

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Djillali Liabes de Sidi Bel-Abbés  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de l'Environnement  
Laboratoire "Eco-développement des Espaces"

# Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

## Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle

En Sciences de l'Environnement

Option : Gestion, Valorisation des Ressources Naturelles et Développement Durable

Présenté par :

Mustapha Mahmoud DIF

## THÈME

Etude écologique, phytochimique et valorisation des plantes médicinales des  
monts de Tessala (W. de Sidi Bel-Abbés, Algérie NW) : Cas de *Daphne*  
*gnidium* L.

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

**Président** : MOUEDDENE Kada

Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés

**Directeur de thèse** : BENYAHIA Mohamed

Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés

**Co-directeur** : Dr TOUMI BENALI Fouzia

MC-A, UDL de Sidi Bel Abbés

**Examineur** : MEHDADI Zoheir

Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés

**Examineur** : Dr CHADLI Rabah

MC-A, Université de Mostaganem

Année universitaire : 2014-2015

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## Remerciements

*En préambule à cette thèse, je remercie Dieu le tout puissant qui nous a aidés à faire ce travail. Nous souhaiterions adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse.*

*Nous tenons à remercier sincèrement **Madame Toumi Fouzia**, maitre de conférence à l'université Djillali Liabes qui, en tant que responsable de spécialité et Co-encadreur de la thèse, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de cette thèse, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de centre de mesure à la faculté des sciences exactes et au laboratoire de phytochimie à la faculté de science de la nature et de la vie, sous la direction de Monsieur le Professeur **Benyahia Mohamed** de l'université de sidi Bel Abbes le doyen de la faculté de la science de la nature et de la vie. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour son accueil, son soutien et ses nombreux conseils qu'il a su me prodiguer tout au long de ce doctorat.*

*Nous remercions vivement **Pr Moueddene Kada** pour avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous remercions également **Pr Mehdadi Zoheir** pour avoir accepté de participer à ce jury*

*Notre gratitude va également **Dr Chadeli Rabah** pour avoir accepté de participer à ce jury.*

*Nous tenons à remercier **Mr Bouazza Sofiane** qui était avec moi dans tous le chemin de recherche dans les sorties sur terrains et surtout dans la préparation de la mise en forme de manuscrit.*

*Nous souhaitons exprimer Nos remerciements à monsieur le **Pr Benali Mohamed** pour nous avoir autorisée à réaliser la lyophilisation de nos échantillons dans le laboratoire de l'écotoxicologie*

*Nous tenons à remercier **Dr Kazi Tani chokry**, maitre de conférences à l'université de Tlemcen pour tous ces conseils et suggestions. Nous tenons à remercier aussi **Dr Cherifi Kouider** maitre de conférence à l'université de Sidi Bel Abbes pour son soutien surtout dans l'identification de la plantes étudiés et dans la réalisation des relevés floristiques*

*Nous tenons à remercier notre sœur Madame **Dr Benchohera Hadria Amel** qui nous à encourager avec les moyennes physiques et morale dans ce travail et surtout dans l'extraction des flavonoïdes et leurs identifications.*

*Nous tenons à remercier les deux chefs départements de notre faculté **Dr Bouzidi Mohamed Ali** et **Dr Benabderahmane Mokhatr** pour tous les facilités dans notre parcours d'apprentissage et de recherche*

*Nous tenons remercier **Dr Bouterfaz Karim** qui nous a suivi dans notre premier essai de dosage des polyphénols*

*Nous tenons à remercier notre ami et collègue d'étude qui nous a aidés dans notre chemin de recherche et qui nous a motivés dans tous le temps de préparation de ce modeste travail **Mr youcef Bennaïssa Keddar***

*Nous tenons à remercier **Mr Miloua sofianes** mon ami et indigène de la zone d'étude surtout dans son accompagnement dans les sorties sur terrains*

*Nos sincères remerciements vont également à toutes les personnes qui travaillent au laboratoire de centre de mesure ; **madame Narimène Nouredine, madame Baya et monsieur Issa** qui nous ont aidé dans l'expérimentation et dans l'utilisation du matériel de laboratoire*

*Nous tenons à remercier nos camarades et sœurs dans le parcours de troisième cycle : **Faiza Moumen, Hanane Rahmani et Bouzidi Khadidja***

*Nous tenons remercier madame pour son travail que nous l'oublions pas*

*Nous tenons à remercier nos meilleurs camarades et frères **Rahmani Mohamed et Saidi Boubakr** collègues de recherches et d'enseignement de module de pharmacognosie à l'université d'Oran*

*Nous tenons remercier notre meilleur ami qui nous a bien aidé avec son soutien moral et Matériel et que nous souhaitons bien la réussite de cette personne intellectuelle et adorable **Mr Nabil Mekfifi***

*Nous tenons à remercier nos amis de promenade et de joie **Mr Hichem Mai, Fares Ali ; Ismail Aced** ainsi que mes amis de l'ancien Temps **Bouroumi Ahmed Amine, Zoua Chihab Eddin et l'adorable Djeloul dawadji Abdelkader***

*Nous tenons à remercier Mlle **Hebbache Zahida Yasmina** pour son aide dans le domaine scientifique et technique et aussi nous avons apprécié son soutien moral dans notre parcours et nous souhaitons qu'Allah la bénisse et de la réussite dans son domaine privé et professionnel.*

## Dédicace

*Je dédie ce travail à toute personne qui  
m'aime et qui m'a soutenu dans ma vie.*

*À mes parents qui m'ont soutenue dans mon  
chemin et qu'Allah les bénissent.*

*À mon frère et mes deux sœurs.*

*À tous mes amis sans exception.*

*Mustapha*

## Résumé

La région de Tessala (wilaya de Sidi Bel-Abbés) présente une richesse spécifique du point de vue biodiversité végétale qui est utilisée sur le plan ethnobotanique et qui mérite d'être exploitée par l'industrie, surtout pharmaceutique et ce pour un développement durable.

*Daphne gnidium*, est une espèce qui en fait partie, connue pour son importance écologique. Elle est d'un grand intérêt dans le maintien de la biodiversité, dont sa richesse en principes actifs et en substances naturelles lui confèrent des vertus thérapeutiques, méritant d'être étudiée et valorisée et ce par la détermination de leurs caractéristiques phytochimiques, leur profil chimique et leur activité antioxydante. A partir de là, on peut déduire son intérêt industriel, tout en proposant sa domestication et sa culture dans les champs des cultures industrielles.

A cet effet, et dans le même ordre de cette stratégie, on a mis en relief les caractéristiques de cette espèce avec, en première partie :

Une enquête ethnobotanique a été réalisée dans la zone d'étude, avec la localisation de l'espèce concernée. L'enquête a révélé l'importance phytothérapeutique de onze (11) plantes médicinales, sans aucune donnée sur *Daphne gnidium* L., tout en sachant que cette dernière est présente en abondance dans la dite zone. Sa présence est liée aux facteurs naturels, en particulier à l'exposition, au relief et à la composition physico-chimique du sol, s'ajoute à ces facteurs la pression anthropique qui est exercée d'une manière imprudente.

Aussi, on a essayé d'inventorier toutes les espèces accompagnant *Daphne gnidium* et qui forment son cortège floristique. A ce sujet, huit (08) stations ont été choisies sur les versants Nord et Sud de la zone d'étude. Cette opération d'inventaire floristique nous a permis de recenser 46 espèces, appartenant à 23 familles, avec 5 types biologiques et 14 origines biogéographiques. De même, une esquisse pédologique des sols de ces stations a été réalisée, et ce, par des analyses physico-chimiques.

Dans le même contexte écologique, et pour identifier l'origine de dissémination de cette plante, un test de germination des graines déféquées de *Daphne gnidium* a été réalisé dans les conditions optimales de laboratoire. Ici, il y'a lieu de préciser que les graines ont été récoltées des matières fécales de l'oiseau *Passer domesticus*, qui représente un moyen biologique pour la levée de dormance embryonnaire. Pour confirmer le résultat obtenu, un traitement chimique à l'acide chlorhydrique a été appliqué sur des graines de *Daphne gnidium*, et ce, pour une

éventuelle levée de dormance. Le traitement était probant et a mis en évidence le caractère ornithochore de l'espèce.

Dans la deuxième partie de ces recherches de thèse, on a déterminé l'impact des facteurs écologiques de la zone d'étude, en particulier l'altitude et l'exposition, sur la teneur des composés phénoliques (une grande famille des métabolites secondaires) dans les feuilles de *Daphne gnidium*. Les résultats ont montré que les teneurs des phénols totaux, des flavonoïdes totaux, des tanins condensés ainsi que l'activité antioxydante de l'espèce, sont positivement corrélés avec l'altitude et les composés phénoliques plus concentrés au niveau des individus de *Daphne gnidium*, localisés dans l'exposition Sud plutôt que ceux situés dans l'exposition Nord.

Dans le même cadre de l'étude phytochimique, on a abordé aussi la caractérisation chimique des flavonoïdes dans les tiges et les fleurs de l'espèce, et ce, par la méthode d'extraction liquide-liquide et les méthodes d'identification spectrophotométrique UV et RMN et la chromatographie HPLC, qui ont mis en évidence la présence de six (06) molécules caractéristiques de *Daphne gnidium*.

La valorisation de ces composés flavonoïques a été confirmée par le biais de leur activité antioxydante, qui a révélé un résultat satisfaisant.

**Mots clé :** Région Tessala, *Daphne gnidium*, ethnobotanique, impact facteurs écologiques, étude phytochimique, valorisation, composés flavonoïques, activité antioxydante.

## Abstract

The Tessala region (western Algeria) has a richness of plant biodiversity point of view that is used on the ethnobotany plan that needs to be exploited by the industry, particularly the pharmaceutical industry for a sustainable development plan.

*Daphne gnidium* is a species that is part of it is known by its ecological importance. It is of great interest in the maintenance of biodiversity, but its richness in active ingredients and natural substances conferring therapeutic virtues worthy of consideration and valued, and that, in determining their phytochemical characteristics, chemical profiles and their antioxidant activities; from there we deduce its industrial interests, proposing thus domestication and culture to the extent possible, in the fields of industrial crops.

For this and in the same order of this strategy, we have highlighted the characteristics of this species, initiating in the first part of this work:

An ethnobotanical survey in the study area in question, and locating our species through this study. Thus, the survey found an 11 herbal importance of medicinal plants, but no data has been raised for the *Daphne gnidium* L. plant, knowing that the species is abundant and behaves perfectly in our study area. His presence at the area in question is related mainly to environmental factors in particular exposure, terrain and the physico-chemical composition of the soil, in addition to these factors the human pressure exerted in a reckless manner.

At the same time, we tried to inventory all species that accompany *Daphne gnidium* and forms its floristic. For this, eight stations are selected on both sides of the study area. Note this floristic inventory has allowed us to recognize 46 species belonging to 23 families, with 5 biological types and 14 biogeographic origins. A soil characteristic selected stations has been demonstrated through the physico-chemical analyzes of soil.

At the same ecological context and to identify the source of dissemination of this plant, seed germination test defecated *Daphne gnidium* was started under optimal laboratory conditions; these seeds were collected feces of the bird *Skip domesticus*, which represents made, a biological medium for the survey of embryo dormancy. To confirm our study, a chemical treatment is applied to the seeds of the *Daphne gnidium* (hydrochloric acid) for possible embryo dormancy; This study highlighted the ornithochore character of the species.

In the second part of this study, we determined the impact of environmental factors in the study area, including the altitude and exposure on the content of phenolic compounds (a large family of secondary metabolites) in the leaves *Daphne gnidium*. The results show that the contents of total phenols, total flavonoids and condensed tannins, and the antioxidant activity of the species are positively correlated with altitude and that the phenolic compounds are more concentrated at the *Daphne gnidium* individuals located in the southern exposure rather than individuals located in the northern exposure.

In the same context of the phytochemical study, we began the chemical characterization of flavonoids in the stems and flowers of the species, opting for liquid-liquid extraction method and UV spectrophotometry identification methods, NMR and HPLC, which revealed the presence of five molecules characteristic of *Daphne gnidium*.

The valuation of these flavonoïques compounds was confirmed through their antioxidant activity showed a satisfactory result.

Keywords: Tessala region, *Daphne gnidium*, ethnobotany, ecological impact, phytochemical study, valuation, flavonoïques compounds, antioxidant activity.

## مُلخَص

منطقة تسّالة (ولاية سيدي بلعبّاس) معروفة بتنوعها البيولوجي النباتي الذي لطالما تعمقت فيه الأبحاث العلمية والتي تستحق أن تستغل من قبل المؤسسة الصيدلانية لاستخلاص العقاقير الطبية.

الدراسة الأثنوبوتانيكية، التي أجريت في منطقة كشفت عن الأهمية الطبية لـ 11 عشبة نباتية والتي استدرجنا منها بحثنا المتمحور حول نبتة اللازاز *Daphne gnidium* L. والتي تفتقر المكتبة الجامعية بمعلومات جامعة نحو هذه النبتة في الإطارين النباتي و الكيميائي

دراسة حول النباتات المرافقة للازاز في ثماني محطات مختارة على كل من جانبي الجبل من منطقة الدراسة أثبتت أن هذه النبتة ترافق 46 نوعا نباتيا تنتمي إلى 23 عائلة، 5 أنواع البيولوجية و 14 أصول جغرافية. التجارب المخبرية الإكفيزيولوجية حول ثمرة اللازاز أثبتت الإرتباط الوثيق بين هذه النبتة و العصافير الثمرية في عملية الإنتشار .

أثبتت الدراسة النباتية الكيميائية الإكولوجية عن التناسب الطردي بين المركبات البوليفونولية و الخاصية المضادة للأكسدة لها مع الإرتفاع كما أن نسبة هذه المركبات تزيد في الجانب الجنوبي أكثر من الشمالي من الجبل الدراسة الكيميائية المعمقة للأغصان أثبتت وجود 6 فلافونويدات لأول مرة في هذه الأجزاء من النبتة و هذا باستعمال تقنيات UV، RMN، HPLC، كما تميزت هذه المستخلصات بخاصية مضادة للأكسدة عالية.

الكلمات المُفتاحيّة: تسالة، تقييم، أثنوبوتانيكية، اللازاز، كيميائية نباتية إكولوجية، البولوفينولات، الخاصية مضادة للأكسدة، HPLC، فلافونويدات، العوامل الإكولوجية

# Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
مُلَخَّصٌ	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des Abréviations	
Introduction générale.....	1

## Partie bibliographique

### *Chapitre I: Généralités sur la phytothérapie*

I.1 Introduction.....	4
I.2 Historique.....	4
I.2.1 Ancienne philosophie sur l'utilisation des plantes médicinales .....	5
I.2.2 Philosophie moderne pour l'utilisation des plantes médicinales.....	5
I.3 Les différentes méthodes de préparation des plantes médicinales .....	6
I.3.1 L'infusion.....	6
I.3.2 La décoction.....	6
I.3.3 La macération.....	7
I.3.4 Le suc.....	7
I.3.5 Les compresses et les cataplasmes.....	7
I.4 Conclusion .....	7

### *Chapitre II: Les polyphénols*

II.1 Introduction.....	8
II.2 Composés phénoliques dans la plante .....	9
II.2.1 Répartition cellulaire et tissulaire dans les différents organes de la plante.....	9
II.3 Structure, Biosynthèse et classification des composés phénoliques .....	9
II.4 Les flavonoïdes.....	10
II.4.1 Localisation et distribution .....	12
II.4.2 Rôle des flavonoïdes dans les plantes .....	13
II.4.3 Propriétés biologiques .....	14
II.5 Les tanins.....	16
II.5.1 Tanins hydrolysables .....	16
II.5.2 Tanins condensés.....	16

II.5.3 Activités biologiques et thérapeutiques des tanins.....	17
II.6 Les coumarines.....	21
II.6.1 Propriétés biologiques.....	21
II.7 Lignines.....	22
II.8 Conclusion.....	22

### *Chapitre III: Généralités sur l'activité antioxydante*

III.1 Introduction.....	23
III.2 L'oxydation.....	23
III.2.1 Antioxydants naturels.....	24
III.2.2 Mécanisme d'action des antioxydants.....	25
III.3 Méthodes de tests antioxydants.....	25
III.3.1 Test mesurant l'activité antioxydante contre le lysosome.....	25
III.3.2 Test par CCM.....	26
III.4 Conclusion.....	26

### *Chapitre IV: Généralités sur l'espèce Daphne gnidium L*

IV.1 Aperçu sur la famille des Thymeleacées.....	27
IV.2 Aperçu sur le genre Daphne.....	27
IV.2.1 Caractérisation morphologique et botanique.....	27
IV.2.2 Quelques espèces du genre Daphné.....	28
IV.3 Identification du <i>Daphne gnidium</i> .....	29
IV.3.1 Classification de l'espèce.....	29
IV.3.2 Caractéristique morphologique et botanique.....	29
IV.3.3 Ecologie.....	31
IV.3.4 Utilisation traditionnelle.....	32
IV.3.5 Pharmacologie.....	32
IV.3.6 Toxicité.....	33

## Partie expérimentale

### *Chapitre V: Présentation de la zone d'étude*

V.1 Présentation de la zone d'étude.....	34
V.2 Contexte spatial.....	35
V.2.1 La zone montagneuse de Tessala.....	35
V.2.2 La zone de piémonts.....	36
V.2.3 La zone de plaine.....	36
V.3 Le cadre physique.....	37

V.3.1 Géologie .....	37
V.3.2 Stratigraphie et tectonique.....	37
V.3.3 Hydrographie et ressources hydriques .....	38
V.4 Géomorphologie.....	39
V.4.1 Altitude.....	39
V.4.2 Expositions .....	39
V.4.3 Les pentes .....	39
V.4.4 Erosion et risques naturels.....	40
V.5 Principaux types de sols .....	41
V.6 Caractéristiques climatiques.....	42

<i>Chapitre VI: Matériels et méthodes</i>
---

VI.1 Méthodologie retenue .....	44
VI.2 Etude écologique.....	44
VI.2.1 Etude ethnobotanique.....	44
VI.2.2 Etude autoécologique.....	45
VI.2.3 Etude de la dissémination de l'espèce .....	47
VI.2.4 Etude Eco-phytochimique.....	49
VI.3 Extraction des flavonoïdes au niveau des tiges et évaluation de leur activité anti oxydante .....	58
VI.3.1 Caractérisation des composés par HPLC.....	59
VI.3.2 Etude statistique .....	62

<i>Chapitre VII: Résultats et discussion</i>
--

VII.1 Résultats de l'étude ethnobotanique .....	64
VII.2 Résultats de l'étude autoécologique .....	66
VII.2.1 Note sur le cortège floristique du <i>Daphne gnidium</i> .....	66
VII.2.2 Résultats des analyses physico-chimiques du sol.....	71
VII.3 Résultats de l'étude de La dissémination .....	72
VII.4 Résultats de l'étude éco-phytochimique.....	74
VII.5 Détermination des composés phénoliques des fleurs du <i>Daphne gnidium</i> et de leur pouvoir antioxydant..	86
VII.6 Résultats de l'extraction des flavonoïdes au niveau des tige et caractérisation de leur profil chimique .....	87
VII.6.1 Extraction des flavonoïdes des tiges de <i>Daphne gnidium</i> .....	87
VII.6.2 Identification et caractérisation du profil chimique des extraits flavonoïdique de la tige du <i>Daphne gnidium</i> .....	88
VII.6.3 Détermination de l'activité antioxydante des extraits flavonoïques des tiges du <i>Daphne gnidium</i> .....	94
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>96</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>98</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Structure des tanins condensés .....	17
Figure 2 : Structure générale d'une molécule de coumarine .....	21
Figure 3 : Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae .....	27
Figure 4 : <i>Daphne gnidium</i> L en stade fin floraison, début de fructification.....	30
Figure 5 : Les feuilles de <i>Daphne gnidium</i> L. en disposition alternée.....	31
Figure 6 : Plante de <i>Daphne gnidium</i> en plain floraison.....	33
Figure 7 : Carte de localisation de la zone de Tessala dans l'ouest algérien .....	34
Figure 8 : Localisation de la zone d'étude fait partie à la région de Sidi Bel Abbes.....	35
Figure 9 : Commune de Tessala vue en 3D .....	36
Figure 10: la plante <i>Daphne gnidium</i> dans les garigues des monts de Tessala .....	46
Figure 11 : les graine de <i>Daphne gnidium</i> dans les déféqués d'oiseau <i>Passer domesticus</i> .....	48
Figure 12 : l'oiseau passer domesticus .....	48
Figure 13: la conservation des feuilles collectées de <i>Daphne gnidium</i> dans des boites isothermes.....	50
Figure 14 : la répartition des stations d'échantillonnage pour l'étude écophytochimique dans les monts de Tessala .....	51
Figure 15: la macération des feuilles de chaque station dans le méthanol (96%) .....	52
Figure 16 : la coloration bleue des extraits dosés pour les phénols totaux .....	54
Figure 17 : réactif de folin cicaltieux dilué 10 fois (couleur jaune).....	54
Figure 18 : homogénéisation des solutions préparer à base des sels minéraux (nitrate de sodium, carbonate de sodium, Trichlorure d'aluminium...) .....	55
Figure 19 : la pesée des réactifs à base des poudres par la balance de précision.....	55
Figure 20: Lecture par spectrophotomètre .....	56
Figure 21: Addition des réactifs par micropipette.....	56
Figure 22: spectrophotomètre utilisé pour la lecture des absorbances.....	57
Figure 23 : l'activité antioxydante des flavonoïdes par la méthode de DPPH .....	59
Figure 24 : pourcentage des maladies remédiées par les plantes échantillonnées .....	66
Figure 25: Nombre des espèces inventoriées par station .....	69
Figure 26 : Répartition des espèces recensées par familles en % .....	69
Figure 27 : Spectre biologique des espèces recensées en % .....	70
Figure 28 : Spectre biogéographique des familles des recensées en % .....	71
Figure 29 : Le taux de germination des graines et fruits de <i>Daphne gnidium</i> L.....	74
Figure 30: Concentration des phénols totaux des feuilles de <i>Daphne gnidium</i> à différentes altitudes dans les deux exposition.....	75
Figure 31: Concentration des flavonoïdes totaux des feuilles de <i>Daphne gnidium</i> à différentes altitudes dans les deux exposition.....	75
Figure 32: Concentration des Tanins condensés des feuilles de <i>Daphne gnidium</i> à différentes altitudes dans les deux exposition.....	76

Figure 33 : corrélation entre les concentration des différents composés phénoliques des feuilles de <i>Daphne gnidium</i> L. et l'altitude .....	80
Figure 34: présentation de l'analyse factorielle des correspondances sur la relation entre la concentration en composés phénoliques et les paramètres écologiques .....	78
Figure 35: Concentration des phénols totaux de <i>Daphne gnidium</i> selon l'état des feuilles et l'altitude.....	81
Figure 36: Concentration des flavonoïdes totaux de <i>Daphne gnidium</i> selon l'état des feuilles et l'altitude. ....	82
Figure 37: Concentration des tanins condensés de <i>Daphne gnidium</i> selon l'état des feuilles et l'altitude. ....	82
Figure 38: l'activité antioxydante des extraits méthanoliques évalué en IC 50 dans les différentes altitudes des monts de Tessala.....	84
Figure 39: les dosage des composés phénoliques des fleurs de <i>Daphne gnidium</i> à deux altitudes : 830 m et 1061 m .....	86
Figure 40:l'activité antioxydante des composés phénoliques des fleurs de <i>Daphne gnidium</i> dans les altitudes 830 m et 1061m. ....	87
Figure 41: les spectres d'HPLC des différents standards de flavonoïdes.....	89
Figure 42: structures des molécules identifiées dans les différentes fractions de la tige de <i>Daphne gnidium</i> .....	91
Figure 43: Le spectre d'HPLC de la fraction du chloroforme de la tige de <i>Daphne gnidium</i> .....	90
Figure 44: Le spectre d'HPLC de la fraction de n-butanol de la tige de <i>Daphne gnidium</i> .....	90
Figure 45: Le spectre d'HPLC de la fraction de l'acétate d'éthyle de la tige de <i>Daphne gnidium</i> .....	90
Figure 46: le spectre d'HPLC de la fraction aqueuse de la tige de <i>Daphne gnidium</i> .....	93
Figure 47: Le spectre RMN C13 de la fraction aqueuse des tiges de <i>Daphne gnidium</i> .....	93
Figure 48: Le spectre RMN H1 de la fraction aqueuse des tiges de <i>Daphne gnidium</i> .....	93
Figure 49: Structure des molécules identifiées dans les extraits des tiges de <i>Daphne gnidium</i> .....	94
Figure 50 : activité antioxydante des différentes fractions des tiges de <i>Daphne gnidium</i> évaluées en IC50 .....	95

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques.....	10
Tableau 2 : Structure chimique de quelques flavonoïdes. ....	11
Tableau 3 : Sources alimentaires des flavonoïdes.....	12
Tableau 4 : Contenu en flavonoïdes de quelques aliments végétaux (poids à l'état frais en mg / kg). ....	13
Tableau 5 : Classe de pentes et importance en hectare.....	40
Tableau 6 : Stabilité des terrains dans les monts de Tessala.....	41
Tableau 7 : modèle du tableau utilisé pour l'enquête ethnobotanique.....	45
Tableau 8 : Condition stationnelles des sites choisis .....	50
Tableau 9: Tableau globale des relevés floristiques (a-b-c) .....	67
Tableau 10 : Résultats des analyses physico-chimiques du sol .....	72
Tableau 11 : Résultats de l'impact des deux paramètres écologiques sur les concentrations des composés phénoliques extraites des feuilles du <i>Daphne gnidium</i> L.....	74
Tableau 12 : Résultats du dosage des composés phénoliques extraits des feuilles fraîches et des feuilles séchées par rapport l'altitude. ....	80
Tableau 13: Résultats de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des feuilles fraîches, séchées à l'étuve et séchées à la température ambiante du <i>Daphne gnidium</i> .....	84
Tableau 14 : Résultats du dosage des phénol totaux, des flavonoïdes,et l' IC 50 des différents extraits des tiges de <i>Daphne gnidium</i> L.....	88
Tableau 15 : composés identifiés dans les différentes fractions flavonoïques du <i>Daphne gnidium</i> par HPLC.....	89
Tableau 16 : Les bandes RMN 1H et 13C utilisées pour l'identification du composé de l'extrait aqueux de <i>Daphne gnidium</i> L.....	92

## Liste des Abréviations

**ACP** : Analyse des composantes principale

**AFC** : analyse factorielle des correspondances

**DSA** : direction des services agricoles

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**ONM** : office nationale météorologique

## Introduction générale

L'Algérie, pays connu pour ses ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3200 espèces de plantes dont 15% sont endémiques et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Gaussen, 1982**).

