicaux libres</b>	<b>Structure chimique</b>	<b>Radicaux libre</b>	<b>Structure chimique</b>
<b>Radical hydroxyl</b>	$\text{OH}\cdot$	<b>Peroxyded'hydrogène</b>	$\text{H}_2\text{O}_2$
<b>Radical hydroperoxyde</b>	$\text{HOO}\cdot$	<b>Peroxynitrite</b>	$\text{ONOO}\cdot$
<b>Radical peroxyde</b>	$\text{ROO}$	<b>Monoxyde d'azote</b>	$\text{NO}\cdot$
<b>Radical alkoxy</b>	$\text{RO}\cdot$	<b>Peroxynitrite</b>	$\text{ONOO}\cdot$

Tableau II : classification des polyphénols (Crozier et al., 2006)

Classification	Exemple	Structure de base
Acides phénoliques	Acide gallique Acide caféique Acide vanillique	
Coumarines	Esculitine Scopolétine	
Stilbènes	Resveratrol	
Flavonoïdes	Quercétine, Apigénine, Catéchine	
Tanins hydrolysables	Gallotanins	
Tanins condensés	Catéchine	

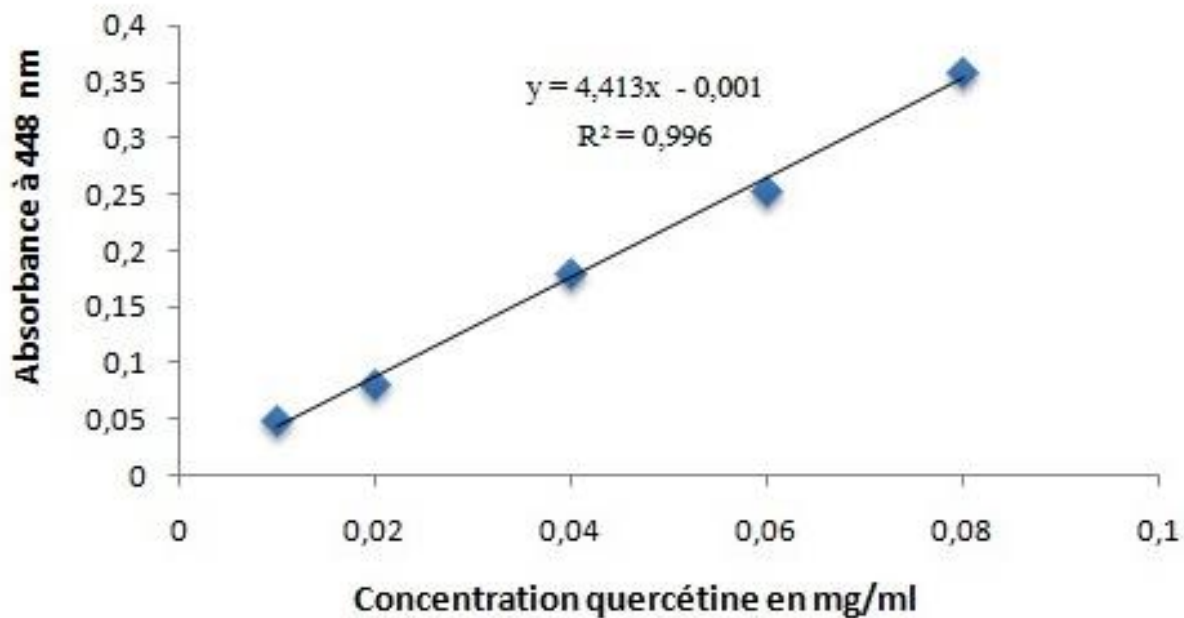
**Annexes II** Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes, en tanins totaux, en tanins hydrolysable et en tanins condensés respectivement.

- Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des polyphénols en utilisant l'acide gallique.