L'étude de la flore de la méditerranée, en générale, et celle de l'Oranie en particulier, était abordé par plusieurs auteurs durant ces dernières décennies tel que **Ben Abdallah(2010)**, **Hadjadj Aoul (1995)**, **Alcaraz (1983)**, **Guinochet (1980)**, **Quézel (1964)**.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la flore médicinale de la région des monts de Tessala (ouest algérien) qui dispose d'une richesse singulière et variée. On compte environ 193 espèces distribuées sur 49 familles et 146 genres. Cette même flore recense 103 plantes à caractère médicinal et aromatique et à usages très diversifiés au niveau de la zone et par les populations riveraines. (**Baraka, 2008**)

Dans le contexte socio-économique des pays en voie de développement, l'étude des plantes peut aboutir à l'obtention des réponses thérapeutiques adéquates et à de faible prix, joignant à une efficacité scientifique prouvée et une acceptabilité culturelle optimale. La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes.

Aujourd'hui, la recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur la répartition des plantes médicinales et sur les études ethnobotaniques qui permettent de réaliser des inventaires de plantes, d'une zone ou d'un pays, puis par des études phytochimiques et pharmacologiques. De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays (**Muanda et al., 2009**)

Les plantes aromatiques et médicinales ont de nombreuses utilisations. Elles sont employées, soit sous leur forme naturelle, comme condiment et en pharmacopée traditionnelle, soit pour en extraire le principe actif, recherché par les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (**Muanda et al., 2009**).

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un regain exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs,

qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (**Verdrager, 1978 ; Fernandez, 2003**).

Seule une petite partie de 420000 espèces végétales connues dans le monde était exploitée sur le plan phytochimique et pharmacologique (**Waridel, 2013**), sachant qu'une espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents et d'intérêts variés.

La phytochimie est une étude basée sur les plantes, qui se situe à l'interface de nombreuses sciences appliquées comme la pharmacie, la chimie, la biologie, et la médecine. Elle date depuis longtemps et reste toujours un sujet d'actualité malgré les développements exponentiels des différents domaines tel que la biotechnologie et la chimie qui s'intéressent surtout à la production de nouvelles molécules dites synthétiques (**Brunento, 2003**).

Ainsi, les métabolites secondaires les plus responsables à cet effet phytothérapeutique sont influencés par les facteurs biotiques et abiotiques (**Ncube et al., 2012**).

De l'autre côté, la préservation de ce savoir constitue un enjeu pour la conservation et la valorisation des ressources phytogénétiques. La conservation et la valorisation de la diversité des ressources génétiques des plantes d'un pays supposent d'abord la connaissance précise de ce patrimoine. Partant de la complexité d'une flore en perpétuelle évolution, la définition d'une stratégie optimale donnant tous les moyens aux opérateurs constitue la garantie pour atteindre cet objectif (**Chemli, 1997**).

Pour cela, on propose une démarche qui consiste à approfondir les connaissances sur l'espèce *Daphne gnidium* de la région de Tessala sur le plan écologique et éco-phytochimique.

Ainsi, le présent travail, est composé de deux parties distinctes :

La première partie est une synthèse bibliographique qui porte sur la phytothérapie, comme premier chapitre, puis la phytochimie avec une description des métabolites secondaires responsables des vertus thérapeutique des plantes, en précisant ceux qui sont développés dans notre étude, tels que, les polyphénols et leurs activités anti oxydante ; enfin, un état de connaissance sur le *Daphne gnidium* est aussi entamé.

La deuxième partie consiste à présenter la zone d'étude concernée et adopter une méthodologie de travail qui met le point sur trois volets distincts mais complémentaires :

Le premier axe est un axe écologique qui traite les volets suivants :

- Le volet ethnobotanique de la zone d'étude, avec une note du cortège floristique associé au *Daphne gnidium* et cependant la période de l'étude et la caractéristique du sol à travers des analyses physico-chimiques ;
- La détermination de l'origine de dissémination de la plante est aussi entamé dans cette étude écologique comme second volet, pour mettre en évidence, le caractère ornithochore de l'espèce, à travers le test de germination des graines déféquées du *Daphne gnidium*;
- Le troisième volet traite de l'impact des paramètres écologiques, sur la composition phytochimique de l'espèce, notamment l'altitude et l'exposition de la région.
- Le deuxième axe est phytochimique, qui s'intéresse à deux volets :
  - le premier, concerne l'identification et la caractérisation phytochimique de certains composés naturels, en particulier les flavonoïdes du *Daphne gnidium*, par différentes méthodes d'analyse, notamment la RMN et la HPLC ;
  - le second, porte sur la valorisation des flavonoïdes extraits du *Daphne gnidium* en déterminant leur activité anti oxydante.

L'interprétation des résultats obtenus a fait l'objet de comparaisons avec des résultats de recherches antérieures, tout en essayant de les expliquer sur la base de notions fondamentales.

Les deux parties sont terminées par une conclusion générale.

*Partie bibliographique*

---

---

# Chapitre I: Généralités sur la phytothérapie

---

---

## I.1 Introduction

Depuis son existence sur terre, l'homme reconnaissait et utilisait les plantes pour sa nutrition ainsi que pour traiter diverses maladies.

Au cours de ces dernières années, les résultats des recherches conduites par les spécialistes (Médecins, biologistes, chimistes, pharmaciens, ethnologues, botanistes, agronomes, écologistes, économistes) concourent à démontrer les effets néfastes des médicaments à base des produits chimiques pour l'organisme de l'être humain et l'importance et l'efficacité des plantes médicinales et des produits provenant de l'agriculture biologique.

Les plantes médicinales et les produits biologiques : fruits, légumes, huile d'olive... constituent un véritable trésor de santé, de dynamique et de beauté pour l'organisme de l'être humain. Ces produits naturels sont très demandés à travers le monde, dont il est temps de multiplier nos efforts pour faire évoluer ce domaine, plantes médicinales et cultures biologiques, par l'application des résultats des recherches scientifiques et des techniques appropriées de production, de protection, de conservation et d'exploitation rationnelle (**Sassi, 2008**).

## I.2 Historique

Pour calmer ses maux, l'homme s'est depuis toujours servi des plantes. Il leur a attribué des pouvoirs magiques, puis a appris peu à peu à discerner leurs propriétés. En Occident, dans la Grèce antique, Hippocrate (460-377 av. J.-C.), surnommé le père de la médecine, recommandait déjà l'asperge et l'ail pour leurs vertus diurétiques, le pavot comme hypnotique et les feuilles de saule pour soulager douleurs et fièvre... Au début de notre ère, un autre médecin grec, Dioscoride, établit le premier herbier des plantes médicinales. Traduit en arabe et en persan, ce traité sera utilisé quelques siècles plus tard par les savants musulmans, qui influenceront les grandes universités de l'époque, notamment celle de Montpellier, le centre européen le plus réputé en botanique (**Iserin, 2001**).

Grâce aux échanges avec l'Afrique et l'Asie, la pharmacopée végétale occidentale va s'enrichir de nombreuses plantes et épices exotiques. On y trouvera désormais camphre, gingembre, cannelle, noix muscade, santal, curcuma, ginseng ou séné.

Mais qu'il s'agisse de plantes locales ou de végétaux d'origine plus lointaine, leur usage sera longtemps basé sur des croyances plus ou moins fantaisistes. Pendant tout le Moyen Âge, superstitions, magie et observations empiriques s'entremêlent dans la thérapeutique par les

plantes. A partir de la renaissance, la science va, pour la première fois, rejeter les élixirs d'alchimistes et autres remèdes magiques. Les plantes locales, soigneusement récoltées, sont largement employées sous forme de tisane, de décoction ou d'onguent : elles constituent l'essentiel des traitements dont on dispose pour se soigner, selon des formules transmises par la tradition.

La racine de mandragore était censée traiter la stérilité masculine, comme le suggère cette illustration extraite d'un manuscrit italien du XIV<sup>e</sup> siècle, l'Herbier de trente (**Herisset, 1974**)

### **I.2.1 Ancienne philosophie sur l'utilisation des plantes médicinales**

Selon la tradition orientale, les plantes vertes permettent d'associer l'élément terre et l'élément eau, d'où elles tirent leur vitalité, l'élément bois, mais aussi l'élément air qu'elles purifient sans cesse (**Debigue, 1984**).

L'énergie dégagée par les cinq éléments (terre, feu, eau, air et bois) participe à l'équilibre des énergies de l'homme, donc à son efficacité, à son moral et à sa santé.

L'élément terre est un principe de stabilité et d'abondance : on placera dans la pièce principale d'une maison une pierre, sculptée ou non, ou un objet, utilitaire ou décoratif, parfois un simple caillou trouvé sur un chemin pendant une promenade.

L'élément feu donne de la chaleur, physique ou symbolique, apporteuse de certaine détente et rend l'esprit plus clair. Grâce à l'élément feu présent dans une maison, on trouvera plus aisément des réponses aux problèmes posés. L'élément feu conduit à l'illumination spirituelle. Une cheminée qui brûle doucement, quelques bougies suffisent à apporter une énergie indispensable à tous ceux qui vivent dans la maison. L'élément air est facilement accessible, puisqu'il suffit d'ouvrir la fenêtre d'une pièce pour bénéficier de son énergie bienfaisante (**Debigue, 1984**).

L'élément air, comme l'élément eau, contribue à clarifier l'esprit et les idées, donne des ailes à l'imagination, lorsqu'on l'inspire jusqu'au fond des poumons, il donne de surcroît une impression de liberté quand bien même on est dans l'impossibilité de se déplacer.

L'élément bois est présent par des meubles en bois naturel (**Bardin, 2004**).

### **I.2.2 Philosophie moderne pour l'utilisation des plantes médicinales**

L'ethnopharmacologie, c'est-à-dire la recherche des plantes à action thérapeutique. Cette enquête empirique a permis d'inventorier un très grand nombre de végétaux dont la réputation

est établie, qui avaient déjà été utilisés par la médecine populaire. Après ce premier recensement, il sera nécessaire d'établir leurs qualités thérapeutiques selon les habitudes des pays concernés. Ainsi, la médecine chinoise, qui œuvre depuis plus de 4000 ans, a mis à l'honneur le Ginseng : celui-ci jouit d'une action bénéfique polyvalente sur l'organisme. Or, les données pharmacologiques récentes rejoignent la renommée populaire très ancienne. Les saponosides qu'il renferme agissent comme des anabolisants généraux et donnent au consommateur une plus grande résistance à la fatigue, des réflexes augmentés tout en régénérant les tissus. Ceci a été prouvé par des études expérimentales *in vitro* et *in vivo* (**Bruneton, 2003**).

A l'origine, une certaine croyance populaire était fondée sur la ressemblance d'une partie de la plante avec un organe. Ainsi, les racines de Ficaire et celles de Marron d'Inde avaient une certaine ressemblance avec les hémorroïdes. On a isolé de ces plantes des saponosides, dont l'action anti-inflammatoire justifiait l'emploi.

Les observations cliniques et les expérimentations pharmacologiques dépassent souvent encore la connaissance chimique de la plante. Lorsque ce travail de défrichage est fait, une autre science entre en jeu (**Iserin, 2001**).

### **I.3 Les différentes méthodes de préparation des plantes médicinales**

L'utilisation des plantes médicinales quel que soit le principe de la préparation des essences à base des plantes médicinales ou à partir de l'utilisation directe, est différente selon le principe actif ainsi que la maladie souhaitant traité.

#### **I.3.1 L'infusion**

Elle consiste à verser de l'eau bouillante sur des plantes au moment précis où l'eau entre en ébullition. Il faut alors couvrir le récipient et laisser infuser le temps nécessaire (de dix minutes à une heure selon les plantes) (**Sassi, 2008**).

#### **I.3.2 La décoction**

Il s'agit de faire bouillir l'eau dans laquelle on a mis les plantes. Le temps d'ébullition va de 10 minutes à une demi-heure selon la (ou les) plante(s).

Infusion et décoction supportent bien les mélanges de plantes. Bien entendu, il faut veiller à ne mélanger que des plantes qui doivent subir le même type de préparation (**Babaissa, 2011**).

### **I.3.3 La macération**

Les plantes sont laissées à tremper dans un liquide : eau, alcool, huile, miel, vin, vinaigre, etc. Pendant une période d'au moins 15 jours. Les préparations obtenues sont un peu plus compliquées mais se gardent plus longtemps. On peut donc toujours en avoir sous-main (**Lacoste, 2011**).

### **I.3.4 Le suc**

Il suffit de réduire la plante en purée. Il est préférable de le faire avec des plantes fraîches mais parfois- quand la plante est trop épaisse ou donne peu de jus – il est nécessaire de la cuire dans un peu d'eau. Une fois la purée de pulpe obtenue, filtrer et boire le suc dilué dans un peu d'eau ou l'utiliser en compresse. Cette méthode est rarement employé, car le produit obtenu est souvent très amer et ne se conserve pas (**Herisset, 1974**).

### **I.3.5 Les compresses et les cataplasmes**

Compresses et cataplasmes sont principalement utilisés dans les cas de problèmes de peau, les entorses, les fractures, et les douleurs musculaires ou articulaires.

N'utilisez que des plantes parfaitement saines (**Mantas, 1984**).

## **I.4 Conclusion**

La phytothérapie a pris son origine de puis l'ancien temps ainsi les textes et les traces historiques nous ont prouvé cette utilisation. Depuis, elle a évolué par le développement intellectuelle de l'homme et elle s'est transformée d'une utilisation ethnique, d'où l'ethnoécologie vers une utilisation ethnopharmacologique, avec la découverte des molécules et de leurs activités biologiques qui a validé l'utilisation traditionnelle de ces plantes dans la plus part des temps, et qui a corrigé des fois la mauvaise utilisation de ses vertus

Dans le chapitre qui va suivre, on va discuter une famille de ces molécules intéressantes dans la pharmacognosie et qui ont prouvé leurs pouvoirs médicamenteux

---

---

## Chapitre II: Les polyphénols

---

---

## II.1 Introduction

Les plantes sont d'une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une partie importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Rang, 2013**)

★ **Les métabolites primaires** sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

★ **Les métabolites secondaires** sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures.

Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (**Bruneton, 1997**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires (**Bruneton, 1997**).

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la héli-synthèse de composés actifs. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi était dues leurs actions bénéfiques. L'isolement des principes actifs au XIX<sup>ème</sup> siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement (**Mohan et al., 2009**).

## II.2 Composés phénoliques dans la plante

### II.2.1 Répartition cellulaire et tissulaire dans les différents organes de la plante

Le niveau d'accumulation des composés phénoliques dans les différents tissus et organes de la plante apparaît toujours comme la résultante entre leur biosynthèse et leur utilisation et/ou leur dégradation. On ne peut exclure non plus que certains de ces composés puissent se déplacer dans la plante comme cela a été suggéré pour l'acide salicylique. Cet éventuel transport ne semble cependant pas concerner la plupart des molécules phénoliques comme cela a été montré récemment dans le cas des flavonoïdes dont la synthèse et l'accumulation ont lieu dans les mêmes cellules (Peer *et al.*, 2001).

À l'échelle cellulaire, la répartition des composés phénoliques est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans les deux parts de la paroi cellulaire où sont présentes les lignines (et quelques flavonoïdes et des molécules associées aux lignines comme l'acide férulique), ou la vacuole, où sont stockés les phénols solubles (l'acide chlorogénique, l'anthociane, le flavanol, le tanin...). Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique, mais toujours à très faible concentration. La répartition subcellulaire des composés phénoliques n'est modifiée que lorsque des perturbations membranaires interviennent, soit au cours de certaines évolutions physiologiques, soit à la suite des divers traitements. L'apparition de brunissement en est généralement la conséquence.

À l'échelle tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005). Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavanol, sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles (Sarni-Manchado *et al.*, 2006).

### II.3 Structure, Biosynthèse et classification des composés phénoliques

Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui chez les végétaux. Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques, portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La désignation "polyphénols" est consacrée par l'usage et alors, qu'elle ne devrait concerner que les molécules portant plusieurs hydroxyles phénoliques. (Sarni-Manchado *et al.*, 2006).

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

- ★ celle, de l'acide shikimique ;
- ★ et celle, issue de l'acétate.

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (**Martin et al., 2002**).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient, d'abord, par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C<sub>6</sub> à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications du squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...). Enfin par les liaisons possibles de ses molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) Les différentes classes de ces composés phénoliques isolées des plantes sont illustrées dans le Tableau 1 :

Tableau 1 : Les principales classes des composés phénoliques (**Macheix et al., 2005**).

Nombre d'atomes de carbones	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C <sub>6</sub>	- Phénols simples	- Catéchol
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	- Acides phénoliques	- Acide salicylique
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	- Acétophénones	- 3-Acétyl-6-méthoxybenzaldéhyde
		- Acide hydroxycinnamique	- Acide caféique
9	C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	- Phénylpropènes	- Eugénol
		- Coumarines	- Ombelliférone
		- Chromones	- Eugenine
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	- Naphtoquinones	- Juglone
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	- Xanthonnes	- 1, 2, 3,7 tétraméthoxy
			- Xanthone
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	- Stilbènes	- Acide hunularique
		- Anthraquinones	- Emodine
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	- Flavonoïdes	- Quercetine
		- Isoflavonoïdes	- Genisteine
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	- Lignanes	- Podofyllotoxine
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	- Biflavonoïdes	- Kayaflavone
		(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	- Lignines
n	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	- Catéchol mélanines	
		(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	- Flavolanes (tanins condensés)

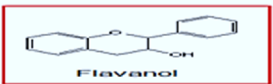
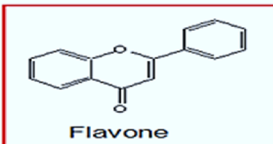
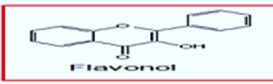
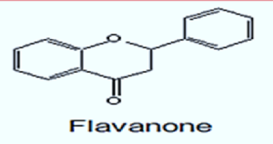
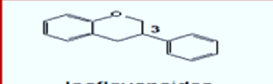
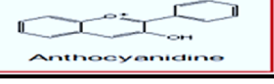
## II.4 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont, en

partie, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (**Guignard, 1996**). Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes (**Stöckig, 2002**) et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (**De Rijke, 2006**).

Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bêtaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire (**Gabor, 1988**). On distingue différentes structures des flavonoïdes comme le montre le Tableau 2.

Tableau 2 : Structure chimique de quelques flavonoïdes (**Heim et al., 2002**).

Classe	Structure générale	Flavonoïdes typiques	Substituants
<b>Flavanol</b>	 Flavanol	(+)-Catechin	3,5,7,3',4'-OH
		(-)-Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH
		Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4',5'-OH, 3-gallate
<b>Flavone</b>	 Flavone	Chrysin	5,7-OH
		Apigenin	5,7,4'-OH
		Rutin	5,7,3',4'-OH, 3-rutinoïde
		Luteolin	5,7,3',4'-OH
		Luteolin glucosides	5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7'-glucose
<b>Flavonol</b>	 Flavonol	Kaempferol	3,5,7,4'-OH
		Myricetin	3,5,7,3',4'-OH
		Tamarexiten	3,5,7,3'-OH, 4'-OMe
<b>Flavanone (dihydroflavone)</b>	 Flavanone	Maringin	5,4'-OH, 7-rhamnoglucose
		Maringenin	5,7,4'-OH
		Taxifolin	3,5,7,3',4'-OH
		Eriodictyol	5,7,3',4'-OH
		Hesperidin	3,5,3'-OH,4'-Ome, 7-rutinoïde
<b>Isoflavonoïdes</b>	 Isoflavonoïdes	Genistin	5,4'-OH, 7-glucose
		Genistein	5,7,4'-OH
		Daidzen	4'-OH, 7-glucose
		Daidzein	7,4'-OH
<b>Anthocyanidin</b>	 Anthocyanidine	Apigenidin	5,7,4'-OH
		Cyanidin	3,5,7,4'-OH, 3,5-OMe

### II.4.1 Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont amplement répandus dans le règne végétal (graines, fleurs, fruits, feuilles) (Tableau 3) (**Dacosta, 2003**). On les trouve aussi chez les Fougères, les Angiospermes, ...etc.

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles, et selon les espèces se concentrent dans l'épiderme des feuilles, ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques (**Bruneton, 1999**)

Tableau 3 : Sources alimentaires des flavonoïdes (**Marfak, 2003**).

Flavonoïdes	<i>Aliments</i>
<b>Flavanones</b>	
<i>Naringénine</i>	Fruits du genre Citrus
<b>Flavones</b>	
<i>Chryisine</i>	Peau des fruits
<i>Apigénine</i>	Persil, Thym, Romarin, Céleri
<i>Lutéoline</i>	Persil, Céleri
<b>Flavonols</b>	
<i>Kaempférol</i>	Radis, Brocoli, Thé noir
<i>Quercétine</i>	Oignon, Pomme, Olive, Tomate
<i>Myricétine</i>	Canneberge
<b>Flavan-3-ols</b>	
<i>Epicatéchine</i>	Thé vert, Thé noir
<i>Catéchine</i>	Thé vert, Thé noir
<b>Anthocyanidols</b>	
<i>Cyanidol</i>	Cassis, Myrtilles
<i>Malvidol</i>	Raisins, Fraises, Cassis
<i>Apigénidol</i>	Framboises, Fraises

**Lugasi et al. (2003)** ont étudié la composition en flavonoïdes de quelques légumes et fruits (Tableau 4) et ils ont montré que la teneur en flavone et en flavonol des aliments végétaux est fortement influencée par des facteurs tels que la saison, le climat et le degré de maturité.

Tableau 4 : Contenu en flavonoïdes de quelques aliments végétaux (poids à l'état frais en mg / kg) (Lugasi et al., 2003).

Echantillon végétal	Total des flavonoïdes (mg/g)
<b>Légumes</b>	
<i>Brocoli</i>	46,2
<i>Chou blanc</i>	17,7
<i>Oignon rouge</i>	124,1
<i>Oignon pourpre</i>	195,6
<i>Poivre</i>	20,1
<i>Epinards</i>	338,6
<i>Feuilles de Persil</i>	80,8
<i>Feuilles de Céleri</i>	402,8
<i>Racines de Céleri</i>	25,9
<b>Fruits</b>	
<i>Pastèque</i>	18,4
<i>Cassis</i>	52,8
<i>Fraises</i>	1003
<i>Raisin</i>	58,7
<i>Noix</i>	4565
<i>Kiwi</i>	22,3
<i>Banane</i>	22,8
<i>Pomme</i>	64,3
<i>Poire</i>	24,7
<i>Prune</i>	23,3
<i>Abricot</i>	11,5

#### II.4.2 Rôle des flavonoïdes dans les plantes

Certains flavonoïdes sont spécifiques de certains tissus, les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, fleurs et feuilles ; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées), leur fonction principale est la pigmentation des plantes. Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capables de produire une vaste gamme de couleur, susceptibles de

donner des teintes allant du jaune orangé au bleu ; les flavones et les chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beige et blanche. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent aussi jouer un rôle dans la protection des plantes (**Scalbert et al., 2000**).

Les flavonoïdes sont impliqués dans les interactions plante-microorganismes : dans les pathogènes comme dans les symbioses (nodules des légumineuses). Ils agissent dans le système de défense des cellules végétales en réponses à certains stress tel que les radiations ultraviolettes. De plus, ils sont impliqués dans les transferts d'énergie, la photosynthèse, la morphogenèse et la régulation des systèmes de croissance des plantes (**Di Carlo et al., 1999**).

### **II.4.3 Propriétés biologiques**

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (**Bruneton, 1999**).

#### **II.4.3.1 Activité antioxydante**

Les flavonoïdes ont été découverts dans les années 30 par Albert Szent-Gyorgyi, lauréat prix Nobel, en tant que des composés avec l'activité antioxydante prononcée (**Hodek et al., 2002**). Les flavonoïdes expriment les propriétés antioxydantes par : le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (**Boudiaf, 2006**).

#### **II.4.3.2 Propriétés pro-oxydantes**

Nous avons décrit précédemment les propriétés antioxydantes des flavonoïdes mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène.

En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*. Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (**Milane, 2004**).