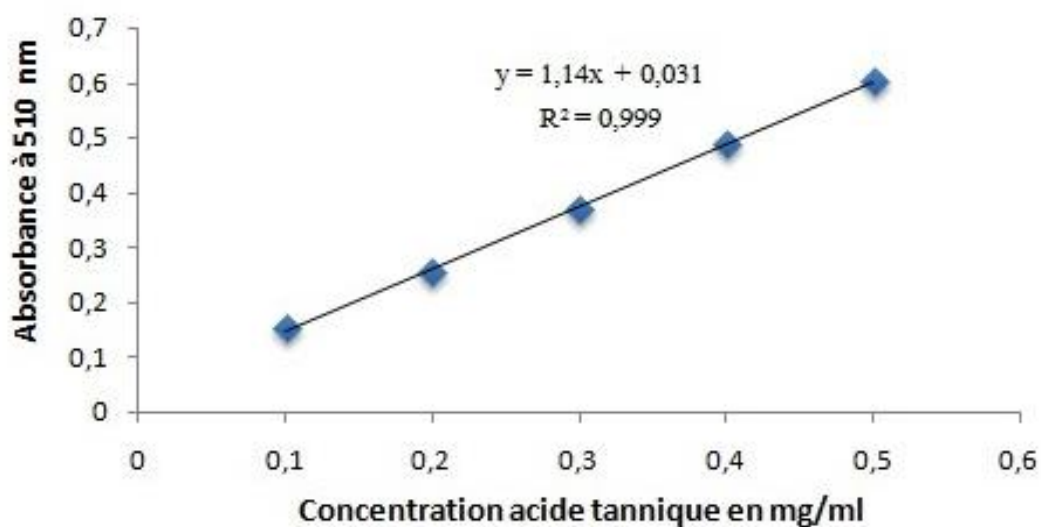




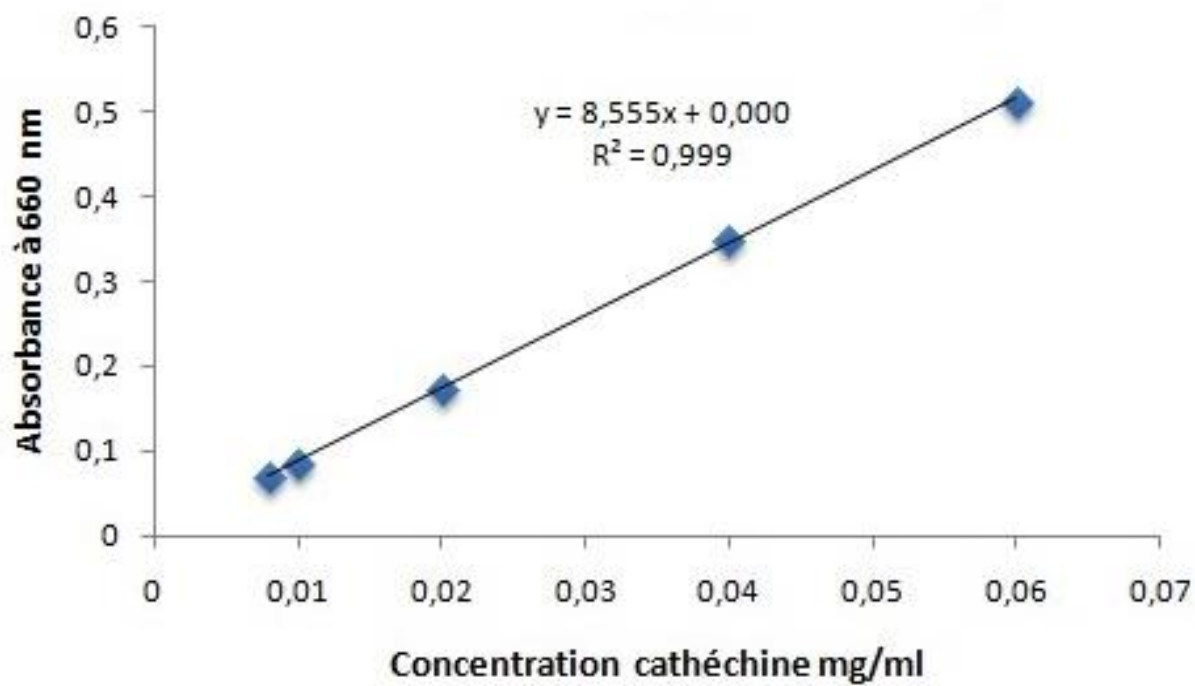
- Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.



- Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des tanins totaux et hydrolysables en utilisant l'acide tannique.

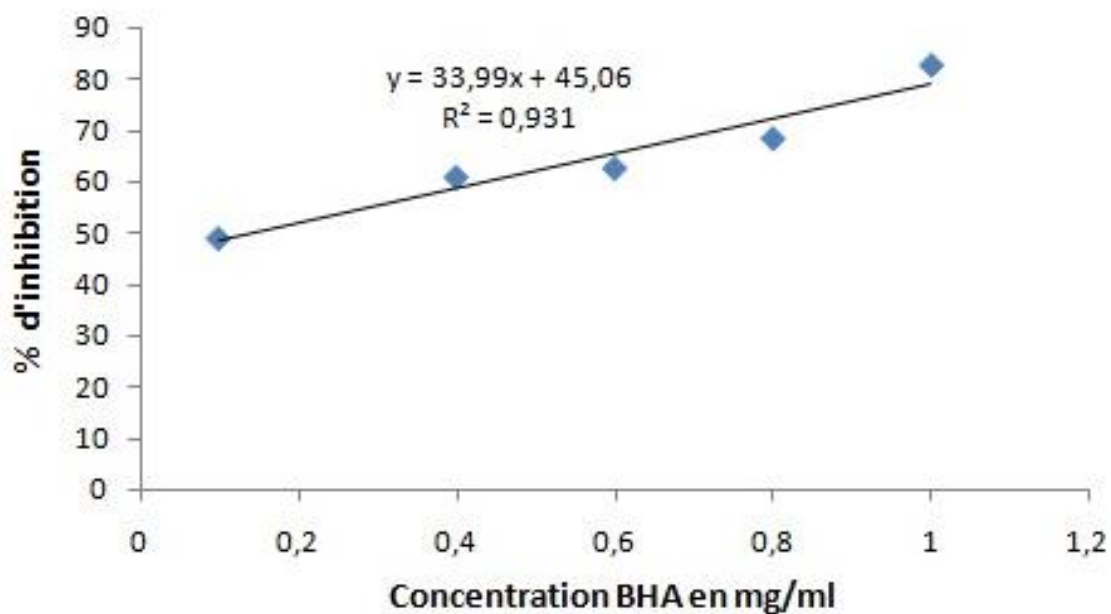


- Courbe d'étalonnage utilisée pour le dosage des tanins condensés en utilisant cathéchine.