### II.4.3.3 Inhibition enzymatique

En règle générale, les flavonoïdes sont, *in vitro*, des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine; l'élastase; l'hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proantho-cyanidols; la phosphodiésterase de l'AMPc ; l'aldosérédutase par le quercétiroside, ainsi que par des méthoxyflavones; la protéine-kinase, notamment par le lutéolol; plusieurs flavonoïdes (cirsiolol, hypolaetine, etc.) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Quant à (lutéolol, apigénol, chrysin, etc.) inhibent la cyclooxygénase (**Bruneton, 1999**).

Quelques flavonoïdes sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse des prostaglandines. Cet effet est dû à l'inhibition de certains enzymes (lipoxygénase, phospholipase, cyclo-oxygénase) impliquées dans leur biosynthèse.

L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes (pinostrobine, quercétine, morinemyricétine) est attribuée à leur efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (**Hodek et al., 2002**).

Beaucoup d'efforts ont été fait pour la recherche des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase, l'enzyme clef dans la biosynthèse de la mélanine. Les flavonoïdes présentent le groupe le plus étudié des polyphénols. Les résultats des travaux de **Gao et al. (2007)** ont montré que les 5, 6,7-trihydroxy-flavones sont utiles en tant qu'agents de dépigmentation.

Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase (**Bruneton, 1999**).

### II.4.3.4 Activité anti-tumorale

La plupart des flavonoïdes sont *in vitro*, antimutagènes ; *a contrario*, quelques flavonols sont sur les mêmes modèles mutagènes et un petit nombre d'entre eux sont anti-cancérogènes et inhibiteurs de la croissance des cellules tumorales *in vitro* (**Bruneton, 1999**). Les effets anti-carcinogènes de la quercétine et d'autres flavonoïdes deviennent de plus en plus évidents (**Hollman et al., 1996**).

**Tieppo et al. (2007)** ont démontré que la quercétine n'était pas génotoxique et en revanche, elle a augmenté la stabilité génomique chez les rats ayant une cirrhose biliaire induite par la ligature cholagogue.

En plus de l'activité antioxydante, (**Li et al., 2007**) ont observé une activité anticancéreuse, pour l'épicatéchine, procyanidine B2, procyanidine B4 de la fraction d'acétate d'éthyle des extraits du *litchi*.

#### **II.4.3.5 Effets cardiovasculaires**

Récemment, beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoïdes. Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (**Xu et al., 2007**).

Parmi les 17 flavonoïdes examinés par **Xu et al. (2007)**, les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et lagénisteine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lissevasculaire.

### **II.5 Les tanins**

Utilisés depuis l'Antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une importance économique et écologique considérable et sont responsables de l'astringence de nombreux fruits et légumes et de leurs produits dérivés.

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. (**Sarni-Manchado et al., 2006**).

#### **II.5.1 Tanins hydrolysables**

Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcalin ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique soit un dimère de ce même acide, l'acide phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique). Une forme simple de ce type de tanin est le pentagalloyglucose, molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes, par exemple la castalagine chez le châtaignier ou le chêne. (**Sarni-Manchado et al., 2006**).

#### **II.5.2 Tanins condensés**

Les tanins condensés (Figure 1) sont des oligomères ou des polymères de flavane 3-ols, dérivés de la catéchine ou de nombreux isomères et constituent la classe des tanins catéchiques. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seul des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi par traitement acide à chaud, ils se

transforment en pigment rougeâtre et, pour cette raison, ils sont dénommés "proanthocyanidines". Lorsque les liaisons interflavaniques (intermonomérique) sont de type c-c, positionnées en 4 sur une des unités et en 6 et en 8 sur la second, les tanins sont dits de type B. Les tanins de série A possèdent une liaison interflavanique supplémentaire de type éther. (Sarni-Manchado *et al.*, 2006).

Les tanins condensés sont très abondants dans certains organes végétaux consommés ou utilisés par l'homme, par exemple de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...).

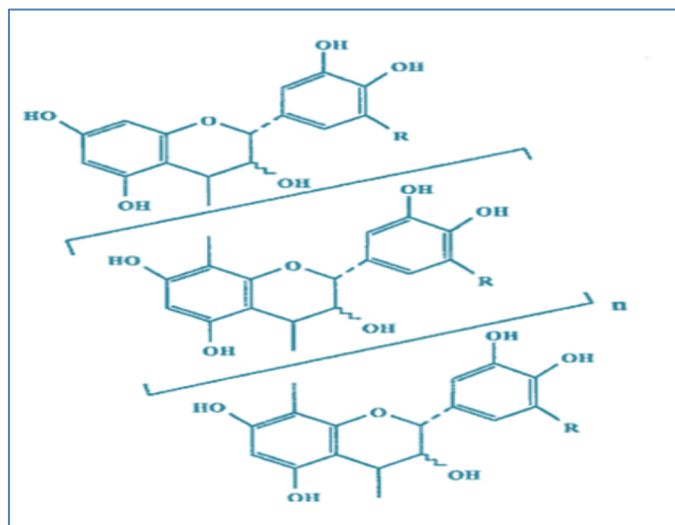


Figure 1 : Structure des tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005)

### II.5.3 Activités biologiques et thérapeutiques des tanins

Les tanins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets significatifs sur la santé humaine (Okuda, 2005).

#### II.5.3.1 Activités antimicrobiennes des tanins

L'activité antimicrobienne des tanins est importante. La croissance de plusieurs bactéries, virus, champignons et levures est inhibée par les tanins (Chung *et al.*, 2001).

##### II.5.3.1.a Activité antibactérienne

De nombreuses études ont montré l'activité antibactérienne des tanins. Ces molécules ont été rapportées comme bactériostatiques ou bactéricides sur plusieurs souches bactériennes : *Aeromonas sobria*, *Bacillus anthracis*, *bolulinum*, *Desuomaculumnigrificans*, *Klebsiella pneumonia*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseud maltophila*, *solanacearum*, *Staphilococcus aureus*, *Staph epidermis*, *Streptococcus lactis*, *Strept mutans*, *Strept pneumonia*, *Strept sobrinus* ...etc. Bactéries des aliments comme : *Alealigenes faecalis*,

---

*Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, K pneumonia, Proteus vulgaris, Pseud fluorescens, Salmonella enteritidis, S paratyphi, Staph aureus, Strept faecalis, Strept pyogenes et Yersinia enterocolitica.*

Les bactéries intestinales humaines comme : *Bacteroides fragilis, Clostridium clostridiiforme, C perfringens, C paraputrificum, Enterobacter cloacae, Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, sont inhibées par l'acide tannique (Chung et al., 2001).

#### II.5.3.1.b Activité antivirale

L'activité antivirale des tanins est due à la fixation des molécules des tanins à l'enveloppe protéique du virus ou la membrane de la cellule hôte, par conséquent, l'inhibition de l'adsorption et la pénétration virale ; cependant, dans certains cas la fixation cause seulement des changements mineurs à la surface virale, la pénétration reste mais l'enlèvement de l'enveloppe virale est inhibé. Plusieurs types de virus sont inactivés par les tanins, le virus Herpès simplex (HSV-1, HSV-2) est inhibé par les tanins hydrolysables et les tanins condensés de plusieurs extraits des plantes (De Bruyne et al., 1999).

On a rapporté que les tanins ont le pouvoir d'inactiver le virus *tobacco mosaïque*, et *poliovirus*. L'acide tannique est capable d'inhiber la réplication du virus d'influenza, *Coxsackievirus, echovirus, reovirus*, virus d'herpes (Chung et al., 2001).

Les oligomères proanthocyanidins présentent une activité antivirale contre le virus respiratoire syncytial (RSV), virus d'influenza A (FLU-A) et le virus para influenza (PIV), et l'hépatite A et B.

Les tanins ont un autre effet inhibiteur de la réplication virale, c'est l'inhibition de la transcriptase inverse des rétrovirus comme virus (HIV) ; cette inhibition est influencée par la galloylation, l'étendue de l'oligomérisation, la différence de la liaison inter-flavan, la stéréochimie de la fonction 3 hydroxyle (De Bruyne et al., 1999).

#### II.5.3.1.c Activité antifongique et anti-levure

Plusieurs types de champignons sont inhibés par les tanins. Les champignons filamenteux comme : *Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Chaetomium cupreum, Collectotrichum graminicola, Coniphora olivacea, Coriolus versicolor, Crinepellis perniciosus, Fomes annosus, Gloeophyllum trabeum, Merulius lacrymans, Penicillium, Poria monticola, Trametes hirsuta et Trichoderma viride*, sont inhibés par les tanins de différentes préparations.

De même, différentes levures incluant *Saccharomyces crevisiae* sont aussi sensibles aux tanins (**Chung et al., 2001**).

### II.5.3.2 Activité thérapeutique due à l'astringence

Par voie externe, les tanins imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels.

En limitant les pertes en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlure (**Bruneton, 1999**). Sur la blessure, les tanins induisent la cicatrisation par différents mécanismes cellulaires, en favorisant la contraction de blessure, l'augmentation de la formation des vaisseaux capillaires et des fibroblastes ; et induisant la prolifération des kératinocytes (**Lopes et al., 2005**).

Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéque (**Bruneton, 1999**), qui est du à l'inhibition de la motilité intestinale (**De Bruyne et al., 1999**).

### II.5.3.3 Inhibition enzymatique

La fixation des tanins avec les protéines peut être engendrée par : l'inhibition de plusieurs enzymes (**De Bruyne et al., 1999**). Le blocage de la 5-lipoxygénase par géraniine, corilagine , inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ; de l'activation de la hyaluronidase ,des glucosyl transférases des microorganismes impliqués dans la cariogenèse ; l'inhibition des topoisomérases par la sanguinine H6 ou l'acide chébulagique ; inhibition de la protéines kinase C par les tanins éllagiques et les tanins complexes (**Bruneton, 1999**) ; inhibition de  $\alpha$ -amylase salivaire humaine qui joue un rôle dans la formation des caries dentaires (**Kandra et al., 2004**).

D'ailleurs, les dimères procyanidoliques ont une activité inhibitrice sur l'histidine décarboxylase et l'élastase (**Bruneton, 1999**).

### II.5.3.4 Activité antioxydante des tanins

Les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols (**Peronny, 2005**). Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (**Perret, 2001**).

Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (**Peronny, 2005**). De même, il a été démontré *in vitro* que les tanins sont plus actifs

que les vitamines. Des études faites montrèrent que les procyanidines, B1 et B3, sont des antioxydants pour l'acide linoléique, et ils ont une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol.

Dans une autre étude faite sur la propriété du piégeage radicalaire, il a été remarqué que les procyanidines dimériques peuvent emprisonner 8 radicaux pyroxyles alors que l'acide ascorbique emprisonne un seul radical, et l' $\alpha$  tocophérol emprisonne deux radicaux.

**Uchida et al. (1988)**, suggèrent que les tanins condensés galloylés ont une action de piégeage radicalaire sur le radical 1-1 diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), aussi sur l'anion superoxyde et  $\text{OH}\cdot$ ,  $\cdot\text{OOH}$ .

Plusieurs propriétés structurales des tanins augmentent leur activité antioxydante :

La galloylation, préférablement en position 3' augmente la capacité du piégeage pour les deux  $\text{O}_2$  et  $\text{OH}\cdot$  ; aussi, le piégeage d' $\text{O}_2$  est plus important pour les dimères procyanidines couplés par une liaison (4 $\rightarrow$ 8), que les dimères liés par (4 $\rightarrow$ 6) (**De Bruyne et al., 1999**).

#### II.5.3.5 Activité anti cancérrogénique des tanins

Le potentiel anticarcinogénique des tanins peut être lié à leur propriété antioxydante, qui apparaît importante dans la protection cellulaire des dommages oxydatifs.

Plusieurs études montrèrent l'activité anticancérrogéniques des tanins, **Migamoto et al. (1998)** montrèrent l'activité anti tumorale de plusieurs oligomères des tanins hydrolysables incluant : agrimoniin, cœnothein B et coiiariin A, contre la sarcoma (**Chung et al., 2001**).

Une étude faite sur la plante *Eugenia jambos*, a été suggérée que les tanins hydrolysables de cette plante induisent l'apoptose sur les cellules humaines leucémiques cequi présente un autre mécanisme d'activité antioxydante des tanins (**Yang et al., 2000**). Autre étude faite sur les tanins de sorghum, suggère l'activité anticancérrogénique des tanins de sorghum sur les cellules humaines de mélanome (**Awika et al., 2004**).

#### II.5.3.6 Autres activités biologiques des tanins

Les tanins ont une activité anti inflammatoire. **Tits et al. (2012)**, montrèrent une importante activité anti inflammatoire des prodelphinidines isolés de *Ribes nigrum*.

Les effets cardiaques et vasculaires des tanins sont aussi démontrés. **Calixto et al. (2011)**, dénotèrent que l'acide tannique affecte la disponibilité du calcium pour la contraction des muscles lisses et cardiaques. En effet, par fixation de l'acide tannique avec le  $\text{Ca}^{++}$ , l'acide

tannique présente un effet hypotensif. D'ailleurs, des études faites montrèrent l'effet d'inhibition d'agrégation plaquettaire dans le plasma humain et le plasma du rat par deux procyanidines trimériques et un dimère thioether.

Outre ces activités, les tanins présentent une activité antiulcéreuse et antiparasitaire, en effet, la consommation des plantes à tanins peut affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux (**Peronny, 2005**).

## II.6 Les coumarines

Ce sont des dérivés de la benzo  $\alpha$ -pyrone. La coumarine (Figure 2) proprement dite, a été isolée en 1820, pour la première fois, de la fève Tinka, *Coumarona adorata* (Légumineuse). C'est la lactone de l'acide hydroxy-cinnamique.

Elles sont les plus répandues dans le règne végétal, et possèdent des substitutions (OH ou OCH<sub>3</sub>) en position 6 et 7 (**Bouhadjera, 2005**).

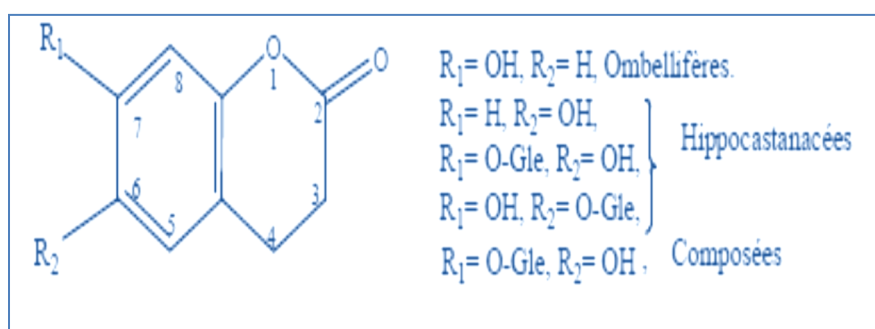


Figure 2 : Structure générale d'une molécule de coumarine (**Bouhadjera, 2005**)

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres, de saveur généralement amère, certaines sont sublimables et entraînaibles à la vapeur d'eau. Les hétérosides et les génines sont assez solubles dans l'eau et l'alcool. Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre U.V est également caractéristique et sert à leur identification.

Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone par son ouverture et sa solubilisation en milieu alcalin puis, par fermeture en milieu acide pour la régénérer (**Bouhadjera, 2005**).

### II.6.1 Propriétés biologiques

La coumarine est connue pour ses propriétés anti-œdémateuses, pour améliorer les symptômes en rapport avec l'insuffisance veino-lymphatique (confirmée en pharmacologie

clinique). La khelline (coumarine) de la khella, une herbe annuelle méditerranéenne spontanée du Maroc est un puissant vasodilatateur coronarien (**Bouhadjera, 2005**).

## II.7 Lignines

Les lignines constituent 15 à 35% des bois des angiospermes et des gymnospermes, ce qui représente une biomasse considérable produite annuellement par les végétaux. En raison de leur caractère hydrophobe marqué, les lignines s'accumulent au niveau des parois des cellules. Elles sont présentes au niveau des vaisseaux conduisant la sève brute et sont responsables de la rigidité des fibres végétales. On les trouve également dans les tissus végétaux présentant une forte résistance mécanique, comme les sclérenchymes des chaumes ou le noyau des fruits.

L'accumulation des lignines est importante pour la longévité des espèces, ils fonctionnent comme des phytoalexines, devront assurer la protection pour les plantes contre les maladies et les parasites. Les lignines sont aussi des antioxydants spéciaux qui ont fait preuve de remarquables effets bénéfiques sur la santé, ils ont entre autres une activité antifongique, anti-inflammatoire et bactéricide. En plus, ils agissent contre le diabète et les taux élevés de cholestérol (**Bouterfaz, 2011**)

## II.8 Conclusion

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques qui interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

Ces composés montrent des activités biologiques intéressantes, C'est le sujet qui va être traité dans le chapitre qui suit.

---

---

## Chapitre III: Généralités sur l'activité antioxydante

---

---

### III.1 Introduction

Représentant environ la cinquième (5<sup>ème</sup>) partie des constituants de l'air, l'oxygène est indispensable à la vie de tous les organismes aérobies. En effet, ces derniers utilisent le haut niveau énergétique de l'oxygène moléculaire pour oxyder des substances comme les hydrates de carbone, les protéines, les graisses et produire essentiellement du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), de l'eau et de l'énergie nécessaire au processus de la vie. Le métabolisme des composés endogènes et exogènes par les enzymes telles que les monoamines-oxydases ou les mono-oxygénases nécessite l'utilisation de l'oxygène (**Cavin, 1999**).

En thérapeutique, l'oxygène est utilisé en inhalation contre l'anoxie cellulaire ou globale, les hémorragies, ainsi que dans de nombreuses affections pulmonaires, les embolies gazeuses des plongeurs, etc.

### III.2 L'oxydation

L'oxygène sous l'action des rayons UV, des radiations ionisantes, des métaux de transition au cours de diverses réactions enzymatiques, fournit des formes hautement réactives : l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), les peroxydes alkyles (ROOH) et les radicaux hydroxyles (OH), peroxydes (ROO), et alcoyles (RO) qui sont à l'origine de la peroxydation des lipides membranaires, au niveau du poumon, du système nerveux central et de la rétine (**Allain, 1996**). On leur donne le nom d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO).

Sur le système nerveux, la toxicité de l'oxygène se traduit par des troubles visuels, des contractions musculaires et des convulsions (**Allain, 1996**).

Dans les conditions normales, la production des radicaux libres est contrôlée par l'organisme par un phénomène appelé homéostasie. L'homéostasie est l'établissement d'un équilibre fragile entre la formation de substances pro-oxydantes et leur élimination (action des antioxydants). Lorsque cet équilibre est rompu en faveur de la production des pro-oxydants, l'organisme endure un stress oxydant de telle sorte que les cellules ne peuvent plus éliminer leur surproduction (**Pincemail et al., 1999**).

Les ERO sont utilisées par les cellules phagocytaires de l'organisme (macrophages) pour combattre les agents infectieux (bactéries, virus). Cependant, cette utilisation avantageuse des ERO ne va pas sans conséquences, car elles ont la capacité d'agir sur les structures biologiques des cellules (protéines, lipides, ADN). En effet, des études épidémiologiques et cliniques ont suggéré le rôle de ces ERO dans le développement de nombreux processus pathologiques :

maladie de Parkinson, asthme, arthrite, mongolisme, neuro-dégénérescence, athérosclérose, etc. (Pincemail et al., 1999).

### III.2.1 Antioxydants naturels

En ce qui concerne les plantes médicinales bien connues et économiquement importants, nous pouvons citer l'ail (*Allium sativum* L. ; Liliaceae) et le ginkgo (*Ginkgo biloba* L. ; Ginkgoaceae) qui sont utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et circulatoires dues au vieillissement (Igor, 2002).

#### III.2.1.1 Les flavonoïdes

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsables dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins. (Igor, 2002).

#### III.2.1.2 Les tanins

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Amadou, 2005)

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques, produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999).

#### III.2.1.3 Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour

l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (**Igor, 1999**).

#### **III.2.1.4 Les phénols**

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes, comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes (**Igor, 1999**)

#### **III.2.1.5 Les xanthones**

Les propriétés pharmacologiques reconnues des xanthones sont essentiellement : leur activité antimicrobienne, leur cytotoxicité et surtout l'inhibition de la monoamine-oxydase (**Sidibé, 2003**).

La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes (**Amadou, 2005**).

### **III.2.2 Mécanisme d'action des antioxydants**

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition.

Cet intérêt a plusieurs origines ; en tant que constituants alimentaires, ces antioxydants d'origine naturelle semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio-vasculaires (**Amadou, 2005**)

### **III.3 Méthodes de tests antioxydants**

#### **III.3.1 Test mesurant l'activité antioxydante contre le lysosome**

Principe : Détection de l'activité antioxydante d'une substance par oxydation des lysosomes par le 2,2'-azobis, 2-amidino propane (**Amadou, 2005**)

### III.3.2 Test par CCM

#### III.3.2.1 Réduction du radical 1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyle

Il s'agit de déposer des extraits, fractions ou produits purs à tester sur des plaques CCM de gel de silice GF254 en aluminium et développées dans les systèmes appropriés.

Après séchage, gicler les plaques CCM avec une solution méthanolique à 2mg/ml de DPPH.

Des activités antiradicalaires apparaissent sous des spots de couleur jaune-blanc sur fond violet. Nous avons utilisé ce test au cours de notre méthodologie pour déterminer l'activité antioxydants (Cavin, 1999).

#### III.3.2.2 Test mesurant l'activité antioxydante au moyen de caroténoïdes

Les plaques CCM sont préparées de la même manière que pour le test du DPPH, puis giclées avec une solution chloroformique, à 0.5mg/ml de  $\beta$ -carotène. La plaque CCM est ensuite exposée sous une lampe UV, à 254 nm, jusqu'à décoloration de la plaque. Les zones antioxydantes apparaissent en jaune sur fond blanc. Il faut faire particulièrement attention aux substances déjà colorées en jaune, car elles peuvent donner de faux positifs (Cavin, 1999).

### III.4 Conclusion

L'activité antioxydante des substances naturelles que les plantes contiennent comme produit de leur métabolisme secondaire ont été reconnues empiriquement durant des siècles, mais n'ont été confirmées scientifiquement que récemment. Plusieurs groupes de chercheurs ont étudié l'activité biologique de plantes médicinales originaires de diverses régions du monde, orientés par l'usage populaire des espèces natives, dans le chapitre suit, on présente une espèce endémique méditerranéenne qui a prouvé son pouvoir antioxydant par plusieurs recherches dans différentes pays de la région méditerranéenne.

---

---

Chapitre IV: Généralités sur l'espèce *Daphne*  
*gnidium L*

---

---

## IV.1 Aperçu sur la famille des Thymeleacées

La plupart des Thyméléacées vivent en Australie et en Afrique du sud (Figure 3). Ce sont des plantes ligneuses ou, rarement herbacées. Les feuilles sont presque toujours isolées ; elles sont simples ; entière et non stipulées. Les fleurs sont hermaphrodites tétramères ou pentamères. La coupe périantho-staminale est en forme de tube souvent coloré. Il n'est pas rare que la corolle soit absente ou très réduite. L'androcée est diplostémone ou isostémone. L'ovaire, uniloculaire ou biloculaire, uniovulé ou biovulé, il est libre au fond de la coupe florale. Les ovules sont anatrope et pendants avec le micropyle dirigé vers le haut. Le fruit est un akène ou une baie, rarement une capsule. La graine exalbuminée, renferme un embryon à radicule tournée vers la partie supérieur de fruit.



Figure 3 : Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae (Heywood ,1996).

## IV.2 Aperçu sur le genre *Daphne*

### IV.2.1 Caractérisation morphologique et botanique

Les espèces de ce genre sont présentées sous forme d'arbrisseaux ou sous-arbrisseaux dont les feuilles sont alternes, subsessiles, entière atténuées à la base. Les fleurs sont très odorantes, souvent vivement coloré, dépourvues de pétales, réduite en calice tubulaire coloré, ouvert au sommet en 4 lobes plus ou moins étalés ; 8 étamines insérées au sommet du tube ; un ovaire libre dans le tube, à 1 loge ; stigmate sessile. Le fruit est une drupe charnue à un noyau.

## IV.2.2 Quelques espèces du genre Daphné

Feuilles de 4- 10 cm, glabres ; fleurs très précoces (février- mai selon l'altitude), les feuilles rouges ou roses, très parfumées, en petite bouquets latéraux sessiles ; 30-1,50m (bois et pelouses des collines et des montagnes, surtout calcaires ; *Daphne mezereum* L.

### IV.2.2.1 Daphné Bois-Gentil

Feuilles de 2-3.5 cm, velues-soyeuses ou +- poilues ; fleurs réunies par 4- 7 en têtes terminant les rameaux, blanches, très parfumées ; 20-90 cm (rochers et rocailles calcaire des montagnes) *D. alpina* L.

### IV.2.2.2 Daphné des Alpes

Feuilles grandes (6-12 \* 2-3 cm), obovales-lancéolées, très coriaces, d'un vert foncé luisant dessus, à nervure latérales ± visibles ; fleurs verdâtre en courtes grappes latérales ; fruit noirs ; 0.5-1 m et plus en culture (bois des sols calcaires) *D. laureola* L.

### IV.2.2.3 Daphné lauréole

Arbrisseaux de 0.5-2 m à rameaux droits et dressés ; feuilles de 3-4\* 0.2-1 cm, assez épaisses et cassantes, très nombreuses et cachant les rameaux ; fleurs blanches, petites, en courtes grappes terminales où seules subsistent les fleurs extrêmes (bois, garrigues, maquis, lieux arides ; bois littoraux) *D. gnidium* L.