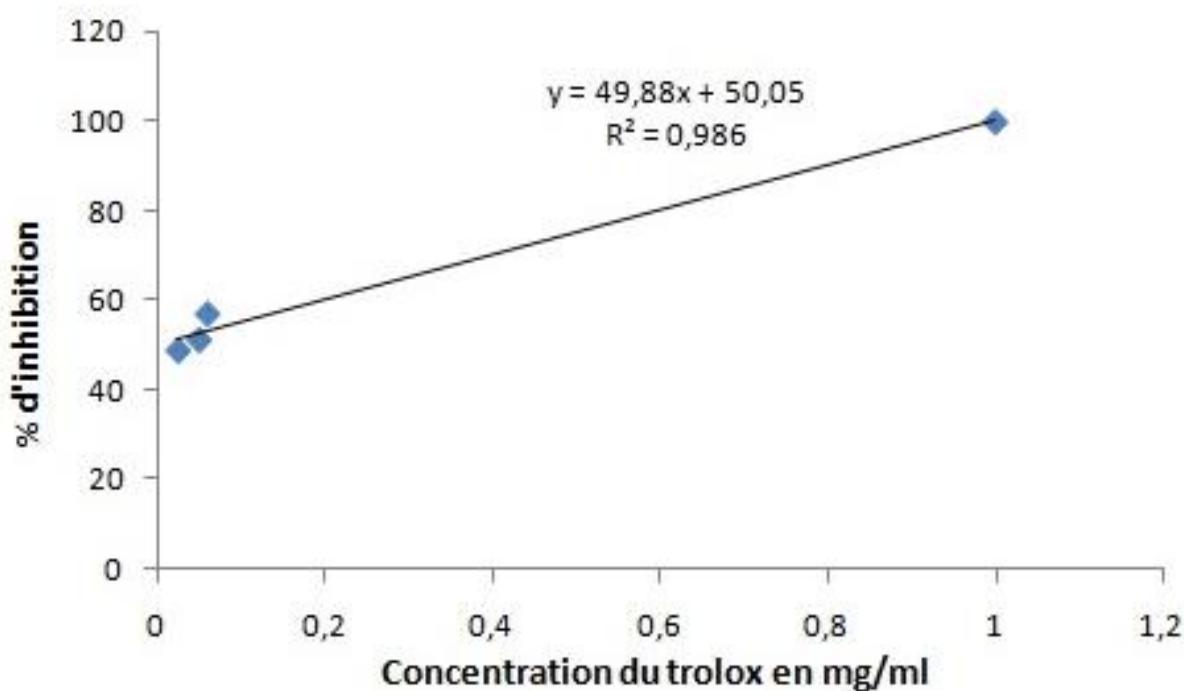


**Annexes III** Courbes représentes les pourcentages d'inhibition des différents standards utilisées afin d'évaluer le pouvoir antioxydant des extraits de notre plante (DPPH<sup>+</sup>, ABTS<sup>+</sup>. Et pouvoir réducteur et MDA respectivement).

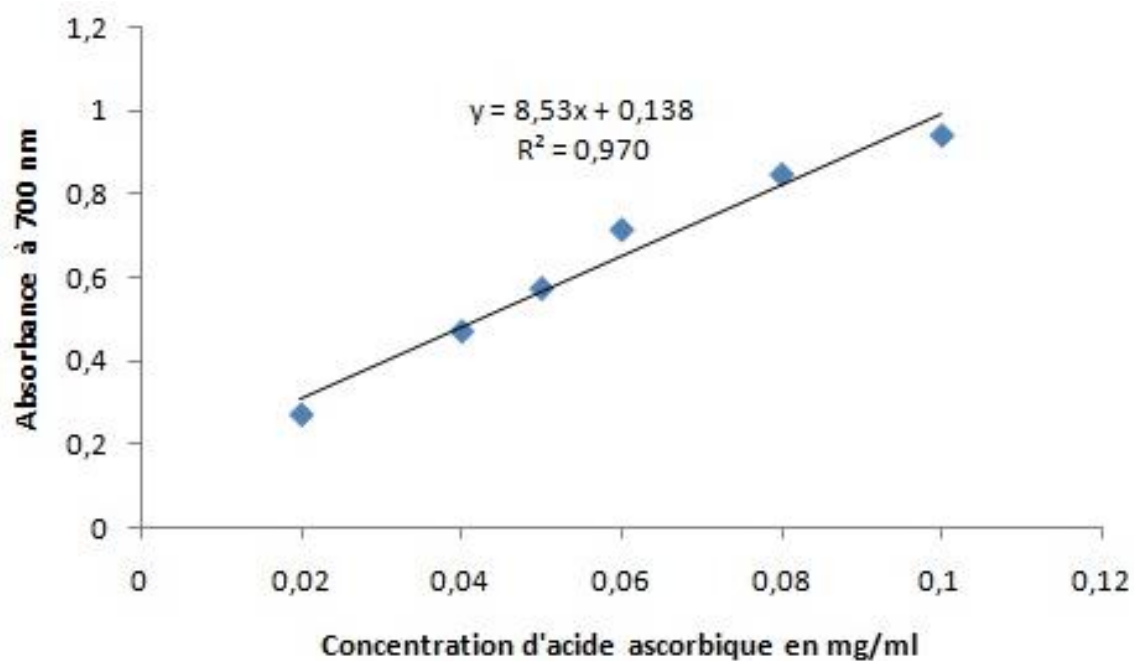
- Courbe standard utilisée pour quantifier effet scavenger en utilisant la BHA.