### IV.2.2.4 Daphné Garou

Plante de France continentale, à rameaux étalés-couchés, velus ; fleurs par 6-12, assez grandes (1-1.3 cm), rose vif ou purpurines, velues à l'extérieurs, très parfumées ; feuilles linéaires-spatulées, dépassant rarement 1.5 cm (pentes arides, lieux pierreux, etc., sur calcaire) *D. cneorum* L.

### IV.2.2.5 Daphné Camélée

Plantes entièrement glabre ; fleur à tube strié, rose clair, accompagné de bractées colorées ; feuilles plus longues et plus étroites, serrées au sommet des rameaux (pelouses et bois clairs subalpins ; alpes calcaires de suisses et de l'Europe centrale) *D. striata* Tratt

### IV.2.2.6 Daphné Strié

Plante de corse ; rameaux droits et dressés ; fleurs par 2-4, blanches ou d'un vert pourpré (maquis, rochers, hêtraies de 1000- 1800 m) *D. oleoides* Scherb.

**NB** En Algérie on trouve trois espèces de *Daphne* L. :

- ① *Daphne gnium* L.
- ② *Daphne lareola* L.
- ③ *Daphne oleoides* Scheb.

### IV.3 Identification du *Daphne gnidium*

#### IV.3.1 Classification de l'espèce

Le *Daphne gnidium* connu sous le nom du Garou est une espèce qui fait partie de la famille des Thymeliacées, selon la classification taxonomique suivante :

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Spermatophyta (Angiospermae)

**Classe** : Dicotyledones

**Ordre** : Thymelaeales

**Famille** : Thymelaeaceae

**Espèce** : *Daphne gnidium*

#### IV.3.2 Caractéristique morphologique et botanique

C'est un arbrisseau (Figure 4) ou un sous arbrisseau pouvant atteindre 2 mètre de haut. Ses racines et ses tiges sont revêtues d'une écorce séchée à une surface externe lisse, de couleur gris brunâtre ou gris cendré, marquée de rides transversales ou de taches blanc jaunâtre, elliptiques, tubéreuses, provenant des cicatrices foliaires et une surface interne lisse, de couleur jaune brillant ou brun jaunâtre, striée dans le sens de sa longueur.



Figure 4 : *Daphne gnidium* L en stade fin floraison, début de fructification (les monts de Tessala, Algérie, NW) (Cliché, **Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

L'écorce présente une cassure fibreuse, filandreuse. Les tiges sont de couleurs rougeâtre ; elles sont dressées, longues de 60 cm à 2 mètres, formant des rameaux très feuillés sur toute leur longueur et d'allure générale cylindrique avec leur feuillage très dense. Les feuilles sont alternes, persistantes de consistance coriace, sessiles, simples, allongées, étroites et aiguës, (Figure 5), de forme lancéolée-linéaire-, longues de 3 à 4 cm et large de 4 à 6 mm ; elles sont de couleur vert bleuté, acuminées et cuspidées et pourvues d'une seule nervure. L'inflorescence est en panicule terminale ; cette panicule est rameuse, longue de 5 à 10 cm, compacte, regroupant des fleurs (Figure 6) nombreuses ; elle est entièrement blanche, tomenteuse (recouverte d'une pubescence de poils serrés par un pédicelle cotonneux ; elle est de petite taille, hermaphrodite ; elle est odorante. Le calice est de forme tubuleuse à 4 lobes étalés - ayant l'apparence de nombre 8. L'ovaire est unique (dit « uniloculaire ») et libre. Le fruit (Figure 5) est une baie drupacée (ou drupe) de petite taille, de forme ovoïde, de couleur rouge orangé à maturité ; cette baie renferme une seule graine. (**Ait Ben youssef, 2006 ; APG III, 2009 ; Crété, 1965 ; Djermouni et Navef, 2004 ; Gaussenet Leroy, 1982 ; Judd et al., 2002**) (Figure 5 et Figure 6).



Figure 5 : Les feuilles de *Daphne gnidium* L. en disposition alternée (à gauche). Le fruit sous forme de drupe (à droite) (Cliché, **Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

### IV.3.3 Ecologie

Le Garou est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques. On le retrouve dans les lieux sablonneux du Midi et du Sud-Ouest (**Baba Aissa, 2009**).

*Daphne gnidium* a une préférence pour le semi-aride avec toutes ses variantes, avec un coefficient d'Emberger de 25 à 80 selon **Emberger (1930)** ; mais prospère aussi dans l'étage subhumide à la faveur de l'altitude.

Aussi, on doit signaler que le genre du Daphné est lié à des zones où les variations interannuelles des précipitations peuvent être importants (**Alcaraz, 1983**).

Cependant, les valeurs données concernant les exigences climatiques ne sont pas des limites fixes mais sont considérées comme des ordres des grandeurs de références.

Par ailleurs, le Garou est une espèce indifférente à la nature du substratum édaphique, il se localise sur les sols les plus secs et les plus pauvres, sur les sols calcaires et pousse bien sur les dunes fixes. En Algérie on le retrouve sur le crétacé, sur le jurassique et sur le pliocène (**Aubert, 2003**). La nature physicochimique et granulométrique des sols où s'installe le *Daphne gnidium* sont le plus souvent limoneux-sableux (**Aubert, 2003**).

Toutefois, même s'il semble indifférent au substrat et à la nature du sol, il ne s'adapte guère aux sols salés.

En plus, le mode de reproduction du *Daphne gnidium* se fait par dissémination des graines, où les oiseaux frugivores jouent un rôle fondamentale (**Boissenin et al., 2005**), sachant que l'effet de l'ingestion des oiseaux sur les graines diffère selon les espèces végétales (**Holthuijzen et al., 1985 ; Glyphis et al., 1981 ; Krefting et al., 1949**). Plusieurs études ont montré cet effet par la méthode *in vitro* (**Yagihashi, 1998**).

La région de Tessala renferme 21 espèces oiseaux dans 2 sont typiquement frugivores (**Ferkazazou, 2006**) et d'autre sans communément frugivore tel que *Passer domesticus*.

#### IV.3.4 Utilisation traditionnelle

Dans la médecine traditionnelle l'infusion des feuilles est utilisée pour traiter les maladies de la peau et contre l'hépatite virale (**Bruneton, 1993**). Cette plante est également utilisée dans la teinture textile traditionnelle (**Baba Aissa, 2011 ; Bardeaux, 2009 ; Charnot, 1945**).

Le daphné soigne, en usage externe, la gale et certaines mycoses, il donne encore des résultats contre la chute des cheveux pour bouillir quelques feuilles et on les applique sur la région malade (**Djermouni et al., 2004**).

Pour guérir la maladie de l'hépatite virale On écrase les tiges fraîche, en la sève qu'on l'applique sur le front ou on met les feuilles desséchés sur les braises, puis on a aspiré la fumé dégagée (**Sassi, 2008**)

Les feuilles sont riches en polyphénols surtout les flavonoïdes et les tannins (**Chaabane et al., 2012**). Neuf flavonoïdes (apigenin, luteolin, quercetin, orientin, isoorientin, luteolin 7-O-glucoside, apigenin 7-O-glucoside, genkwanin, and 5-O- $\beta$ -D-primeverosylgenkwanine, and  $\alpha$ -tocopherolwere) et quatre coumarines (daphnetin, daphnin, acetyl-umbelliferon, and daphnoretin) sont identifié dans les feuilles et les tiges (**Deiana et al., 2003**).

#### IV.3.5 Pharmacologie

Grâce à sa richesse en polyphénols les feuilles de *Daphne gnidium* L. sont dotées d'une activité anti oxydante (**Chaabane et al., 2012 ; Deiana et al., 2003**), anti microbienne et anti fongique (**Chaabane et al., 2012**) ; D'autres études ont montré que les extraits des racines de cette espèce ont la capacité d'inhiber la prolifération des cellules MCF-7, ils sont de ce fait caractérisés par une activité anticancéreuse (**Chaouki et al., 2009**).

### IV.3.6 Toxicité

Le daphné est conseillé pour une utilisation externe à cause de sa toxicité ; ainsi, après une courte latence d'avalement d'une quantité des fruits, on observe une violente inflammation de la bouche, avec tuméfaction des lèvres et de la langue, ptyalisme, vomissements. Secondairement, s'installe une diarrhée souvent hémorragique avec coliques. Enfin, dans les cas graves, on note une ataxie avec convulsions, dyspnée, albuminurie et hématurie selon (Bruneton, 2003 ; Charnot, 1945).



Figure 6 : Plante de *Daphne gnidium* en pleine floraison (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)

De ce fait, et vu ses qualités thérapeutiques et son utilisation par la population locale, le *Daphne gnidium* L. est une espèce qui mérite d'être étudiée surtout que c'est une espèce :

- Endémique méditerranéenne ;
- Représente un maillon essentiel dans la chaîne alimentaire de la région de Tessala (origine de dissémination est l'ornithochore) ;
- C'est une espèce qui n'a pas fait l'objet d'une étude phytochimique auparavant, surtout par rapport à l'impact des conditions stationnelles sur la composition phytochimique du daphné, sachant que cette plante est présente dans tous les différents gradients d'altitude et dans les deux expositions sud et nord, elle n'a pas fait aussi l'objet d'une valorisation à travers la détermination de l'activité biologique et anti oxydante.

# *Partie expérimentale*

---

## Chapitre V: Présentation de la zone d'étude

---

## V.1 Présentation de la zone d'étude

La commune de Tessala (Figure 7) fait partie d'un ensemble de communes montagneuses située entre trois wilayas, à savoir : Sidi Bel Abbés, Oran et Ain Témouchent. Elle couvre une superficie de 11.824ha.

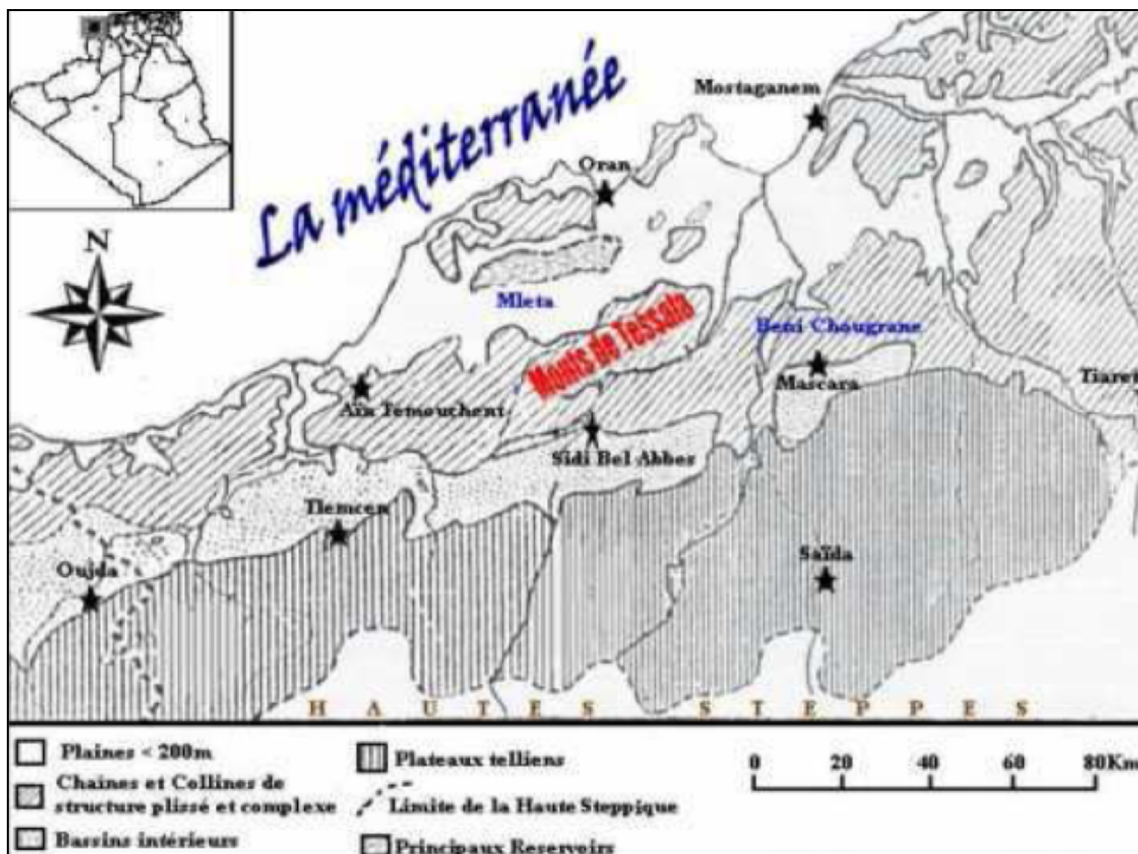


Figure 7 : Carte de localisation de la zone de Tessala dans l'ouest algérien (Ferka zazou, 2006)

La région de Tessala s'éloigne du chef-lieu de la wilaya de Sidi Bel Abbès d'environ 10 Km et est traversée par l'axe routier RN°95 reliant Sidi Bel Abbès- Ain Témouchent. Elle s'inscrit entre les coordonnées géographiques suivantes :

$$X1= 35^{\circ}17'20.34'', Y1= 0^{\circ}51'54.67''$$

$$X2= 35^{\circ}20'31.04'', Y2= 0^{\circ}42'54.96''$$

Elle est délimitée :

- Au Nord, par les communes de Sidi Boumediene et Oued Sebbah (wilaya d'Ain Témouchent) ;
- A l'Ouest par la commune de Shala ;

- A l'Est, par la commune d'Ain Trid ;
- Au Sud, par la commune de Sidi Lahcen

## V.2 Contexte spatial

Les unités topographiques de la commune de Tessala (Figure 8) appartiennent à de grands ensembles naturels du Tell Oranais Ouest Algérien.

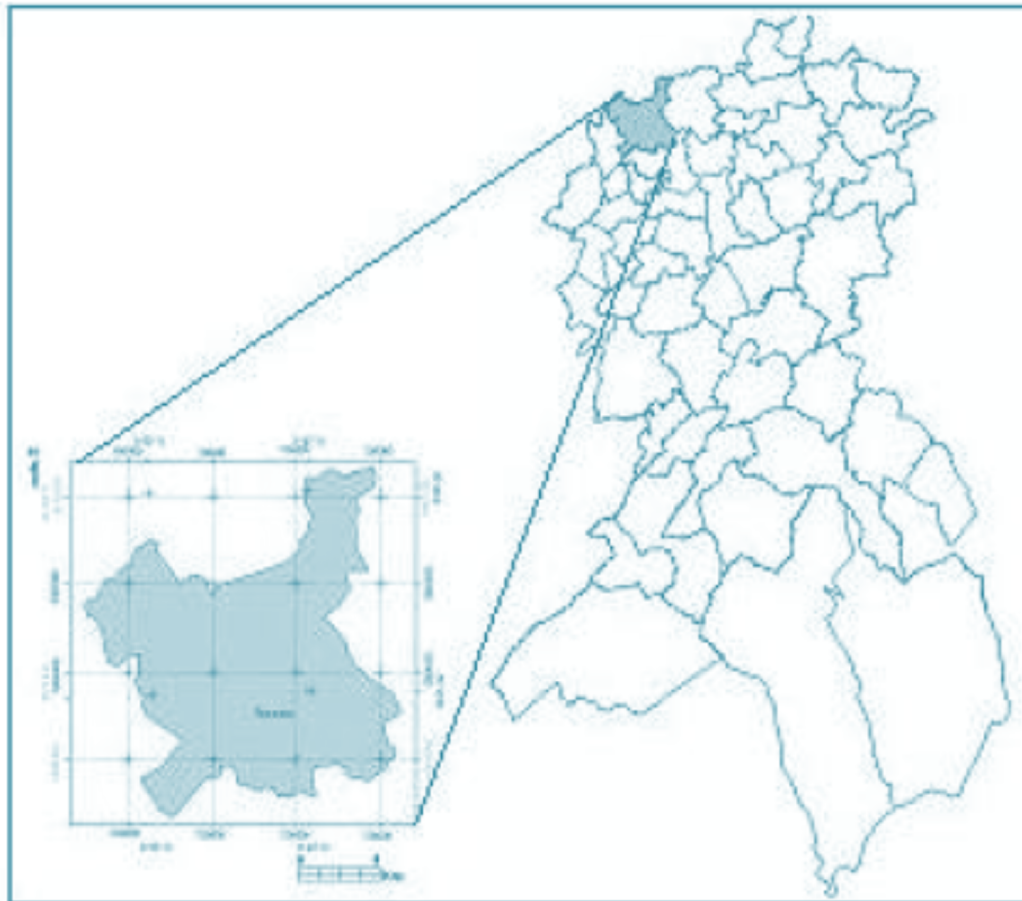


Figure 8 : Localisation de la zone d'étude fait partie à la région de Sidi Bel Abbes (**Ferka zazou, 2006**).

### V.2.1 La zone montagneuse de Tessala

Elle est limitée à l'Ouest par les monts de Berkèche et au sud par la plaine de Sidi Bel Abbés, la chaîne montagneuse de Tessala est orientée du SW-NE. Elle est caractérisée par des sommets qui atteignent des altitudes moyennes de 600 mètres. Le djebel

Tessala culmine à 1061m. Le paysage y dessine une morphologie accidentée avec des pentes fortes accentuées par un ravinement très marqué. En effet, ces versants sont disséqués par un nombre important d'oueds et affluents qui transportent des matériaux fins et caillouteux pour les déposer en aval au niveau de la plaine de Sidi Bel Abbés.

### V.2.2 La zone de piémonts

C'est un ensemble de collines fortement érodées avec des altitudes variant entre 560 et 450 m elles sont traversées par un réseau hydrographique important (ravine, talwegs). Les pentes sont faibles à moyennes 3-12%. Cette zone fait l'objet d'une exploitation agricole associant vigne, céréaliculture et arboriculture. C'est également un milieu fortement habité.

### V.2.3 La zone de plaine

Seule la frange sud de la commune fait partie de la plaine de Sidi Bel Abbés (Figure 8). Les altitudes varient entre 400 et 600 m avec des dépressions de 250 m. Les éléments physiques de cette plaine ne sont pas particulièrement contraignants. Les pentes générales et les petites collines ne marquent pas de grands accidents dans la topographie, elles ne font que marquer le relief assez monotone par quelques monticules matérialisés souvent par des Kouba de Marabouts. La commune de Tessala est une zone où s'épousent les paysages montagneux très escarpés, abrupts à fortes pentes, et les paysages de collines et de plaines. Une vue panoramique extraordinaire peut être contemplée du sommet de djebel Tessala (Figure 9).

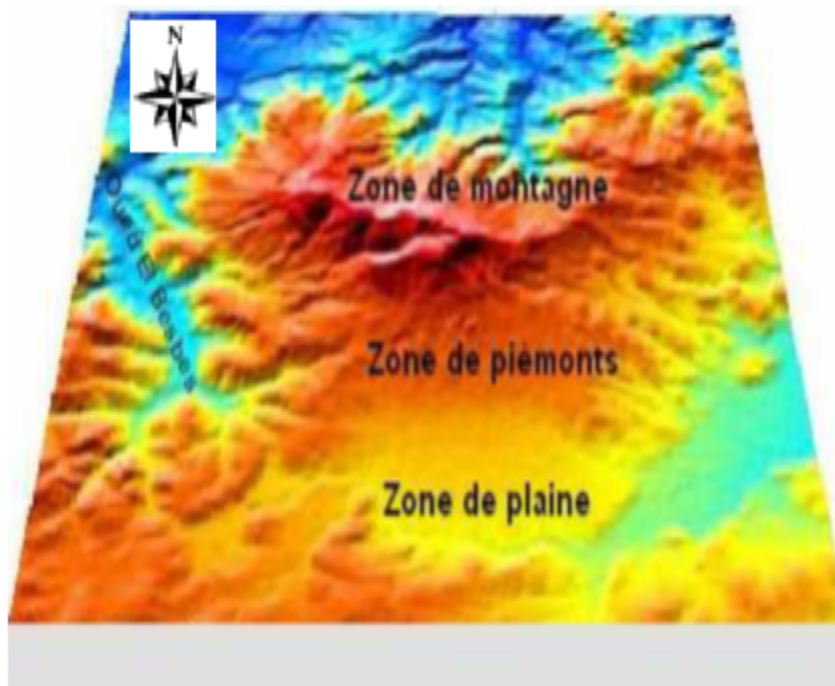


Figure 9 : Commune de Tessala vue en 3D (réalisée par le logiciel mapinfo) (Ferka zazou, 2006)

### V.3 Le cadre physique

#### V.3.1 Géologie

Dans la commune de Tessala les formations géologiques prédominantes sont les marnes, les argiles et les grès tendres du Néogène sur les marnes et les calcaires marneux du Paléogène et du Crétacé (**Bouklikha, 2001**). Ces formations sont diversifiées et chaque unité topographique est caractérisée par des formations d'âge et de structure différentes.

La zone montagneuse des Tessala fait partie du Tell oranais central caractérisée du point de vue géologique par des formations de nappes de charriages du complexe crète-oligocène décrites par **Dallaoui (1952)** et des formations à dominance calcaire. Quelques affleurements durs de grès et de calcaires pointent de temps en temps avec des semelles de gypse du Trias.

La zone de piémont, rassemble des formations recouvertes généralement par des couches du quaternaire et des alluvions marno-argileuses et sablonneuses.

La zone de plaine, regroupe les formations géologiques généralement à dominance secondaire, mais n'affleurent presque pas puisqu'elles sont recouvertes par des fortes épaisseurs de formations plio-quaternaires à dominance de poudingues et d'alluvions. Les formations quaternaires les plus anciennes sont encroûtées. Cette croûte sur certaines hauteurs où elle n'a pas été perturbée paraît sous forme de dalle calcaire épaisse.

#### V.3.2 Stratigraphie et tectonique

L'âge des formations n'est pas justifié mais simplement repris des dernières publications géologiques de la région de Sidi Bel Abbés. Les monts de Tessala sont considérés comme une grande structure anticlinale d'une direction SW-NE. Certains auteurs du levé géologique considèrent les monts de Tessala comme le domaine plissé de l'orogénèse alpine accidentée par une flexure sur la bordure de Nord (**Anat, 1997**). **Kiekken (1962)** la considère simplement comme une structure de couverture. A ce sujet **Benyahia et al. (2001)** évoquent l'importance hydrogéologique de la description stratigraphique des différentes formations, et distinguent très schématiquement :

Le Quaternaire : représenté par les terrains où dominant les limons, les argiles sableuses dans le centre et la partie nord de la plaine des monts de Tessala.

Le Plio-Quaternaire : trois formations peuvent être attribuées à cette ère géologique avec présence d'argile, d'argiles sableuses et argiles siliceuses.

Le Pliocène débute par une dalle conglomératique à ciment calcaréo-détritique avec au-dessous des graviers, du sable et d'argilites rouges (DSA, 1992)

Le Miocène constitue la série messiniène est présenté dans le Tessala avec des marrées bleues ou vertes et jaunes parfois à affleurement intercalé de bancs de grésroux très développés vers le sommet de la formation.

L'Eocène il se débite par un faciès qui commence par un entretien moyen supérieur avec une succession de calcaire marneux et grés alternant avec des marnes bleues noires

Le Crétacé son développement couvre la majeure partie des monts de Tessala, la délimitation des étages est un peu difficile. Le crétacé supérieur est représenté par un ensemble de cénomanien turonien avec des marnes très calcaires alternant avec des calcaires argileux, le crétacé inférieur présente un albien marno-calcaire.

L'Aptien est localisé avec des marnes grises ou verdâtres représentées par le néocomien barrémien.

Le Trias : se caractérise par un ensemble chaotique de terrain sédimentaire et éruptif avec des évaporites gypse, dolomie noire et des argilites. Le complexe triasique est associé surtout aux unités éocènes et crétacées (DSA, 1992).

### **V.3.3 Hydrographie et ressources hydriques**

La région est constituée par quatre portions de bassins versants (Figure 8 et Figure 9) :

- Le bassin versant côtier oranais qui s'ouvre sur la mer, traverse la chaîne du Tessala suivant la pente générale du plateau avec Oued Berkeche et Oued El Kelakh.

- Les autres Oueds s'écoulent de Tessala constituant le sous bassin versant de la sebkha d'Oran.

- Au sud, la chaîne de Tessala forme une barrière continue sur toute la longueur délimitant ainsi le sous bassin versant de la Mekerra avec le sous bassin versant d'Oued Sarno.

- Un autre sous bassin versant apparaît du côté de Sidi Daho. Parmi ces quatre bassins versants il n'y a qu'un seul qui traverse par un cours d'eau permanent de plus grande importance que celui d'Oued Sarno et tous les autres oueds sont relativement peu persistants à cause d'un manque d'alimentation adéquat ou d'une filtration intense.

L'écoulement des oueds prend naissance avec des débits de base de l'ordre de 01 et 02 au sommet des versants. Dans la zone de piémont, l'écoulement concentré se substitue à

l'écoulement diffus ; ce qui explique la présence de ravins et de ravines. Cette modalité d'écoulement peut exposer les zones planes et à faibles pentes à des phénomènes d'inondations.

La commune de Tessala demeure pauvre en nappes souterraines. Sa topographie souterraine de cuvette remblavée d'alluvions continentales pliocène et quaternaire favorise le piégeage des ressources aquifères qui permettent l'irrigation d'une grande partie du maraîchage de la plaine. Le relief et les formations géologiques de la commune de Tessala ne révèlent pas de ressources importantes en dehors de quelques nappes artificielles très localisées.