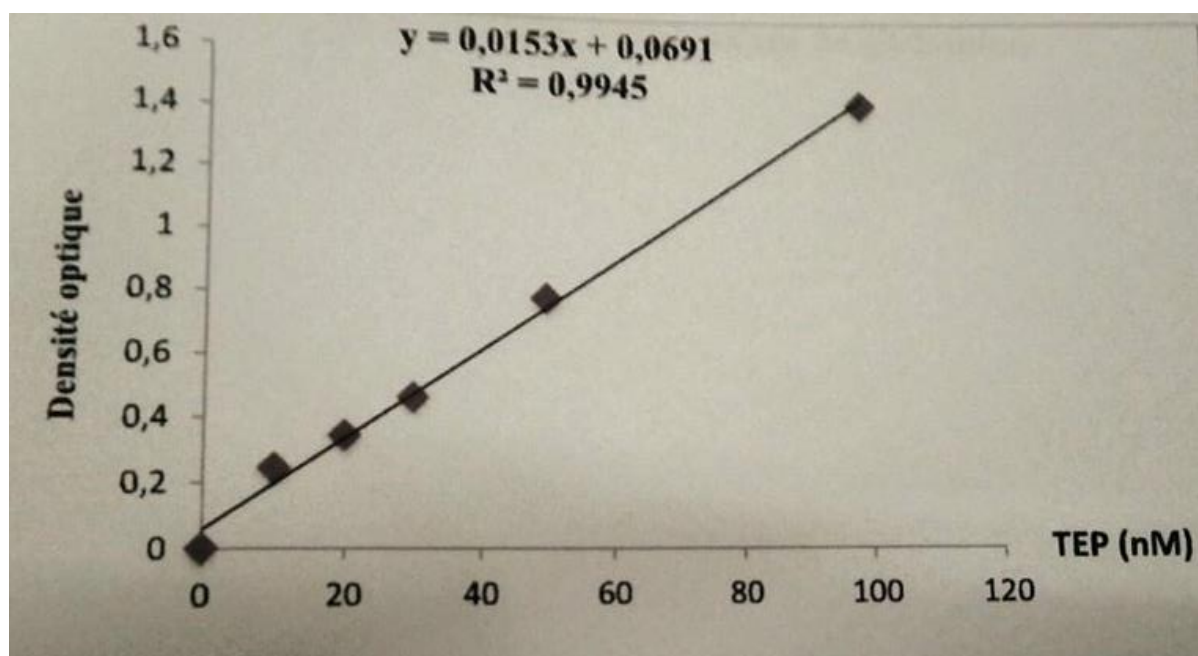
- Courbe standard utilisée pour quantifier effet scavenger en utilisant Trolox.



- Courbe standard utilisée pour quantifier activité réductrice en utilisant acide ascorbique.



- Courbe standard utilisée pour quantifier la teneur en MDA en utilisant TEP.



Courbe etalon du MDA (TEP comme standard) (nM)





---

## Glossaire médicale

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

**Affections dartreuses** : affection de la peau, se caractérisant par des rougeurs et des desquamations, avec démangeaisons.

**Rhumatisme chronique** : Le rhumatisme est un terme assez vague donné à toutes les maladies responsables de douleurs ou d'inflammations affectant les articulations ou les structures situées à proximité, comme les tendons ou les ligaments. Ces pathologies ont des formes diverses telle que rhumatismes inflammatoires chroniques, arthrites aiguës, arthroses par dégénérescence des articulations vieillissantes, dépôts de cristaux dans l'articulation, douleurs articulaires post-traumatiques.

**Cataplasme** : C'est une pâte, plus ou moins épaisse, réalisée à base de plantes broyées et d'eau, et destinée à soulager des douleurs ou des affections. Généralement, le cataplasme est posé directement sur la peau, puis recouvert d'un linge humide pour favoriser son action. Le cataplasme est particulièrement efficace sur les troubles dermatologiques, les douleurs articulaires et musculaires, les brûlures et les rhumatismes. On peut utiliser de l'argile, des algues, des huiles essentielles ou de la farine, selon l'affection à traiter.