#### **V.4 Géomorphologie**

La géomorphologie est l'un des éléments les plus précieux de l'analyse cartographique dans les études de reconnaissance (**Tricart, 1978**). C'est la science qui a pour objet la description et l'explication du relief terrestre, continental et sous-marin (**Coque, 1977**).

Selon **Cornet (2002)** les formes du relief ne sont jamais figées. Trois facteurs régissent et façonnent le relief : la tectonique, l'érosion et la lithologie. Il explique aussi que ces formes évoluent souvent de manière imperceptible (surrection, subsidence, certaines formes d'érosions), mais parfois aussi brutalement (séismes générant des escarpements de faille, certains processus d'érosion comme les glissements de terrains).

##### **V.4.1 Altitude**

La commune de Tessala est constituée d'unités topographiques hétérogènes. Les côtes varient plus ou moins selon que l'on est en plaine 400 à 500 m d'altitude, aux piémonts 500 m d'altitude en moyenne, ou en montagne. Elles présentent des valeurs maximales au niveau des sommets de djebel Tessala (1061 m).

##### **V.4.2 Expositions**

Conjugée à une altitude importante du point de vue impact sur les précipitations et la brise marine, l'exposition a un effet sur les conditions écologiques de la commune de Tessala. Le versant sud souffre d'une sécheresse prolongée (dépassant les 6 mois) et de sols relativement dégradés où dominent les argiles. Le versant nord bénéficie de conditions climatiques et édaphiques plus clémentes, une brise marine avec ses effets adoucissant en été, une faible évaporation, des sols relativement équilibrés et une pluviométrie intéressante.

##### **V.4.3 Les pentes**

Trois classes de pentes (Tableau 5) marquent le paysage des monts de Tessala

Tableau 5 : Classe de pentes et importance en hectare (**Bneder, 1990**)

<i>Classe de pente</i>	0-3%	3-12%	12-25%	>25%	
<i>Superficie (ha)</i>	394	1869	4728	2920	9910
<i>Pourcentage/ST</i>	4	19	48	29,5	100%

- La classe de pente supérieure à 25% occupe 2920 ha et reste localisée dans une série de petits massifs dont les pentes sont très accentuées, c'est le cas du djebel Tessala.

- La classe 12 à 25% occupe la plus forte superficie soit 48% et impose toute une orographie et une approche en matière d'utilisation de cet espace.

- Les classes des pentes 3 à 12% occupent 19% de la superficie totale, composées essentiellement d'une série de collines aux allures moutonnées et ondulées.

- La classe de pente 0-3% n'est présente que sur 394 ha qui constituent la zone de contact entre la plaine de Sidi bel abbés, les collines et massif de Tessala.

Dans la commune de Tessala c'est la classe de pentes de 12-25% qui domine. En effet, les terrains à forte déclivité sont fortement représentés et sont marqués par le phénomène de l'érosion (ravinement). Cette caractéristique impose une approche particulière quant à l'occupation rationnelle des espaces.

#### V.4.4 Erosion et risques naturels

L'érosion est l'ensemble des actions chimiques physiques et organiques qui aboutissent à la destruction des roches et au nivellement progressif du terrain. C'est une usure superficielle de l'écorce terrestre ; l'eau et le vent en sont les principaux agents. En Algérie ce phénomène a été pleinement étudié par (**Roose et al., 1998 ; Greco, 1966 ; Putod, 1962 ; Saccardyl, 1949**).

Dans la commune de Tessala, les types d'érosion qui prédominent sont :

- l'érosion en nappe ;
- l'érosion en griffe ;
- le ravinement.

Dans cette zone le phénomène d'érosion est mis en évidence d'une part, par la géomorphologie de la zone, de son caractère topographique, la fragilité du substrat géologique ainsi que par un climat semi-aride irrégulier. En effet, environ 80% des surfaces sont soumises

à une érosion intense. Ces caractéristiques peuvent aussi constituer un risque de glissement de terrains ou d'effondrement et de chutes de rochers (PDAU, 2005).

Au plan de la sismicité, Tessala est dans une zone reconnue à forte sismicité, les règles parasismiques sont applicables. Les risques liés aux inondations se localisent aux abords de ravins et oueds et peuvent en l'absence de traitement des bassins versants provoquer des détériorations des sols. Le stade critique de la dégradation des sols a été dépassé. Les terrains essentiellement instables représentent 83%, situation encouragée par les techniques culturales inappropriées.

Tableau 6 : Stabilité des terrains dans les monts de Tessala (Bneder, 1990)

<i>Terrains stables</i>	Terrains peu stable	Terrains instables	Terrains très instables
3200 ha	2000 ha	14200 ha	10700 ha
10,6%	6,6%	42,2%	35,6%

## V.5 Principaux types de sols

Les types de sols d'Algérie sont multiples et variés. Certains travaux menés par **Halitim (1988) Pouget ; (1980) Duran et al. (1954)** ; ont permis de déterminer les différents types de sols, leurs caractéristiques essentielles et de situer leur importance dans la zone algérienne méditerranéenne.

Dans la commune de Tessala les sols (Tableau 6) revêtent un caractère important puisque la zone est de prévalence agricole. Les différents types de sols de la zone d'étude sont :

- Les sols à sesquioxydes de fer : ce sont des sols rouges ou bruns rouges, leur profondeur varie de 50 à 80 cm. Leur texture est en générale équilibrée et leur structure grumeleuse. Ces sols sont occupés par une grande partie de céréales, fourrages, ils peuvent représentés une grande valeur agricole.

- Les sols bruns calcaires : leur profondeur est inférieure à 50 cm, de texture lourde et de structure polyédrique. Les pierres de surface y sont nombreuses. Ces sols portent des céréales, jachères. Cependant les pratiques culturales, surtout sur forte pente ont tendance à aggraver les phénomènes d'érosion.

- Les vertisols : ce sont des sols lourds à couleur noirâtre ou brun foncé, leur texture limono argileuse est de structure généralement grumeleuse. Leur profondeur varie entre 30 et 50 cm

parfois ils dépassent les 50 cm. Ils sont localisés aux bas versants et sont colonisés par les céréales, des fourrages et de la jachère, tandis que l'arboriculture et la vigne s'étendent à des surfaces réduites.

- Les lithosols et les régosols : sols se localisant sur les versants à forte pente avec une profondeur ne dépassant qu'exceptionnellement les 30 cm.

#### Etagement des sols

- Les hauts versants : on trouve les lithosols et les régosols et quelques rendzines. Les sols bruns sont peu représentés ainsi que les sols minéraux bruts dans les zones les plus touchées par l'érosion.

- Les versants médians : présence de relief élevé, avec une texture très argileuse et une roche mère marno-calcaire.

- Les bas versants et les collines : les sols calcaires dominant en parallèle avec les sols bruns rouges et se localisent surtout dans les collines ou dans la plaine et remontent en quelques endroits jusqu'au sommet des monts de Tessala.

En générale la répartition des sols est intimement liée aux conditions orographiques et lithologiques dans la zone d'étude.

### V.6 Caractéristiques climatiques

Le climat de la région de Tessala est pratiquement du type méditerranéen comme tout l'ouest du nord algérien caractérisé par :

- La concentration de pluies pendant la période froide (automne et hiver)
- Une sécheresse apparente pendant les mois les plus chauds (l'été).

La durée de la saison sèche est en moyenne de 6 mois, elle couvre la dernière semaine du mois d'Avril jusqu'en début de la deuxième décade du mois d'octobre. L'indice d'aridité de la région est estimé à 12.73 et détermine un régime semi-aride.

L'utilisation du quotient pluvio-thermique d'EMBERGER dont l'application est propre aux régions méditerranéennes permet de classer la commune de Tessala dans l'étage bioclimatique semi-aride inférieur à hiver frais. Cette classification repose sur une moyenne de 21 ans, condition de temps nécessaire et suffisante pour une caractérisation fiable du climat de la région.

En conclusion, le climat de la commune de Tessala est caractérisé par :

- ★ Une pluviométrie faible et irrégulière (400 mm/an) ;
- ★ Une période sèche assez longue de (la fin Avril à la mi-octobre) ;
- ★ Des températures fortes en saison estivale et basse en saison hivernale ;
- ★ Des gelées couvrant une période allant de décembre à février (**ONM, 2014**).

---

---

## Chapitre VI: Matériels et méthodes

---

---

---

## VI.1 Méthodologie retenue

Dans ce travail de recherche, et pour mettre en valeur les plantes médicinales, nous avons adopté une nouvelle méthodologie de travail, qui consiste à déterminer l'impact des facteurs écologiques de la zone d'étude sur la variation de la concentration des composés phytochimiques des différents organes du *Daphne gnidium*. L'identification botanique de l'espèce a été faite par. Dr. Cherifi. K (Enseignant chercheur au Département des Sciences de l'Environnement, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Djilali Liabes, Algérie) et confirmée par la clé de détermination, la flore de l'Algérie (**Quézel et Santa, 1963**).

Notre travail a été commencé d'abord, par une étude écologique qui renferme :

Une étude ethnobotanique de la région comme étant une étude préliminaire, pour sélectionner notre espèce *Daphne gnidium* L selon des critères importants. Ensuite, on a touché l'autoécologie de l'espèce en donnant une note sur le cortège floristique qui associe le *Daphne gnidium*, avec une description et analyse du substrat de l'habitat.

Dans le même contexte écologique, et pour identifier l'origine de dissémination de cette plante, un test de germination des graines déféquées à partir de la matière fécale de l'oiseau *passer domestica* a été entamée dans des conditions du laboratoire, puis comparée à la germination des graine du *Daphne gnidium* sans traitement et d'autres ayant subi un traitement chimique pour lever la dormance embryonnaire.

Une étude statistique a mis en évidence la corrélation entre les composés phénoliques, leur activité anti oxydante et les conditions stationnelles de la zone d'étude, c'est-à-dire les conditions écologiques.

Le deuxième axe de ce travail de thèse est purement phytochimique, qui consiste à une extraction des flavonoïdes par la méthode liquide-liquide et une identification pour la caractérisation du profil chimique de ses molécules par la méthode HPLC, RMN, UV-visible et une quantification par la méthode de spectrophotométrie, puis une évaluation de leurs activité anti oxydante. L'organe choisi pour cette étude est la tige du *Daphne gnidium* du fait qu'il est le plus utilisé dans la médecine traditionnelle.

## VI.2 Etude écologique

### VI.2.1 Etude ethnobotanique

Il s'agit d'une enquête réalisée dans la région d'étude, sur l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales, poussant dans les monts de Tessala ; pour cela, un questionnaire a été établi

et adressé aux herboristes de la zone d'étude ainsi qu'à la population riveraine (tableau7) pour connaître l'usage thérapeutique et le mode d'emploi de ces plantes, ce qui a été confirmé par **Lucienne (2010), Djermouni et al. (2004)** et. L'effet thérapeutique de ces plantes a été décrit selon **Baba Aissa (2011)**.

L'identification des espèces a été réalisée selon la clé de détermination de **Quézel et Santa (1962, 1963)**.

Tableau 7 : modèle du tableau utilisé pour l'enquête ethnobotanique.

Espèce végétale	Type de Maladie	Partie utilisée	Mode de préparation

## VI.2.2 Etude autoécologique

### VI.2.2.1 Présentation des stations de prélèvements et d'échantillonnage

Dans le même contexte écologique, une note du cortège floristique du *Daphne gnidium* (Figure 10) a été entreprise ; pour cela, huit stations ont été sélectionnées, quatre dans le versant nord et quatre dans le versant sud. L'inventaire a été mené en respectant la notion de l'aire minimale (**Godron et al., 1983**), fixé dans notre cas à 100 m<sup>2</sup>. Sur chaque station, un inventaire des espèces présentes a été effectué en Mars 2013 ; pour les espèces non identifiées sur terrain, des échantillons ont été prélevés puis reconnues à partir de la flore de **Quézel & Santa (1962, 1963)**.

Un prélèvement du sol au niveau de ces stations a été réalisé pour une description du substrat à partir des analyses physico-chimiques du sol.



Figure 10: la plante *Daphne gnidium* dans les garigues des monts de Tessala (**Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

#### VI.2.2.2 Analyses physico-chimiques du sol

Les paramètres physico-chimiques déterminés sont :

-La texture : La texture d'un sol est révélée par l'analyse granulométrique. Son principe est basé sur la vitesse de sédimentation des particules séparées et dispersées par destruction de leur ciment (calcaire et matière organique).

-Les limons grossiers sont extrapolés par calcul à partir des résultats obtenus (**Baize, 1988**). Ces résultats sont reportés en fonction des pourcentages des argiles, des limons et des sables dans le triangle des textures **Duchaufour (1997)**, pour déterminer cette dernière.

-Le Dosage du calcaire total  $\text{CaCO}_3$  : ce dosage est Fondé sur la réaction caractérisée du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) avec l'acide chlorhydrique (HCl), qui est réalisé à l'aide du calcimètre de Bernard d'après **Baize (1988)**.

-Le dosage de calcaire actif : Il est réalisé à l'aide d'un réactif spécifique (oxalate d'ammonium), qui attaque une fraction du calcaire total seulement. Le calcium extrait est ensuite dosé.

-Le carbone de la matière organique : Il est oxydé par bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique. En connaissant la quantité de bichromate nécessaire pour cette oxydation, on peut calculer le pourcentage de carbone organique et d'humus dans le sol, (**Baize, 1988**).

-Pour le pH, le principe consiste à mesurer la force électromotrice d'une solution aqueuse du sol (rapport eau/sol) à l'aide d'un pH-mètre. La conductivité électrique est mesurée à l'aide

---

d'un conductimètre en fonction de la concentration en électrolytes dans une solution d'extraction aqueuse au 1/5. (**Richard, 1954**). Les compositions cationiques et anioniques de l'extrait des sols ont été réalisées selon la méthode décrite par **Jackson (1962)**.

-Pour l'humidité on soumet un échantillon de terre fine, saturée avec de l'eau. On mesure par pesée avant et après séchage à 105°C.

### VI.2.3 Etude de la dissémination de l'espèce

La régénération du *Daphne gnidium* se fait par semis des graines disséminées. La dissémination est alors assurée par des oiseaux qui jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de la forêt et particulièrement dans la dissémination des graines lorsqu'il s'agit des oiseaux frugivores (**Boissenin et al., 2005**).

La présente étude permet de mettre le point sur la nature de la dissémination de l'espèce sujet de notre étude et d'expliquer ce phénomène écologique et symbiotique, en réalisant des tests de germination des graines déféquées (provenant de la matière fécale de l'oiseau choisie pour cette étude) et en les comparant à des tests de germinations des graines traitées chimiquement et d'autre non traitées du tout.

#### VI.2.3.1 Matériel biologique

-Les Fruits de *Daphne gnidium* L. qui sont des drupes ovoïdes caractérisé par une couleur rouge orangé ont été recueillis du 15 août au 03 Septembre 2013 dans les montagnes de Tessala situées dans le nord-ouest de l'Algérie.

-Le Moineau domestique (*Passer domesticus*) est une espèce de petits passereaux de la famille des Passeridae, une espèce très commune dans la zone de Tessala. Il s'agit d'un petit oiseau assez trapu, mesurant environ 16 cm de long pour un poids allant de 24 à 39,5 g. Les femelles et les jeunes oiseaux sont pâles, colorés de brun et de gris, tandis que les mâles sont plus vifs, avec des marques noires, blanches et brunes. Il se nourrit majoritairement de céréales et d'autres graines, mais s'est adapté et tiré profit d'autres opportunités, consommant divers invertébrés, les insectes en premier lieu et il se nourrit des drupes en compensant son besoin en eau (**Hudson, 1966**).

Les couples de moineaux utilisés ont été domestiqués dans une cage et ils étaient en bonne état de santé, cela était confirmé par un médecin vétérinaire. Leur nourriture était basée essentiellement sur les fruits contenant les graines du *Daphne gnidium*, leur alimentation se fait

après la levée du soleil, pendant 7 jours et la matière fécale était recueillie chaque matin (Figure 11 et Figure 12).



Figure 11 : les graine de *Daphne gnidium* dans les déféqués d'oiseau *Passer domesticus* (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)



Figure 12 : l'oiseau *passer domesticus* (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)

### VI.2.3.2 Protocole expérimental

Les graines déféquées du *Daphne gnidium* et celle traitées avec l'acide chlorhydrique à 10%, pendant 10 mn, ainsi que les graines non traitées sont mises à germer dans des boites de Petrie en verre contenant du papier filtre imbibé d'eau distillée, dans les conditions optimales du laboratoire. Le fruit du *Daphne gnidium* traité par l'acide chlorhydrique et non traité est aussi concerné par ce test de germination. (Tanaka-Oda et al., 2009)

Les essais de germination sont portés donc sur un nombre total de 180 graines et 120 fruits, à raison de 20 pour chaque lot et avec trois répétitions. Les graines et les fruits sont arrosés avec la même quantité d'eau toutes les 24 heures.

Les paramètres d'observation et d'appréciation de l'expérimentation reposent sur les éléments suivants :

- ★ La fente des téguments et l'apparition de la radicule qui représente un critère retenu par la plus part des physiologistes ;
- ★ Le comptage des graines germées tous les jours ;
- ★ Les essais de germination sont exprimés par la capacité germinative qui représente le pourcentage maximal des graines germées.
- ★ Le mode d'expression des résultats se fait sous forme de courbe et d'histogramme de germination qui décrivent le phénomène étudié, en indiquant l'évolution des pourcentages de germination cumulés en fonction du temps.

De ce fait, pour chaque lot, le nombre de graines germées est compté chaque jour puis retiré de la boîte de Petrie. Durant cette expérimentation tous les facteurs sont maintenus constants.

### VI.2.3.3 Expression des résultats

Le taux de germination (TG) a été calculé comme suit :

$$TG = (\text{nombre de graines germées} / \text{nombre total de graines traitées}) \times 100.$$

Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1) a été entreprise pour déterminer des éventuelles différences des pourcentages de germination entre les individus et entre les traitements. Ce test technique nous permet de savoir si les cinq échantillons proviennent de la même population ou des populations identiques avec la même médiane (Siegel et al., 1988).

### VI.2.4 Étude Eco-phytochimique

Durant ce quatrième volet de cet axe écologique, nous sommes appelés à mettre en évidence l'impact des facteurs écologiques de notre zone d'étude sur la variation des concentrations des substances naturelles, notamment les substances phénoliques, au niveau des feuilles du *Daphné gnidium* et sur leur activité anti oxydante.

Le choix est porté que sur les feuilles, du fait que c'est l'organe qui présentent des concentrations en composés naturels, fluctuant en fonction des conditions stationnelles (Ncube, 2012)

Nous avons choisi comme paramètres stationnels, l'altitude et l'exposition. Ainsi, les conditions stationnelles sont portées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8 : Condition stationnelles des sites choisis

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
<i>Altitude (m)</i>	793	830	950	1061	820	850	865	910
<i>Exposition</i>	SO	SO	SE	SE	NE	NO	NE	NO
<i>Pente (%)</i>	12-25	5	10	25	40	25	30	16
<i>Taux de recouvrement(%)</i>	20	25	35	20	35	35	35	35

#### VI.2.4.1 Echantillonnage

Les feuilles de *D. gnidium* ont été recueillies, à différentes altitudes au niveau des montagnes de Tessala, du bon matin de la journée du 14 Avril 2013, à un temps ensoleillé (notre espèce est généralement n'est pas à l'abri des arbres dans la zone d'étude), nous avons recueilli approximativement 200 feuilles de chaque échantillon à raison de trois plants qui ont été transportés au laboratoire dans des boîtes isothermes (10 ° C), comme le montre la Figure 13.



Figure 13: la conservation des feuilles collectées de *Daphne gnidium* dans des boites isothermes (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)

Les parcelles d'échantillonnage ont été localisées à l'aide d'un GPS des stations. L'échantillonnage a été fait en se basant sur le critère altitude, de telle sorte à avoir une différence significative entre les altitudes ; ainsi que pour l'exposition sud et nord (Figure 14).

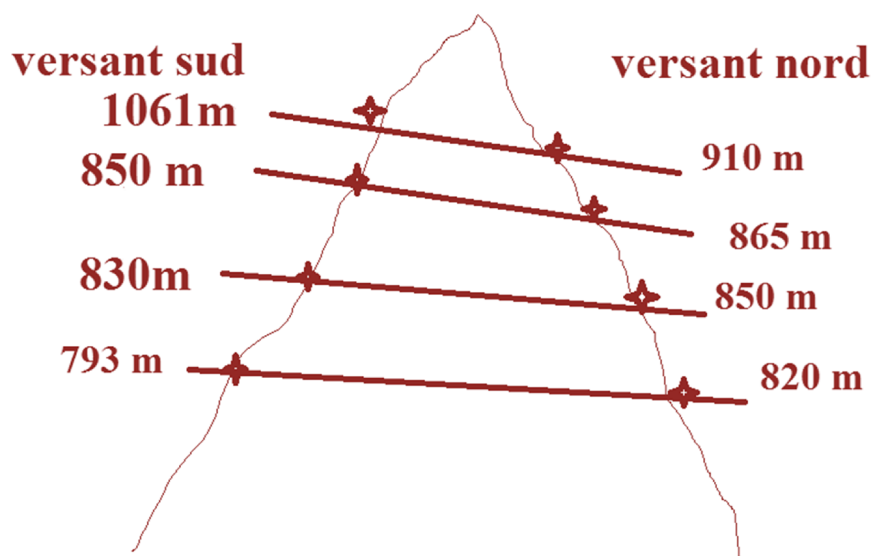


Figure 14 : la répartition des stations d'échantillonnage pour l'étude écophytochimique dans les monts de Tessala

Les feuilles de *D. gnidium* ont été séchées à l'ombre pendant une semaine, puis broyées en utilisant un broyeur électronique (IKA WERKE ME 10 BASIC) puis stockés dans des boîtes fermées hermétiquement. Le procédé de séchage à la température ambiante est mentionné dans la plupart des protocoles pour extraire le composé phénolique sans dégradation (**Bruneton, 1987**).

Le même procédé d'échantillonnage a été répété avec trois stations à différente altitude en date du 17 avril 2014, de 14h00 à 16h00, pour un dosage des substances phénoliques sur des feuilles fraîches et d'autres séchées à l'étuve de type Ecocell à 40° pendant 24 h, dans l'objectif de faire une étude d'optimisation et confirmer les protocoles d'extraction des composés phénoliques (**Brueton, 1987**). Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale.

#### VI.2.4.2 Extraction des composés polyphénoliques au niveau des feuilles

La méthode d'extraction optée est celle du liquide-liquide. Ainsi, 1g de feuilles sèches en poudre a été placé dans un Erlenmeyer de 20 ml de méthanol (96%) pendant 24 heures. Après filtration (en utilisant du papier wattman 1 ml), les solutions méthanoliques ont été évaporées sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type Buchi R- 200 à une température de 60 °C. Les résidus secs pesés ont été repris par 3 ml de méthanol (**Matkowski et al., 2006**). (Figure 15). Les mêmes procédées ont été appliqués sur les feuilles fraîches et sur les fleurs. Le protocole de dosage des composés phénoliques.

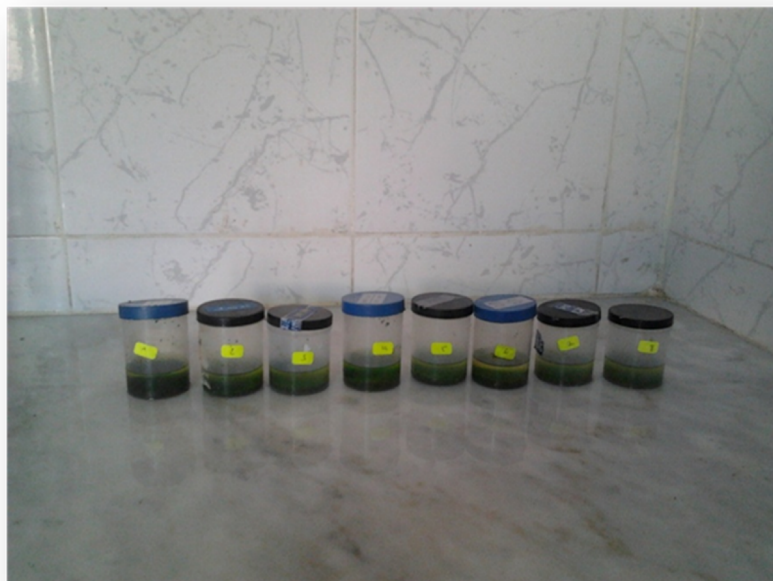


Figure 15: la macération des feuilles de chaque station dans le méthanol (96%) (Cliché, **Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

#### VI.2.4.3 Dosage des phénols totaux

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libre ou engagés avec un glucide. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit par **Singleton et al. 1965**

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. (Figure 16, Figure 17, Figure 18, Figure 19) (**Boizot et Charpentier, 2006**).

##### VI.2.4.3.a Mise en œuvre pratique

Un volume de 200  $\mu$ l de l'extrait brut méthanolique est introduit dans des tubes à essai, le mélange (1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 minutes à la température ambiante. L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait méthanolique. (mg GAE/g EM).

#### VI.2.4.4 Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par **Zhishen et al., (1999)** avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm.

##### VI.2.4.4.a Mise en œuvre pratique

500 µl de l'extrait brut méthanolique des feuilles convenablement dilué sont mélangés avec 1500 µl d'eau distillée, suivis de 150 µl de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 5%. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 10%(m/v) est rajouté au mélange. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plante étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait méthanolique (mg EC/g EM).