**Cuir chevelu** : C'est la peau et les tissus situés sur la tête. Il est habituellement recouvert de cheveux.

**Pellicules** : Le terme de pellicule vient du latin *pellicula*, qui signifie petite peau. Ces squames trahissent en fait la prolifération sur le cuir chevelu d'une bestiole encombrante : un champignon connu sous le nom de *Pityrosporum ovale*. Par chance, il n'est pas contagieux et l'on ne s'échange pas les *Pityrosporum* comme les poux ou la gale.

**Leucémies** : (du grec *leukos*, blanc, et *haima*, sang), ou **leucose**, est un cancer des cellules de la moelle osseuse (les cellules de la moelle produisent les cellules sanguines, d'où le terme parfois utilisé de *cancer du sang*), faisant partie des hémopathies malignes.

**Convulsions** : c'est la contraction (spasme) violente et involontaire d'un ou plusieurs muscles, d'un ou plusieurs membres, voire de tout le corps. Elle peut aussi affecter la face, la maladie de

Meige (désordre neurologique rare) se traduit par des convulsions de la face ou d'une moitié de la face et du cou.

**Dilatation pupillaire :** La dilatation des pupilles est un réflexe normal en cas de faible luminosité. Elle permet de capter ainsi le plus de rayons lumineux possible et d'augmenter les capacités de vision dans la pénombre. En dehors de ce cas, si elle est survenue brutalement ou s'accompagne de troubles du comportement, une prise en charge en urgence est indispensable.

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

**Reperfusion ou une ischémie :** est la diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. Cette diminution entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins (*hypoxie*), et la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction.

## Glossaire botanique

**Arbuste :** C'est un arbre ou de l'arbrisseau. Il désigne une plante ligneuse d'une taille inférieure à 8 mètres et à tronc marqué.

**Thymelaeaceae :** C'est constituée de plantes dicotylédones. Selon Watson & Dallwitz elle comprend près de 500 espèces réparties en 44 genres.

**Garrigue :** Désigne une formation végétale constituée d'arbrisseaux épineux résistant à la sécheresse.

**Floraison :** C'est le processus biologique de développement des fleurs.

**Inflorescence :** Manière dont les fleurs sont disposées sur la plante qui les porte.

**Persistantes :** Se dit de feuilles qui restent vertes en hiver.



## Résumé

*Daphne gnidium* est une plante médicinale largement utilisée dans la médecine traditionnelle, appartenant à la famille des *Thymelacées*, cette étude a été réalisée dans l'objectif d'évaluer l'activité antioxydante, *in vivo* et *in vitro*, des extraits éthanoliques des différentes parties de la plante. Des dosages colorimétriques ont été effectués pour révéler la présence de plusieurs composés phénoliques tels que les polyphénols, flavonoïdes et tanins. La capacité antioxydante a été évaluée en utilisant trois méthodes DPPH, ABTS et Pouvoir réducteur. Le dosage des polyphénols a révélé la richesse de plante en ces composés. De même, l'évaluation du pouvoir scavenger des extraits vis-à-vis du DPPH confirme que l'extrait éthanolique des tiges est plus actif avec un  $IC_{50} = 0.077 \text{ mg/ml}$ . L'étude de l'activité antioxydante *in vivo* a révélé que l'administration journalière par voie orale de l'extrait brut de *Daphne gnidium* (25 et 75 mg/kg) pendant 5 jours et la toxicité a été induite par injection intra péritonéale du paracétamol à 400mg/kg une heure après la dernière dose de l'extrait, La Fluimex® (200 mg/kg) a été utilisée comme une molécule de référence. Il a été montré que le paracétamol augmente significativement les valeurs sériques d'ASAT ( $651.74 \pm 9 \text{ UI/L}$ ) et ALAT ( $181.24 \pm 0.7 \text{ UI/L}$ ) ainsi que le taux hépatique du MDA ( $57.64 \pm 5.28 \text{ nmol MDA /g tissu}$ ), comparativement au groupe témoin.