#### VI.2.4.5 Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide (**Price et al., 1978**). Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère. Les quantités des tannins sont estimées en utilisant la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto (1985)**.

##### VI.2.4.5.a Mise en œuvre pratique

Un volume de 50 µl de l'extrait brut est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré ( $\text{HCl}$ ) est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 20

min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats de la plante étudiée sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme d'extrait méthanolique (mg EC/g EM).

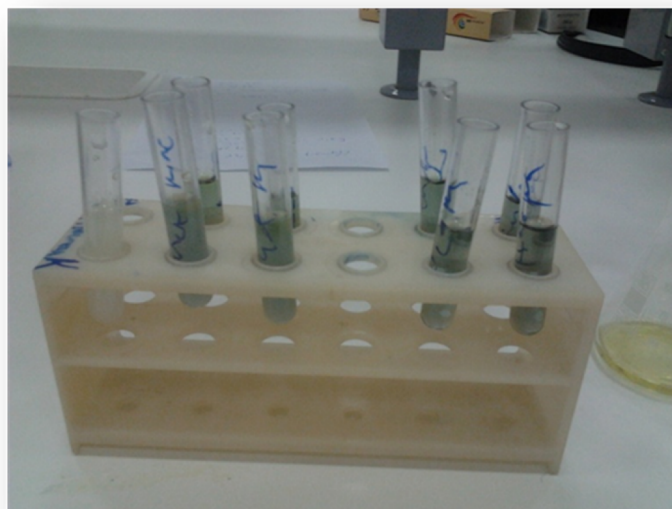


Figure 16 : la coloration bleue des extraits dosés pour les phénols totaux (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)

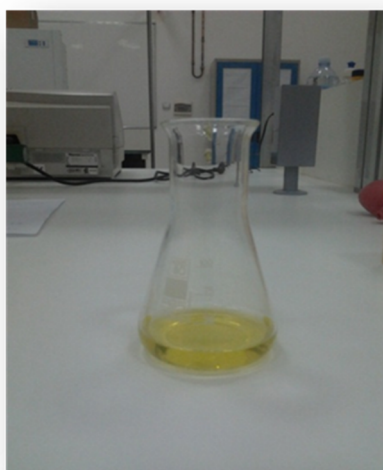


Figure 17 : réactif de folin cialtieux dilué 10 fois (couleur jaune) (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)



Figure 18 : homogénéisation des solutions préparées à base des sels minéraux (nitrate de sodium, carbonate de sodium, Trichlorure d'aluminium...) (Cliché, **Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

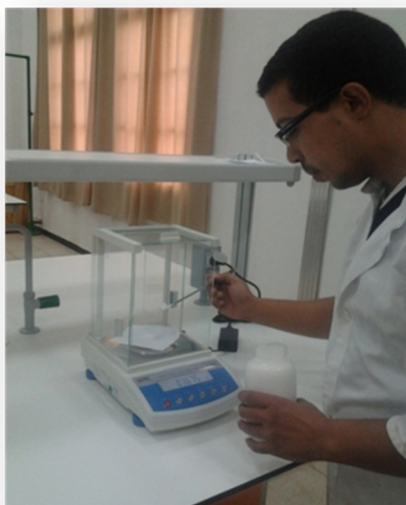


Figure 19 : la pesée des réactifs à base des poudres par la balance de précision (Cliché, **Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

#### **VI.2.4.6 Détermination de l'activité anti oxydante des composés phénoliques extraites des feuilles du *D. gnidium***

La méthode utilisée pour la détermination de l'activité anti oxydante est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger par le radical DPPH. C'est la méthode adéquate pour les composés phénoliques. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Benhammou et al. (2009)**. Alors, un volume de 50  $\mu$ l de différentes concentrations

de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50  $\mu$ l du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. (Figure 20, Figure 21, Figure 22)



Figure 20: Lecture par spectrophotomètre (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)



Figure 21: Addition des réactifs par micropipette (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)



Figure 22: spectrophotomètre utilisé pour la lecture des absorbances (Cliché, Dif Mustapha Mahmoud, 2013)

#### VI.2.4.6.a Expression des résultats

#### VI.2.4.6.b Calcul des pourcentages d'inhibitions

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I \% = ((Ac - At) / Ac) * 100$$

**Ac** : absorbance du contrôle ;

**At** : absorbance du test effectué

#### VI.2.4.6.c Calcul des IC50

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, les pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

#### VI.2.4.7 Etude statistique

Les résultats expérimentaux sont exprimés en moyenne  $\pm$  Ecart-Type. Toutes les mesures ont été répétées trois fois. La version du logiciel Statistica 8.1 a été utilisée pour le traitement des données. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA 1) a été réalisée pour évaluer l'effet de l'altitude et de l'exposition sur le niveau de polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et les tannins condensés. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque les valeurs de p étaient inférieures à 0,05. Nous avons utilisé l'analyse factorielle des correspondances de la méthode (AFC) dans la première étude (Impact de l'altitude et l'exposition), pour visualiser

---

et interpréter les relations entre les composés phénoliques mesurées dans les différents échantillons et les facteurs écologiques (altitude et de l'exposition).

### **VI.3 Extraction des flavonoïdes au niveau des tiges et évaluation de leur activité anti oxydante**

Dans ce contexte typiquement phytochimique, on a entamé aussi l'extraction des flavonoïdes au niveau des tiges du *Daphne gnidium*. Pour cela, l'extraction des flavonoïdes a été faite sur la poudre des tiges du *Daphne gnidium* selon le protocole ci-dessous :

D'abord, 100 g de poudre fine des tiges du *Daphne gnidium* ont été ajoutés au mélange éthanol/eau (80%), laissant macérer pendant 24 heures puis, on récupère l'extrait éthanoïque qui est de 350 ml. Le renouvellement du solvant se fait chaque 24 heures durant 3 jours.

La Solutions hydro-éthanoliques obtenue est mise dans un seul récipient, puis filtrée pour obtenir à la fin une solution limpide. Elle est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor de type R 120) à une température comprise entre 35 à 45 ° C. Par la suite, nous avons repris l'extrait sec par 200 ml d'eau bouillante distillée, laissé pendant 24 heures se décanter, puis filtré sur du papier filtre Whatman n °1. La phase aqueuse limpide est extraite par différents solvants respectifs, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le n- butanol pour un volume (V/V). Ces derniers sont éliminés par évaporation. Les quatre extraits sont lyophilisés par la suite.

Les extraits lyophilisés ont été étudiés quantitativement et qualitativement ; pour l'étude quantitative, les phénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été dosé par la méthode spectrophotométrique, Pour l'étude qualitative, on a procédé à une identification par la méthode de chromatographie phase liquide « HPLC » et la résonance magnétique nucléaire « RMN <sup>13</sup> C » et RMN <sup>1</sup> H

L'évaluation de l'activité anti oxydante (Figure 23) des flavonoïdes a été entreprise de la même manière que celle des polyphénols citée ci- dessus.

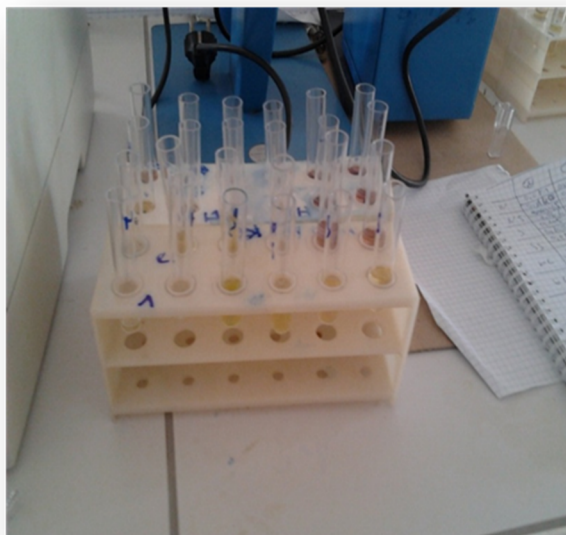


Figure 23 : l'activité antioxydante des flavonoïdes par la méthode de DPPH (Cliché, **Dif Mustapha Mahmoud, 2013**)

### VI.3.1 Caractérisation des composés par HPLC

La HPLC est un moyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange.

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entraîné par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

#### VI.3.1.1 Appareillage

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous :

a) **Pompe** : une pompe est alimentée à partir des plusieurs flacons contenant des solvants de polarités différentes permet d'effectuer une programmation des solvants pour assurer un système de gradient.

- En mode isocratique : 100% d'un mélange du même éluant tout au long de l'analyse,

- En mode gradient, la concentration des constituants du mélange d'éluant varie en fonction du temps.

b) **Injecteur** : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage

c) **Colonne** : elle contient la phase stationnaire qui définit le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.

★ **La phase normale**

Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la silice est greffée par des groupements polaires et l'éluant utilisé est apolaire.

★ **La phase inverse**

Dans le cas de la phase inverse, la silice est greffée par des chaînes carbonées linaires (C8, C18 et l'éluant utilisé est polaire (ACN (acétonitrile), MeOH, H<sub>2</sub>O).

d) **Détecteur** : un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser. Notons qu'il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde. Le principe de fonctionnement de l'HPLC est schématisé ci-dessous

Le gradient utilisé est constitué de 3 phases mobiles :

- Solvant A : composition (50 mM phosphate d'ammonium (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à pH 2,6 ajusté avec l'acide orthophosphorique) ;
- Solvant B : composition 80: 20 (v/v) acétonitrile / solvant A ;
- Solvant C : composition (200 mM d'acide ortho phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) à pH 1,5 ajusté avec NaOH).

Les solvants sont filtrés sur papier Whatman n°3 puis mis dans un appareil à l'ultrason pendant 25 minutes

Le débit d'éluion est de 1 ml/ minute et la capacité de la boucle d'injection est de 20 µl. La détection a été réalisée à 280 et à 320 nm. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 10 minutes avant une nouvelle analyse. (Muanda, 2009)

### VI.3.1.2 Caractérisation des composés par RMN

La RMN est un outil d'analyse destiné à élucider les structures des composés organiques. Les noyaux les plus souvent étudiés sont le <sup>1</sup>H et le <sup>13</sup>C. La RMN du <sup>1</sup>H peut être relativement rapide. Grâce aux déplacements chimiques des différents signaux et à leur mode de couplage, il est possible de déterminer la structure de petites molécules organiques par application d'un raisonnement logique simple.

La RMN du  $^{13}\text{C}$  permet de retrouver tous les carbones de la molécule et de déterminer leur déplacement chimique en fonction de leur environnement. Les appareils récents permettent d'obtenir rapidement les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , ceux-ci avec ou sans découplage du proton.

Cependant, dans le cas de molécules complexes cette analyse s'avère insuffisante pour caractériser la structure de la molécule. C'est dans ce cadre que les expériences de RMN à 2 dimensions (RMN 2D) offrent des améliorations considérables dans la résolution des spectres et permettent la caractérisation des structures de molécules complexes.

Nous exposerons ici les types d'expériences homonucléaire et/ou hétéronucléaire menées en RMN 2D pour la détermination de structures.

★ homonucléaire

L'une des techniques les plus importantes est l'expérience COSY (homonuclear Correlated Spectroscopy Y), dont les spectres montrent les déplacements chimiques du proton dans 2 dimensions F1 et F2. Les pics de la diagonale ( $F1=F2$ ) représentent le spectre original obtenu dans l'expérience 1D, les taches hors de la diagonale montrent l'existence d'un couplage scalaire ( $J_{\text{HH}}$ ) entre deux noyaux.

Ces taches apparaissent de façon symétrique par rapport à la diagonale et sont centrées aux coordonnées correspondant aux déplacements chimiques des deux noyaux couplés. La corrélation s'arrête quand il y a un carbone quaternaire.

L'expérience NOESY (Nuclear Overhauser Effect spectroscopy) a l'avantage par rapport à la technique COSY de montrer des interactions de longue distance entre deux protons, traduisant ainsi leur proximité spatiale.

★ hétéro-nucléaire

Dans le cas de molécules complexes dont les signaux en RMN du proton sont superposés, l'attribution des résonances est impossible à l'aide des seules expériences homonucléaires, on a recours à la RMN 2D hétéro-nucléaire  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ .

Cependant, étant donné que le rapport signal sur bruit d'une expérience RMN est directement proportionnel aux rapports gyrométriques des noyaux excités et détectés, il en résulte qu'une expérience dans laquelle on détecte les noyaux  $^{13}\text{C}$  à une sensibilité beaucoup plus faible qu'une expérience réalisée sur les protons. Pour résoudre cette difficulté, la RMN hétéro-nucléaire exploite l'existence d'un couplage scalaire ( $J_{\text{C-H}}$ ) hétéro-nucléaire qui transfère la polarisation du noyau le plus sensible ( $^1\text{H}$ ) vers le noyau le moins sensible ( $^{13}\text{C}$ ).

Ce qui permet soit de corrélérer les signaux d'un proton à celui du noyau  $^{13}\text{C}$  auquel il est lié dans le cas des expériences HMQC ( $^1\text{H}$ -detected chemical shift correlation via Multiple Quantum Coherence), ou de déterminer des couplages lointains  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  à travers 2, 3 ou 4 liaisons, dans le cas des expériences HMBC ( $^1\text{H}$ -detected chemical shift correlation via Multiple Band Coherence).

Pour l'ensemble de nos expériences RMN (1D et 2D), nos composés ont été dissous dans du  $\text{CD}_3\text{OD}$  et les analyses  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ont été effectuées sous un champ de 250 MHz. (**Muanda, 2009**)

### VI.3.2 Etude statistique

L'étude statistique de cette analyse a été aussi traitée dans notre travail, ainsi, les différents essais sont réalisés en triple et la moyenne est calculé à partir de l'écart type, la corrélation entre l'IC 50 et les composés phénoliques sont effectué par Excel 2013.

---

---

## Chapitre VII: Résultats et discussion

---

---

---

## VII.1 Résultats de l'étude ethnobotanique

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle est une pratique très ancienne qui connaît, actuellement, un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent.

L'enquête faite a révélée l'utilisation surtout de 11 plantes en thérapie traditionnelle par les riverains et les habitants de la région de Sidi Bel Abbes spécialement celles qui poussent dans les monts de Tessala.

Dans la littérature, ces plantes ont des utilisations et des préparations diverses. Les préparations des recettes médicales sont nombreuses, parmi lesquelles on a choisi les plus célèbres. (Babaissa, 2011 ; Lucienne, 2010 ; Djermouni et al., 2004), et qui sont comme suite :

1. *Papaver rhoeas* L. (coquelicot) : elle est utilisée comme sédatif, expectorant pectorale et comme sudorifique ; les organes utilisés de cette plante sont les pétales, elles sont préparées soit par infusion soit par décoction ;
2. *Crataegus laevigata* L (L'aubépine) les fleurs sont utilisées contre la goutte, la pleurésie, les hémorragies, les pertes blanches, les calculs urinaires, l'hypertension, l'angine de poitrine et l'artériosclérose. L'écorce est utilisée contre la fièvre et la diarrhée. Les organes utilisés de cet arbre sont les fleurs et l'écorce et sont préparés par :
  - -Infusion des fleurs : on met deux pincées de fleurs dans une tasse d'eau bouillante et on prend 2 à 3 tasses par jour
  - -Décoction de l'écorce : on fait bouillir 10 pincées d'écorce hachée dans un litre d'eau, on consomme 2 à 3 tasses par jour ;
3. *Asparagus acutifolius* L (L'asperge) : elle est utilisée comme diurétique, contre les palpitations. Les organes utilisés de cette plante sont les racines et les rhizomes cueillis en automne, leur emploi et peut être par infusion ou par un bain préparé pour les mains et pour les pieds ;
4. *Quercus sempervirens* Mill. (Le chêne vert) les feuilles soignent les saignements, les varices et les diarrhées, par contre l'écorces est utilisé contre les gerçures et les dermatoses en l'appliquant sur des compresses. Les feuilles sont employées comme suite :

---

Infusion des feuilles : 5 feuilles fraîches ou sèches sont mises dans un litre d'eau bouillante et prendre 2 ou 3 tasses par jours ;

5. ***Daphne gnidium* L.** Le Daphné possédant des propriétés antiseptiques, il soigne en utilisation externe contre la gale et certaines mycoses et il donne des bons résultats contre les chutes des cheveux ; les organes utilisés sont les feuilles. Elles sont préparées par décoction ;
6. ***Dittrichia viscosa* Greuter.** (*L'inule* visqueuse) la partie aérienne de cette plante est utilisé comme désinfectant, cicatrisant et employé contre les infections pulmonaires, elle est préparée pour l'utilisation comme cataplasme ;
7. ***Marrubium vulgare* L.** (Le marrube blanc) : il est utilisé comme calmant, contre les maladies respiratoires, il est également considéré comme un diurétique, un appétitif et un digestif, les affections sont aussi traitées en utilisant les feuilles ; elles sont préparées par infusion ;
8. ***Malva sylvestris* L.** (La mauve) : les feuilles et les fleurs sont utilisées comme anti inflammatoire, elles sont employées contre les affections cutanées, les ulcérations de l'estomac, des intestins, des gargarismes ; les racines mâchées sont utilisés comme désinfectant de la bouche. Le mode d'emploi de cette plante est comme suit :

Infusion des fleurs et des feuilles : faire bouillir une poignée des fleurs et des feuilles dans un litre d'eau, et boire à volonté ;

9. ***Sinapis arvensis* L.** (La moutarde) : elle traite les inflammations des organes internes, et les douleurs névralgiques La partie utilisée est la graine. Elle est préparée par macération, gargarisme ou décoction ;
10. ***Urtica dioica* L.** (L'ortie) : les feuilles sont utilisées comme diurétique, antidiarhéique, et antianémique. Les racines sont des reconstituante et sont utilisées aussi comme diurétique, et comme dépuratif. Le mode d'emploi de cette plante est comme suit :

Infusion des feuilles : 1 ou 2 poignées des feuilles dans un litre d'eau. On prend 2 à 3 tasses par jours ;

Décoction des racines : faire bouillir une poignée de racines fraîches dans 1 litre d'eau. Prendre 3 tasses par jours ;

**11. *Eucalyptus globulus* Labill** (L'eucalyptus) : il est antiseptique efficace dans les affections des voies respiratoires et celles des voies urinaires. Les organes utilisés sont les feuilles. Elles sont préparées par infusion, décoction, fumigation.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure 24. Elle montre que les plantes étudiées sont utilisées dans le remède de 20 maladies et que parmi ces plantes, il y a celles qui sont utilisées contre les maladies urinaires et celles qui sont diarrhéiques avec un pourcentage plus important, les autres maladies remédiées par les plantes recensées dans cette étude ethnobotanique ont un pourcentage moins important mais remarquable.

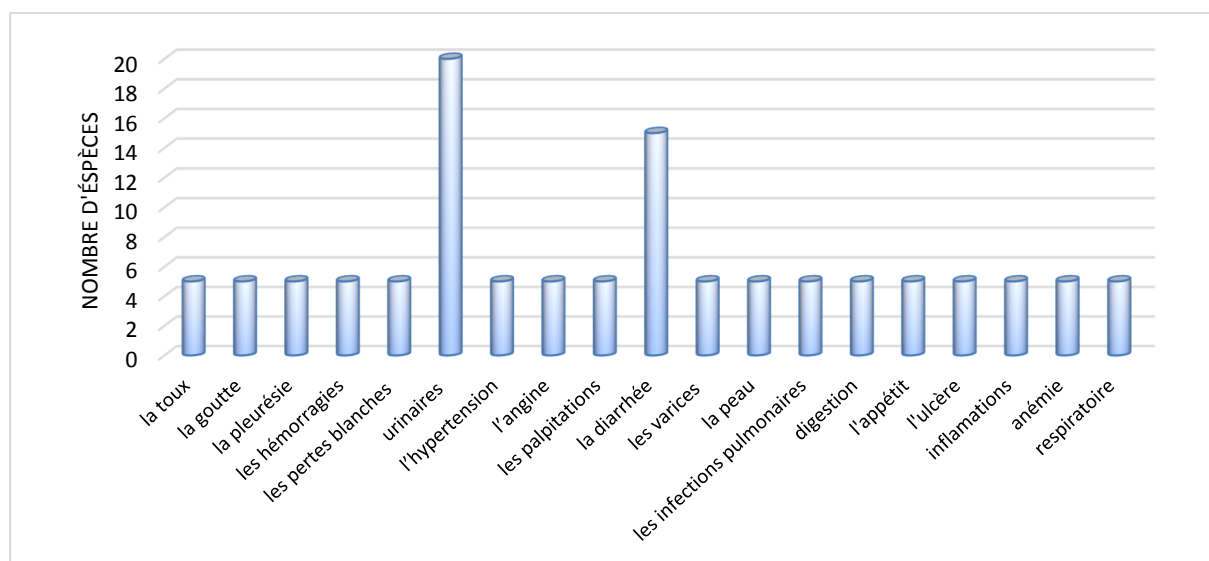


Figure 24 : pourcentage des maladies remédiées par les plantes échantillonnées

Cette étude nous a permis de mettre en évidence les espèces qui sont le plus utilisées dans la région, ces résultats ont été aussi confirmés par d'autres chercheurs qui ont travaillé sur la même zone d'étude et sanctionné par des publications scientifiques, notamment les travaux de **Cherifi (2011)** ; **Bouzidi et al. (2009)** et **Baraka (2008)**.

Par ailleurs, le *Daphne gnidium* fait partie de ces plantes inventoriées et utilisées par la population locale comme antiseptique et pour traiter les mycoses entre autre ; mais elle n'est malheureusement pas été exploitée sur le plan phytochimique et n'a jamais fait l'objet d'une étude de valorisation telle que l'activité biologique ou anti oxydante.

## VII.2 Résultats de l'étude autoécologique

### VII.2.1 Note sur le cortège floristique du *Daphne gnidium*

Les résultats de cette étude permettent de connaître l'état actuel de l'espèce *Daphne gnidium* L. avec ses associations, notamment celui des formations forestières existantes actuellement

dans les monts de Tessala, à partir d'une note du cortège floristique et l'étude pédologique. L'inventaire exhaustif des espèces qui accompagnent le Daphné est mentionné dans le Tableau 9

Tableau 9: Tableau globale des relevés floristiques (a-b-c)

Tableau 9-A : Espèces présentées dans strate arborescente des relevés floristiques avec leurs indices d'abondance-dominance et de sociabilité et leurs fréquences.

<i>Strate arborescente</i>	Indice d'abondance-dominance et de sociabilité								Fréquence de l'espèce
	-	-	-	1.1	++.	-	-	1.1	
<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	-	-	-	1.1	++.	-	-	1.1	II
<i>Nerium oleander L.</i>	-	-	-		++.	-	-	-	I
<i>Olea europea Var.</i> <i>Oleaster Dc.</i>	1.1	-	-	1.1	-	-	-	-	I
<i>Phillyrea angustifolia L.</i>	-	-	++.		-	-	-	2.3	II
<i>Pistacia lentiscus L.</i>	-	-	++.	1.1	-	-	-	1.1	II
<i>Pistacia terebinthus L.</i>	-	-	-		-	-	-	1.1	I
<i>Quercus ilex L.</i>	-	-	-		-	-	2.1	2.2	I
<i>Rubus caestus L.</i>	-	-	-		-	-	1.1	-	I
<i>Zizifus lotus L.</i>		1.1	-		-	-	-	-	I
<i>Rosa sempervirens L.</i>	-	-	-		-	1.1	-	-	I

Tableau 9-B : espèces présentées dans strate arbustive des relevés floristiques avec leurs indices d'abondance-dominance et de sociabilité et leurs fréquences.

<i>Strate arbustive</i>	Indice d'abondance-dominance et de sociabilité								Fréquence de l'espèce
	-	-	-	1.1	++.	-	-	1.1	
<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	-	-	-	1.1	++.	-	-	1.1	II
<i>Nerium oleander L.</i>	-	-	-		++.	-	-	-	I
<i>Olea europea Var.</i> <i>Oleaster Dc.</i>	1.1	-	-	1.1	-	-	-	-	I
<i>Phillyrea angustifolia L.</i>	-	-	++.		-	-	-	2.3	II
<i>Pistacia lentiscus L.</i>	-	-	++.	1.1	-	-	-	1.1	II
<i>Pistacia terebinthus L.</i>	-	-	-		-	-	-	1.1	I
<i>Quercus ilex L.</i>	-	-	-		-	-	2.1	2.2	II
<i>Rubus caestus L.</i>	-	-	-		-	-	1.1	-	I
<i>Zizifus lotus L.</i>		1.1	-		-	-	-	-	I
<i>B-Strate arbustive</i>									
<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	-	-	-	1.1	++.	-	-	1.1	II
<i>Nerium oleander L.</i>	-	-	-		++.	-	-	-	I
<i>Olea europea Var.</i> <i>Oleaster Dc.</i>	1.1	-	-	1.1	-	-	-	-	I
<i>Phillyrea angustifolia L.</i>	-	-	++.		-	-	-	2.3	II
<i>Pistacia lentiscus L.</i>	-	-	++.	1.1	-	-	-	1.1	II
<i>Pistacia terebinthus L.</i>	-	-	-		-	-	-	1.1	I
<i>Quercus ilex L.</i>	-	-	-		-	-	2.1	2.2	II
<i>Rubus caestus L.</i>	-	-	-		-	-	1.1	-	I
<i>Zizifus lotus L.</i>		1.1	-		-	-	-	-	I

Tableau 9-C : Espèces présentées dans strate herbacées des relevés floristiques avec leurs indices d'abondance-dominance et de sociabilité et leurs fréquences.