**Mots clés :** *Daphne gnidium*, polyphénols, antioxydante, paracétamol, hépato protecteur.

## Abstract :

*Daphne gnidium* is plants medicinal largely used in traditional medicine, pertaining to the family of *Thymelacées*, this study is carried out in the objective to evaluate the activity antioxydant, *in vivo* and *in vitro*, of the extracts ethanolic different started from plant. Colorimetric proportionings were carried out to reveal the presence of several antioxydants such as polyphenols, flavonoïdes and tannins. The antioxydant capacity was evaluated by using three methods DPPH, ABTS and Reduction. The results obtained watch the proportioning of polyphenols revealed the richness of plant in these compounds, where contents of  $301.47 \pm 1.26 \text{ (Mg Eq AG/g ms)}$ . In the same way, the evaluation of the capacity trapper of the extracts with respect to the DPPH confirms that the extract ethanolic of the more active stem with  $IC_{50} = 0.077 \text{ mg/ml}$ . The study of the antioxydant activity *in vivo* revealed that the administration day laborer by oral way of the rough extract Of *Daphne gnidium* (25 and 75 mg/kg) during 5 days and toxicity were induced by injection intrapéritonéale of paracetamol with 400mg/kg one hour after the last amount of the extract, the Fluimex® (200 mg/kg) was used like a molecule of reference. It was shown that paracetamol increases significativementles serum values of ASAT ( $651.74 \pm 9 \text{ UI/L}$ ) and ALAT ( $181.24 \pm 0.7 \text{ UI/L}$ ) as well as the hepatic rate of the MDA ( $75.64 \pm 5.28 \text{ nmol MDA/g tissu}$ ), compared to the group conveys

**Key words:** *Daphne gnidium*, polyphenols, antioxydant, protective paracetamol, hépato protective.

## الملخص :

*Daphne gnidium* هو نبات طبي يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي، تنتمي إلى عائلة *Thymelaceae*. أجريت هذه الدراسة من أجل تقييم النشاط المضاد لأوكسدة (*in vitro in vivo*). مستخلصا الاثنانولية لأجزاء مختلفة من النبات. أجريت اختبارات لقياس الألوان للكشف عن وجود العديد من مضادات الأوكسدة مثل البوليفينول، الفلافونويد و التانينات. تم تقييم أيضا قدرة مضادات الأوكسدة باستخدام ثلاث طرق DPPH, ABTS و قدرة الإرجاع. أظهرت النتائج ان النبتة غنية بالمركبات فينول  $301.47 \pm 1.26 \text{ mg AG/g}$  Ms و بالمثل قوة الكسح من المستخلصات فيما يتعلق بال DDPH يؤكد ان المستخلص الاثنانيلي لساق هو الأكثر نشاطا مع  $0.077 \text{ mg}$   $IC_{50} = 0.077 \text{ mg/ml}$  و كشفت دراسة النشاط المضاد لأوكسدة بعد إعطاء الفئران (25/ 75 mg/kg) من المستخلص الخام ل *Daphne gnidium* لمدة 5 أيام عن طريق الفم تسميم الفاران عن طريق حقن 400mg/Kg من البراسيتامول بعد ساعة واحدة من آخر جرعة من المستخلص. Fluimex® 200mg/Kg استخدم أن البراسيتامول قام بزيادة كبيرة في مصل (ASAT ( $651.74 \pm 9 \text{ UI/L}$ ) و كذلك ALAT ( $181.24 \pm 0.7 \text{ UI/L}$ ) و كذلك MDA الكبدية ( $57.64 \pm 5.28 \text{ nmol MDA/g}$  tissu) مقارنة بمجموعة المركبات.

## الكلمات المفتاحية:

*Daphne gnidium*, البوليفينول, مضادات الأوكسدة, البراسيتامول, حماية الكبد