<i>Strate herbacée</i>	Indice d'abondance-dominance et de sociabilité							Fréquence de l'espèce	
	1.1	-	1.1		3.2	-	3.2		1.1
<i>Ampelodesma mauritanica (Poir.)</i>	1.1	-	1.1		3.2	-	3.2	1.1	IV
<i>Anacyclus clavatus (Desf.) Pers.</i>	2.2	-	-		-	-	-	-	I
<i>Anagallis arvensis L.</i>	-	1.1	-		-	2.1	-	-	I
<i>Anagallis Monelli L.</i>	2.2	1.2	++.	++.	1.1	1.1	++.	1.1	V
<i>Asparagus acutifolius L.</i>	++.	1.1			-	1.1	-	2.2	IV
<i>Asphodelus microcarpus Sal</i>	2.2	2.1	++.	1.1	+	-	1.1	-	IV
<i>Avena sterilis L.</i>	1.+	-	-		-	-	-	3.2	II
<i>Balota hirsuta Benth.</i>	3.2	1.1	-		-	2.1	1.1	-	IV
<i>Bromus rubens L.</i>	1.1	-	++.		+	+	-	2.2	IV
<i>Bryonia dioica Jacq.</i>	1.1	-	-		-	-	-	-	I
<i>Calendula arvensis L.</i>	2.2	-	-		-	2.2	-	-	II
<i>Calendula bicolore L.</i>		1.1	-		-	1.1	-	-	II
<i>Calycotome spinosa Link.</i>	2.1	2.2	2.2	4.4	2.1	2.1	1.1	4.4	V
<i>Carduus pycnocephalus L.</i>	2.2	-	-		-	-	-	-	I
<i>Centaurea pullata L.</i>	2.1	-	2.2		-	-	-	-	II
<i>Chamaerops humilis L.</i>	3.2	2.2	2.2	1.1	+	2.1	2.2	2.2	V
<i>Cistus salvifolius L.</i>	-	-	1.1		++.	-	++.	-	II
<i>Daphne gnidium L.</i>	2.2	2.2	1.1	++.	1.1	1.1	1.1	2.2	V
<i>Daucus carota L.</i>	-		-		-	2.2	-	1.1	II
<i>Erodium moschantum L.</i>	-	1.1	-		-	-	-	-	I
<i>Foeniculum vulgare (Mil.) Gaer.</i>	-	1.1	-	3.3	-	-	-	-	I
<i>Helianthemum polyanthum (L.) Mill</i>	-		-		++.	-	-	-	II
<i>Hordeum murinum L.</i>	2.3		-		-	-	-	1.1	II
<i>Lobularia maritima (L.) Desv</i>	-	-	++.		++.	-	++.	-	II
<i>Lonicera implexa Aiton.</i>	-	-	-		-	-	++.	-	1
<i>Marrubium vulgare L.</i>	2.2	2.2	-	++.	-	2.1	-	-	3
<i>Papaver rhoeas L.</i>	-	-	-		++.	-	++.	-	2
<i>Reseda alba L.</i>	-	-	-		-	-	1.1	1.1	II
<i>Sinapis arvensis L.</i>	-	-	++.	1.1	-	-	-	1.1	II
<i>Stipa tenacissima L</i>	-	-	++.		-	-	-	-	II
<i>Teucrium polium L.</i>	-	-	++.		-	-	-	-	I
<i>Thymus ciliatus Desf.</i>	-	-	++.	1.1	++.	-	++.	-	IV
<i>Urginea maritima L.</i>	-	-	++.		2.2	-		-	II

L'étude de la composition floristique a permis de mettre en évidence les constatations suivantes :

La richesse spécifique (Figure 25) représentée par le nombre des espèces dans un territoire défini sur un relevé floristique est la première approche d'évaluer la biodiversité (Quezel *et al.*, 1988). Cette richesse présente une diversité très hétérogènes avec une différence de 10 espèces entre la valeur minimale (12 espèces à la station 4 et 8) et maximale (22 espèces à la station 3) cette inégalité ce témoigne de la variabilité de la répartition de la flore en relation avec les différents facteurs du milieu tels que le sol, l'exposition où l'action anthropozoogène.

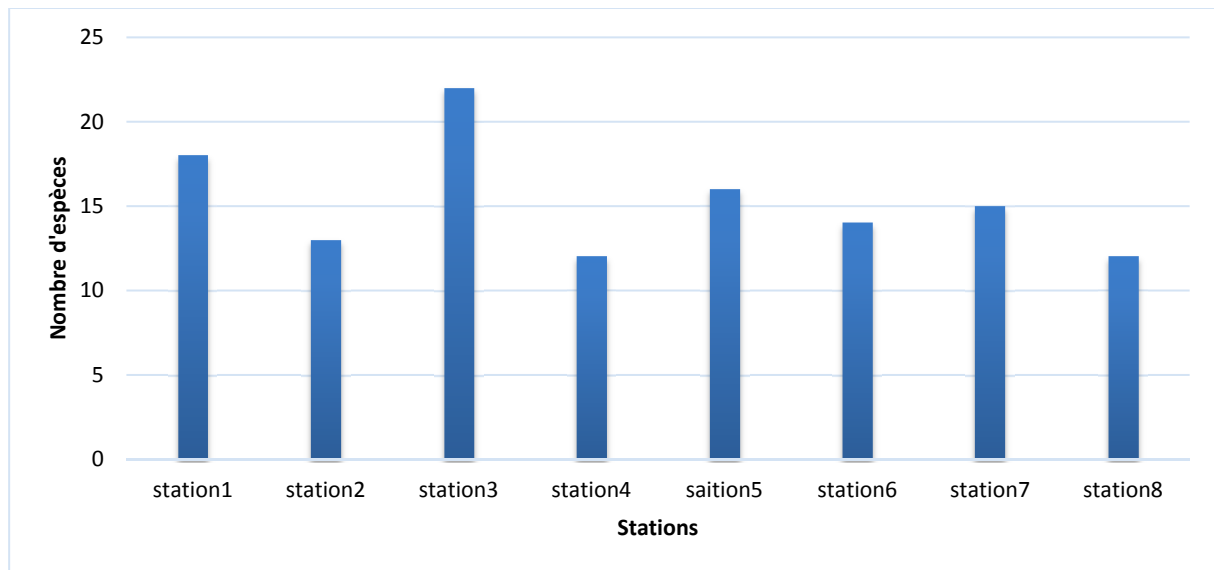


Figure 25: Nombre des espèces inventoriées par station

De point de vue composition systématique (Figure 26) nous avons constaté la prédominance des deux familles : les Astéracées et les Poacées ; en ce qui concerne la fréquence d'apparition de *Calycotome spinosa* Link., *Chamaerops humilis* L. et *Daphne gnidium* L. par leurs présence presque dans tous les relevés s'impose des espèces très constantes. Les espèces rares et très rares constituent la majorité des taxons inventoriés.

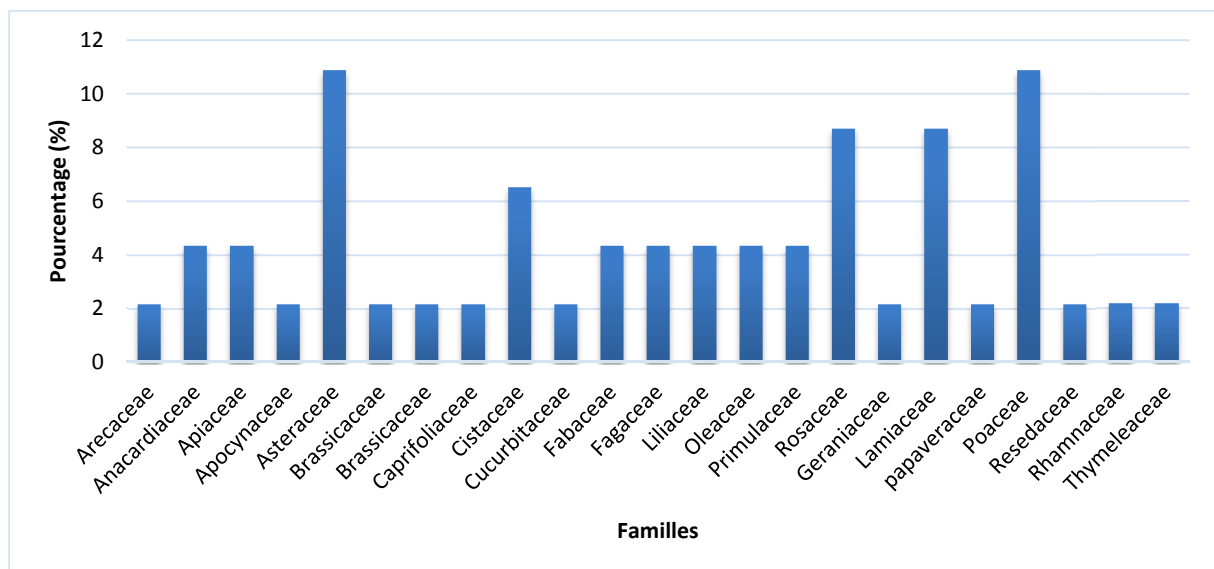


Figure 26 : Répartition des espèces recensées par familles en %

La composition du spectre biologique (Figure 27) de la partie étudiée indique une prédominance des thérophytes et hémicryptophyte sur les phanérophytes, les chamaephytes et les géophytes. La grande proportion des thérophytes s'explique par les conditions édaphiques et surtout les conditions microclimatiques, notamment la période hivernale et la période

printanière qui sont relativement humides alternat avec une période assez prolongée de sécheresse.

L'hémicryptophytes sont représentés par (25.12 %) garde une place importante dans la zone d'étude, l'abondance de type biologique s'explique par la richesse de matière organique et par l'altitude.

Les phanérophytes sont représentés par 23,91% des espèces inventoriées. Ils sont moins adaptés que les chamaephytes (19,57%) à la sécheresse car ils sont plus xérophiles (**Benabaji et al., 2001**)

Les géophytes sont beaucoup moins important, (6.24%) leur très faible proportion est en relation avec un gradient défavorable ce qui favorise le développement des espèces à cycles court (**Aidoud, 1983**).

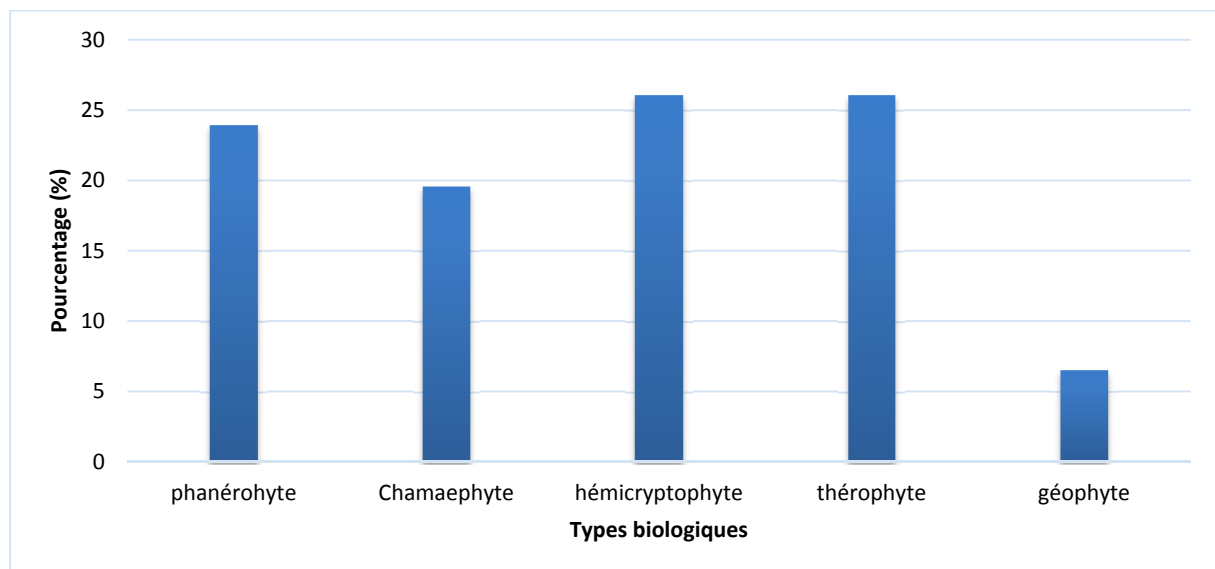


Figure 27 : Spectre biologique des espèces recensées en %

Le type biogéographique (Figure 28) dominant dans les stations choisies est le Méditerranéen suivi par l'ouest Méditerranéen puis l'Eurasique. Par contre les autres types présentent ensemble une faible participation, mais cela ne les empêche pas de contribuer à la diversité et la richesse du potentiel phytogénétique de la zone étudiée.

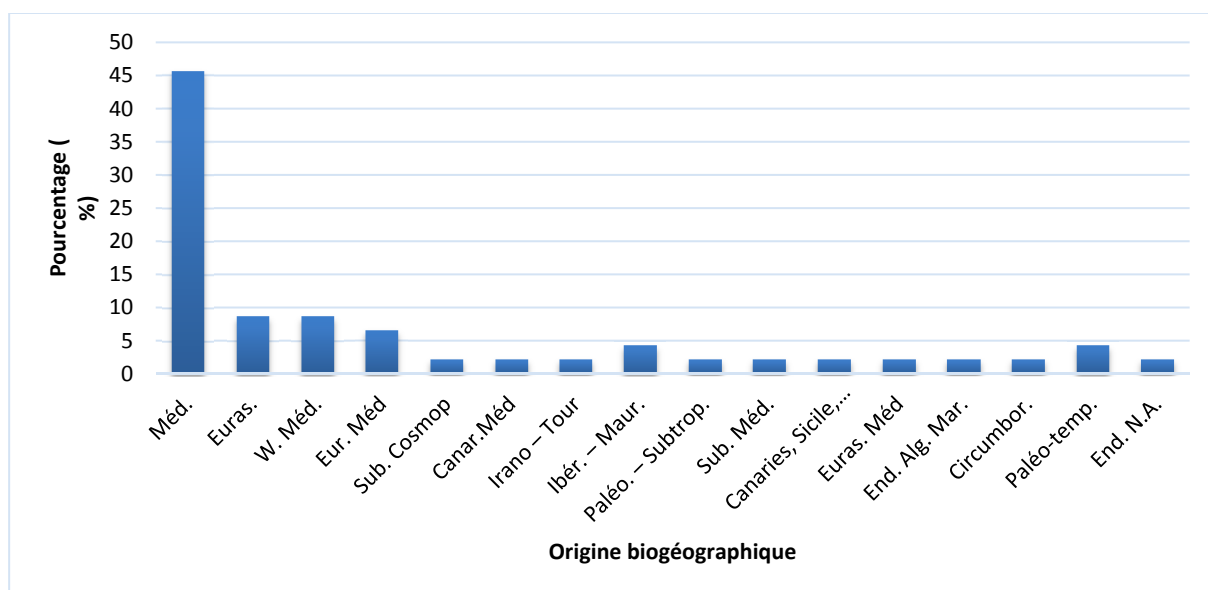


Figure 28 : Spectre biogéographique des familles des recensées en %

En comparant nos résultats avec des travaux antérieurs sur l'autoécologie des espèces des monts de Tessala tels que les travaux sur *Urginea pancracion* Phil, (**Bouzi** *et al.*, 2009) et sur *Marrubium vulgare* L, (**Bouterf** *et al.*, 2011), nous constatons qu'il y a une différence dans les exigences par rapport au sol et une diversité d'association végétale, ce qui explique la diversité du site étudié et qui tend vers un état de dégradation.

Aussi, les travaux de **Cherifi et al.** (2011) et **Bachir Buidjera et al.** (2011) indiquent que du point de vue phytoécologique et phytogéographique la région présente un faciès dégradé avec une dynamique accélérée due en grande partie à la pression anthropozoogène. La situation actuelle de la propriété forestière algérienne se présente comme l'une de plus critiques dans la région méditerranéenne, en plus le travail de **Colybali et al.**, 2009 a mis en relief la relation étroite entre les conditions écologiques et les facteurs anthropiques, à l'aide de l'outil statistique.

## VII.2.2 Résultats des analyses physico-chimiques du sol

Les résultats des analyses physicochimiques des échantillons du sol des huit stations sont mentionnés dans le Tableau 10. Où ils nous permettent de tirer les constatations suivantes :

La structure grumeleuse est dominante dans la majorité des sols, avec des textures sableuses équilibrées.

Tableau 10 : Résultats des analyses physico-chimiques du sol

<i>Stations</i>	<b>Station1</b>	<b>Station2</b>	<b>Station3</b>	<b>Station4</b>	<b>Station5</b>	<b>Station6</b>	<b>Station7</b>	<b>Station8</b>
<b>Structure</b>	Grumu- leuse	Grumu- leuse	Grumu- leuse	Grumu- leuse	Poly- édrique	Grumu- leuse	Grumu- leuse	Grumu leuse
<b>Sable</b>	42,03	65,74	61	37,12	51	60,66	51,4	63
<b>Limon</b>	9	7,29	4,1	6,20	3,3	10,4	4,5	4,6
<b>Argile</b>	8,5	10,1	6,9	24,52	7,9	9,47	6	2,7
<b>pH</b>	8,2	7,3	6,3	7,03	6,8	7,27	6,1	7,02
<b>MO</b>	3,31	2,41	11,91	6,04	6,1	2,99	4,1	9,03
<b>Conductivité (ms)</b>	0,11	0,37	0,37	0,24	0,13	0,14	0,11	0,21
<b>Calcaire totale</b>	34,5	32	4,3	4,3	32,09	41	3,44	0,79
<b>Calcaire actif</b>	1,27	2,12	-	-	9,3	4,52	-	-
<b>Taux d'humidité</b>	9,51	9,84	57,65	9,12	19,41	30,42	12,11	8,2

Le pH est légèrement alcalin dans la majorité des échantillons, il dépend des différents cations absorbés, de la nature de la structure végétale ainsi que les conditions climatiques **Djazoz (1982)**, il est lié aussi à la quantité du calcaire présente dans le sol, et dépend de la présence du complexe argilo-humique **Huetz Delemps (1980)**.

Le taux de matière organique est très variable. Il faut noter que la quantité de matière organique dépend de l'âge et du type du groupement, mais aussi de l'abondance des éléments grossiers **Stambouli (2010)**.

Le taux de calcaire total est très hétérogène. Cette teneur est liée à la nature de la roche mère.

Les résultats de la conductivité électrique indiquent des sols non salés dans l'ensemble des échantillons. Le taux des sels solubles dans les sols est en fonction de la profondeur, de la texture, de l'évapotranspiration ainsi que l'humidité du profil, selon **Bendaanoun (1981)**.

Le taux d'humidité est plus important dans les échantillons du sol dans le versant nord en comparaison avec ceux du versant sud, ceci peut être expliqué par l'exposition du versant nord au vent humides venant de la mer qui favorise l'augmentation de la charge en eau dans les sols ; le versant sud est exposé à l'illumination et aux vents chauds ce qui entraîne l'évaporation de l'eau. Ainsi, **Aubert (2003)** a signalé que la teneur en humidité dépend de la nature du sol, de sa richesse en matière organique et de la période de l'emplacement de prélèvement.

### VII.3 Résultats de l'étude de La dissémination

Les taux de germination de chaque groupe sont présentés dans la Figure 29 et qui montre que les graines déféqués ont le pourcentage de germination le plus élevé, (100%), avec une

---

vitesse de germination de 14 jours, puis vient par la suite, les graines traitées par l'acide chlorhydrique, avec un pourcentage de 90% et une vitesse de germination de 16 jours.

En troisième position viennent les graines non traitées à raison de 50% de graines germées et une vitesse de germination de 17 jours.

Quant aux fruits contenant les graines du *Daphne gnidium*, le taux de germination était nul et aucune graine n'a pu germer durant toute la période du test, que ce soit pour les fruits traités par l'acide chlorhydrique ou les graines non traitées.

Il est important de noter que le rôle symbiotique que l'espèce *Passer domesticus a* joué durant cette étude, a permis la levée de dormance embryonnaire et donc le ramollissement des téguments qu'on la considère comme une scarification des téguments des graines du Daphné. Ce traitement est assuré grâce à l'acidité sécrétée par le suc digestif de l'oiseau ; ce qui explique le taux de germination élevé des graines déféquées.

Il est clair que les téguments des graines traitées par l'acide chlorhydrique à 10% étaient scarifiés, permettent donc la levée de dormance embryonnaire, et facilitant ainsi, une germination remarquable.

Par contre les graines qui n'ont subi aucun traitement, ont des téguments non scarifiés empêchant alors, la germination des embryons du Daphné.

Par ailleurs, les fruits du Daphné qui renferment les graines, inhibent leur germination, même ceux qui sont traités par l'acide chlorhydrique. Un tel résultat prouve que le mode de régénération de cette espèce ne se fait que par dissémination et c'est aux oiseaux qui consomment les fruits et rejettent les graines dans la nature, après avoir subi une scarification dans leurs tubes digestifs.

Nos résultats ont été confirmés par d'autres chercheurs qui ont prouvé l'effet du traitement chimique sur la levée de dormance des embryons. Notamment les travaux réalisés par **Izhaki et al. (1995)** qui a travaillé sur l'espèce *Ceratonia siliqua* et ceux réalisés par **Tanaka- Oda et al. (2009)** qui ont montré que le traitement par l'acide sulfurique était l'une des méthodes les plus efficaces pour libérer les graines de la dormance embryonnaire en brisant les téguments imperméable à la pénétration d'eau et d'oxygène de l'espèce *Sabina vulgaris*

De ce fait, le traitement des graines du *Daphne gnidium* avec à l'acide chlorhydrique à une concentration de 10% à la même action que l'acide chlorhydrique sécrété au niveau du suc de

l'estomac des oiseaux. Cela a été aussi prouvé par des chercheurs comme (**Chambers et al., 1999 ; Nicholas 1983** ).

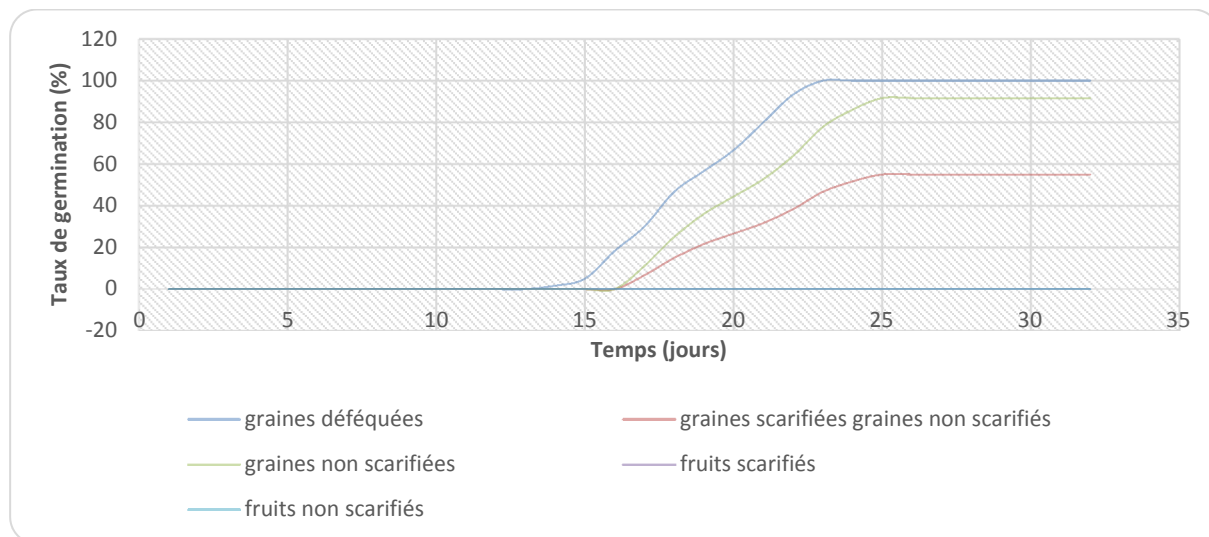


Figure 29 : Le taux de germination des graines et fruits de *Daphne gnidium* L.

#### VII.4 Résultats de l'étude éco-phytochimique

Les résultats de l'impact des facteurs écologiques sur la concentration des composés phénoliques du Daphné sont portés dans le Tableau 11 et les Figure 30, Figure 31 et Figure 32

Tableau 11 : Résultats de l'impact des deux paramètres écologiques sur les concentrations des composés phénoliques extraites des feuilles du *Daphne gnidium* L.

Station	Altitude	Exposition	Phenols totaux (mg eq AG/gEM)	Flavonoïdes totaux (mg eq C/gEM)	Tanins condensés (mg eq C/gEM)
<b>Station 1</b>	793	S	139,31± 0,63	12,31±0,40	2,34±0,09
<b>Station 2</b>	830	S	188,24± 0,2	13,6± 0,01	2,66±0,08
<b>Station 3</b>	850	S	242,33± 00	14,36± 0,01	3,27±0,01
<b>Station 4</b>	1061	S	385,49± 0,84	15,52± 00	3,52± 0,05
<b>Station 5</b>	820	N	162,69± 0,34	11,59± 0,02	2,39±0,02
<b>Station 6</b>	850	N	216,6± 0,4	12,37± 0,02	2,73±0,03
<b>Station 7</b>	865	N	229,27± 0,4	13,24± 0,03	2,79±0,01
<b>Station 8</b>	910	N	253,93± 0,73	13,58± 0,04	3,1±0,03

(EAG : équivalent acide gallique ; EC: équivalent catéchine, EM: extrait méthanolique, N : nord, S : sud )

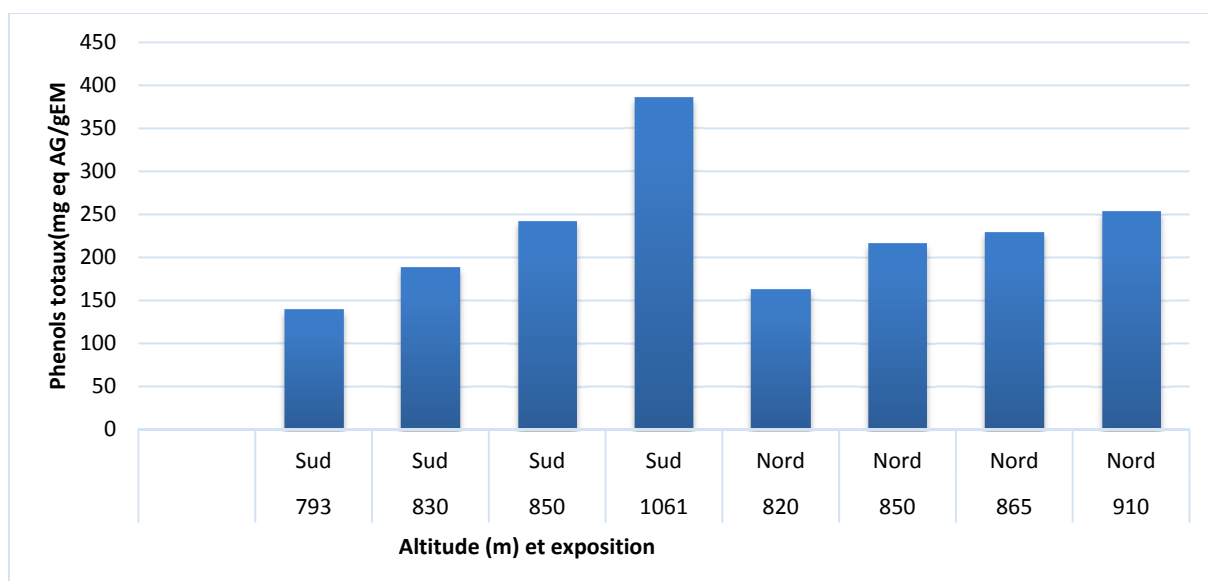


Figure 30: Concentration des phénols totaux des feuilles de *Daphne gnidium* à différentes altitudes dans les deux exposition

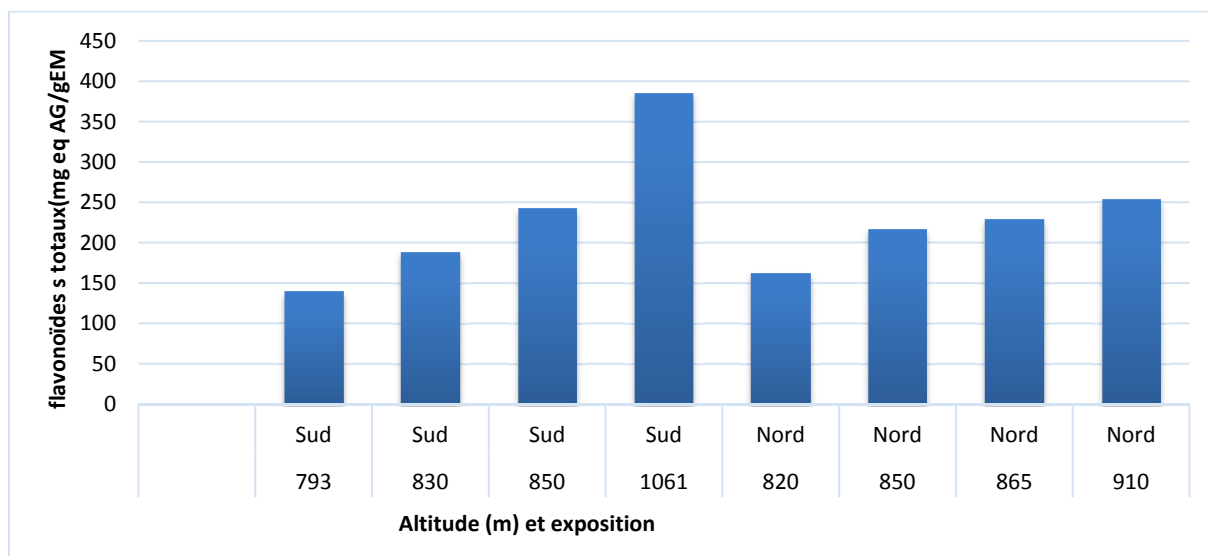


Figure 31: Concentration des flavonoïdes totaux des feuilles de *Daphne gnidium* à différentes altitudes dans les deux exposition

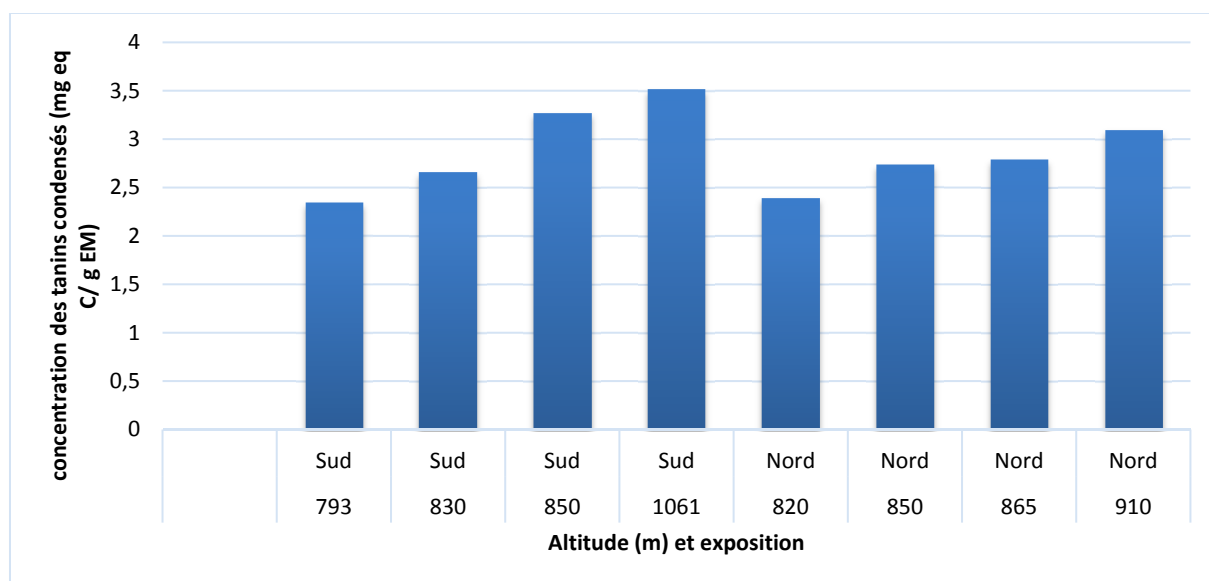


Figure 32: Concentration des Tanins condensés des feuilles de *Daphne gnidium* à différentes altitudes dans les deux exposition

On doit rappeler que l'objectif de cette étude est d'établir une corrélation entre la concentration des composés phénoliques (phénols totaux, les flavonoïdes totaux, les tanins condensés). de l'extrait méthanolique des feuilles du *Daphné* et deux facteurs écologiques (altitude et exposition), sachant que dans les conditions naturelles, les métabolites secondaires sont susceptibles d'être exposés à des multiples paramètres stationnels (Ncube *et al.*, 2012), ce qui a attiré la curiosité de la communauté scientifique (Yang *et al.*, 2009 ; Bonfili *et al.*, 2008). Dans ce contexte ce sont les feuilles laissées sécher à l'ombre (température ambiante) qui sont concernées par cette étude, ainsi que les feuilles fraîches et celles séchées à l'étuve.

En effet, Peu d'études existent sur l'acclimatation à base chimique chez les plantes le long de gradients écologiques liés à l'altitude (Rada *et al.*, 1998 ; Cabrera *et al.*, 1998 ; Ziska *et al.*, 1992). Nos résultats sur le *Daphne gnidium* sont originaux et ont fait l'objet de plusieurs publications internationales.

Les résultats montrent que les phénols totaux sont plus concentrés dans le versant sud, (allant de 139,31 à 385,49 mg E AG/gEM ) que dans le versant nord (allant de 162,69 à 253,93 mgGAE/gEM). Ainsi que pour les flavonoïdes totaux qui enregistrent des valeurs plus remarquables au niveau du versant sud (12,31 à 15,52 mg EC/g EM) qu'au niveau du versant nord (11,59 à 13,58 mg EC /g EM) ; les tanins condensés à leur tour, sont plus concentrés au niveau des individus du *D.gnidium* les individus localisés dans le versant sud (2,34 à 5,52 mg EC /g EM) que les individus du versant nord (2,39 à 3,1 mg EC /g EM).

Par ailleurs, la concentration des composés phénoliques est proportionnelle avec l'altitude ; ainsi, les concentrations des phénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés enregistrent des valeurs maximales dans la station 4 du versant sud à une altitude de 932m. La même remarque a été faite pour le versant nord où on a enregistré les valeurs maximales des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes totaux et les tanins condensés) dans la station 8 qui se trouve à une altitude de 910 m (Figure 30, Figure 31, Figure 32)

Il est à signaler que le versant sud est plus ensoleillé et sec par rapport au versant nord. En fait pour assurer un bénéfice optimal de l'incidence de lumière, les plantes ont développé des mécanismes phytochimiques de protection contre les doses élevées potentiellement dommageables, d'intensités lumineuses extrêmes. En outre, **Alonso-Amelot et al. (2007)** et **Glynn et al. (2004)** ont montré que la réduction de la disponibilité de l'eau et les températures élevées imposent la production intense des composés phénoliques dans les plantes (**Ncube et al., 2012**).

Dans les monts de Tessala, le versant sud, le plus ensoleillé, souffre d'une sécheresse prolongée (plus de 6 mois) et des sols relativement dégradées où prédominent les argiles. Alors que le versant nord bénéficie d'un climat doux grâce à la brise de mer avec son effet d'amortissement ; en été par contre, il y a une faible évaporation, avec des sols relativement équilibrés et des précipitations intéressantes (**Bouزيد, 2012**).

Ces résultats sont illustrés sous forme de figures citées ci-dessous

Pour mettre en valeur les résultats de cette étude, une analyse statistique a été entreprise. Cette analyse permet de savoir si les paramètres mesurés pourraient distinguer les stations étudiées, et quelles sont celles qui contribuent plus à cette distinction, en établissant la corrélation entre les composés phénoliques, l'exposition et l'altitude.

Les analyses factorielles de correspondances sont montrées dans la Figure 33.

il en met deux axes :

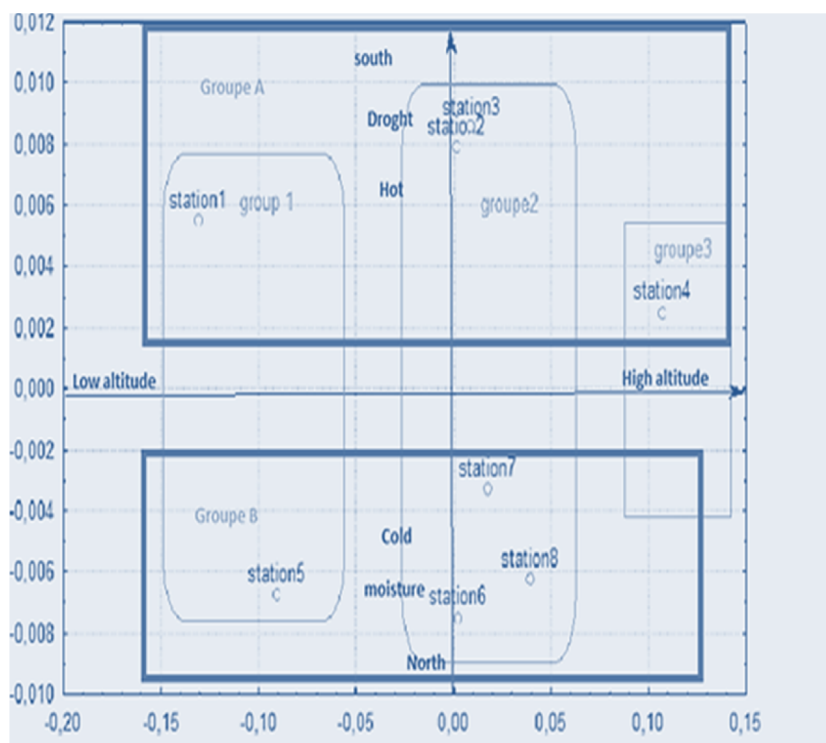


Figure 33: présentation de l'analyse factorielle des correspondances sur la relation entre la concentration en composés phénoliques et les paramètres écologiques

Le premier axe représente l'altitude, tandis que le second représente l'exposition. Les différents groupes sont :

Le groupe 1 comprend les stations (1 et 5), ayant les altitudes les plus basses et par conséquent, les concentrations les moins importantes des composés phénoliques, tandis que le groupe 2 comprend les stations 2, 3, 5, 7 et 8, qui sont caractérisées par une concentration moyenne des composés phénoliques et sont situées à une altitude intermédiaire, et enfin, le groupe 3, qui comprend la station 4 seulement, qui est caractérisé par une forte concentration de composés phénoliques et se trouve à l'altitude la plus élevée de la zone d'étude.

Cependant, si on se réfère à l'axe 2, nous avons deux groupes :

Le groupe A qui présente l'exposition sud caractérisée par l'ensoleillement et la sécheresse.

Le groupe B qui présente l'exposition nord caractérisée par le froid et l'humidité.

De ce fait, l'AFC a souligné que le facteur altitude (axe1, l'inertie = 99 %) a plus d'effet que le facteur exposition (AXE2 ; inertie = 1 %) sur les concentrations des composés phénoliques des feuilles du *D.gnidium*.

En effet, les stations sélectionnées pour cette étude sont situées à des différentes altitudes, ce qui a permis d'avoir des concentrations des composés phénoliques distinctes. L'analyse de

variance a montré que la différence entre les tests est significative (phénols totaux ;  $F = 247784$ , flavonoïdes totaux ;  $F = 2058,46$ , tanins condensés  $F = 788,93$  ;  $F = 2,6571966$  théorique). La concentration de ces composés phénolique est étroitement liée à l'altitude que ce soit pour le versant sud ou le versant nord.

Ce pendant les Figure 37 a-b-cFigure 37 montrent qu'il existe une meilleure corrélation entre les phénols totaux avec  $R^2 = 0,97$ , dans le sud, et  $R^2 = 0,89$ , dans le nord, pour les flavonoïdes totaux un  $R^2 = 0,91$ , dans le sud, et  $R^2 = 0,87$ , dans le nord, et pour les tanins condensés, un  $R^2 = 0,91$ , dans le sud, et  $R^2 = 0,97$ , dans le nord, dans des feuilles de *D. gnidium*.

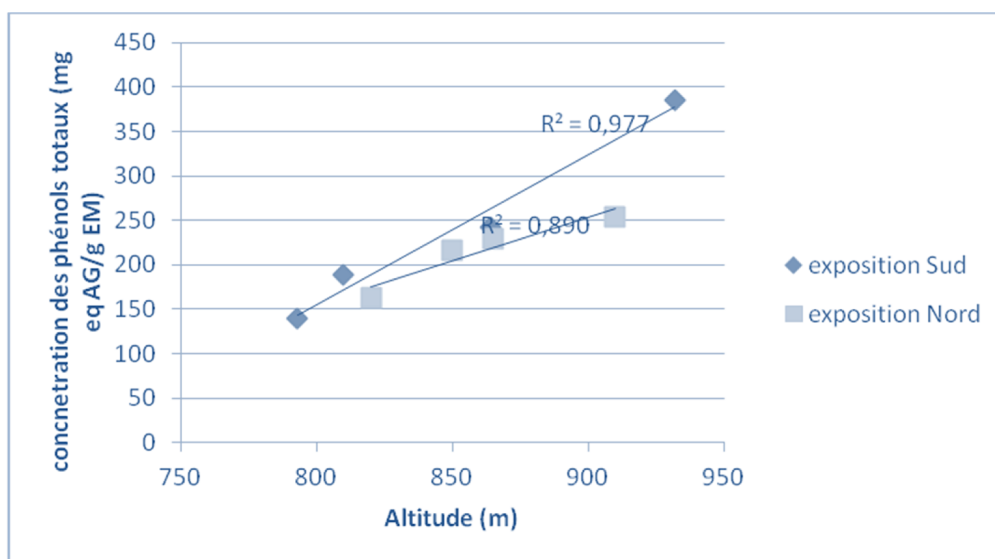


Figure 34-a : la corrélation entre la concentration des phénols totaux avec l'altitude et l'exposition.

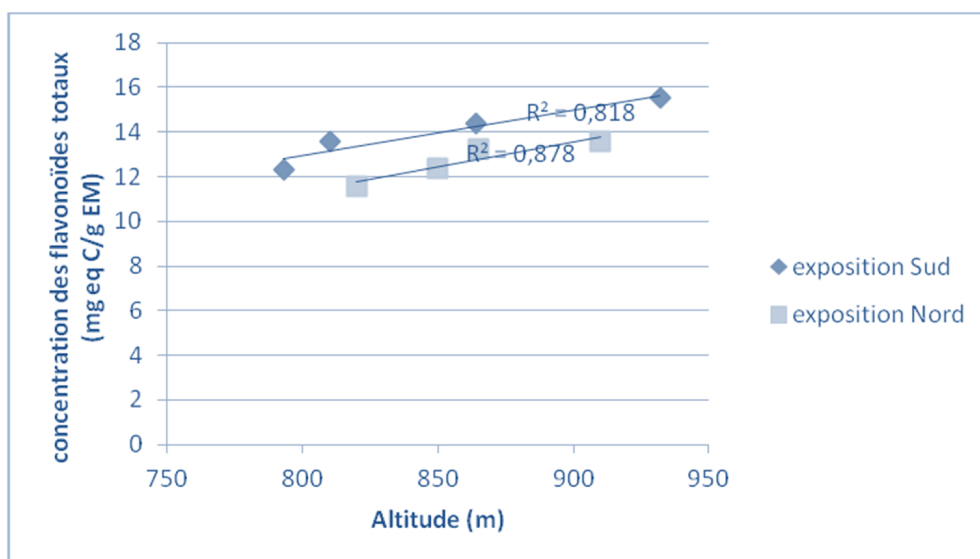


Figure 35-b : la corrélation entre la concentration des flavonoïdes totaux avec l'altitude et l'exposition

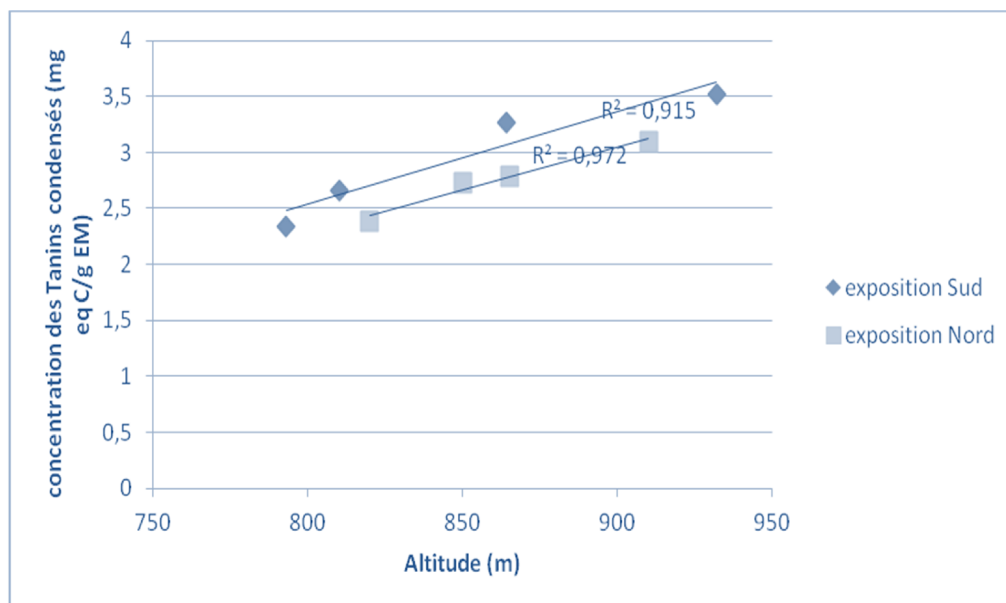


Figure 36-C : la corrélation entre la concentration des tanins condensés avec l'altitude et l'exposition

Figure 37 : corrélation entre les concentration des différents composés phénoliques des feuilles de *Daphne gnidium* L. et l'altitude

Nos résultats ont été confirmés par les travaux de **Zidorn et al. (2001)** qui ont montré, en étudiant les différentes espèces végétales, une bonne corrélation entre l'altitude et la teneur totale des flavonoïdes. En fait, les rayonnements solaires sont indispensables pour la photosynthèse, néanmoins, les plantes développent des mécanismes phytochimiques pour se protéger contre les intensités de lumière extrêmes et contre les radiations élevées potentiellement nocifs du rayonnement UV (**Lumthaler, 1997**).

Par ailleurs, la concentration des composés phénoliques des feuilles fraîches et des feuilles séchées à l'étuve à différentes altitudes, exposition sud, sont aussi déterminées et sont portés dans le Tableau 12 et illustrés dans les figures ci-dessous (Figure 38, Figure 39, Figure 40).

Tableau 12 : Résultats du dosage des composés phénoliques extraits des feuilles fraîches et des feuilles séchées du *Daphne gnidium* par rapport à l'altitude.

	Feuilles fraîches (S, 850m)	Feuilles fraîches (S, 830m)	Feuilles fraîche 1061m	Feuilles sèche (S, 850m)	Feuilles sèche (S, 830m)	Feuilles sèches (1061m)
<b>ME (g/l)</b>	0,09	0,13	0,08	0,08	0,08	0,03
<b>TP(mg eq GA/gmethanolic extract)</b>	228,13±5,26	169,60±0,59	284,11±1,83	310,19±3,02	288,21±5,13	794,61±11,79
<b>TF(mg eq C/g methanolic extract)</b>	40,22±0,00	26,94±0,00	47,44±0,00	139,83±6,04	140,27±0,49	373,19±11,09

*CT(mg eq C/g methanolic extract)*

1,15±0,01	0,67±0,00	1,32±0,01	1,68±0,00	1,59±0,02	5,05±0,05
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Nous constatons que la concentration des composés phénoliques est plus importante au niveau des extraits des feuilles séchées à l'étuve, qu'au niveau des feuilles fraîches, du *Daphne gnidium* et que ces concentrations sont plus intéressantes pour les hautes altitudes que pour les bases altitudes.

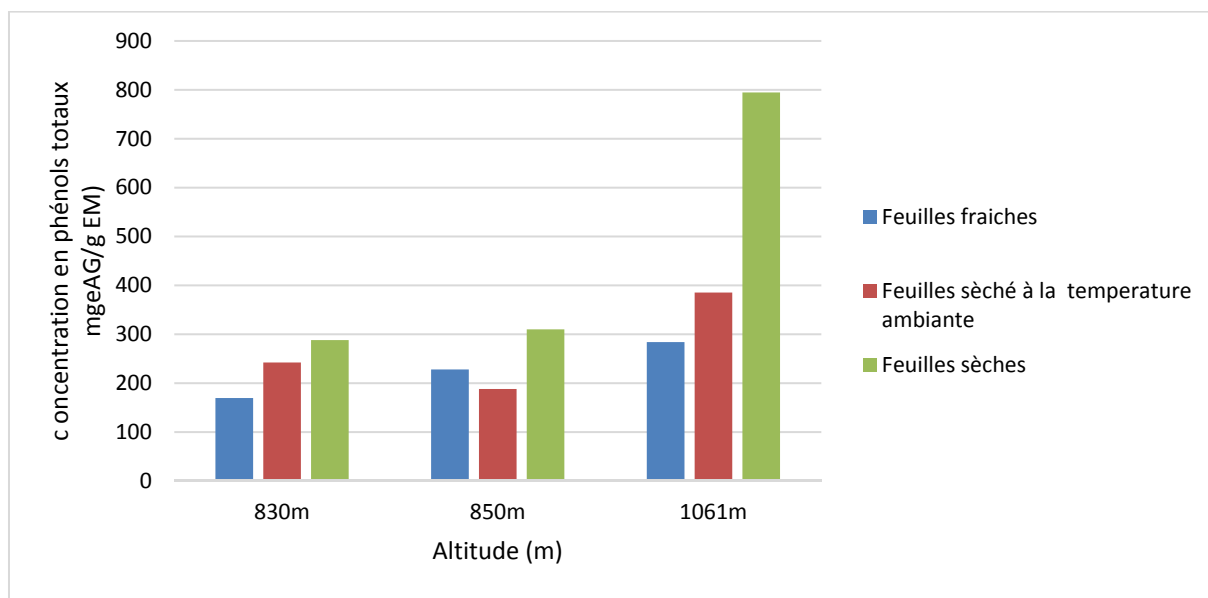


Figure 38: Concentration des phénols totaux du *Daphne gnidium* en fonction de l'état des feuilles et de l'altitude.

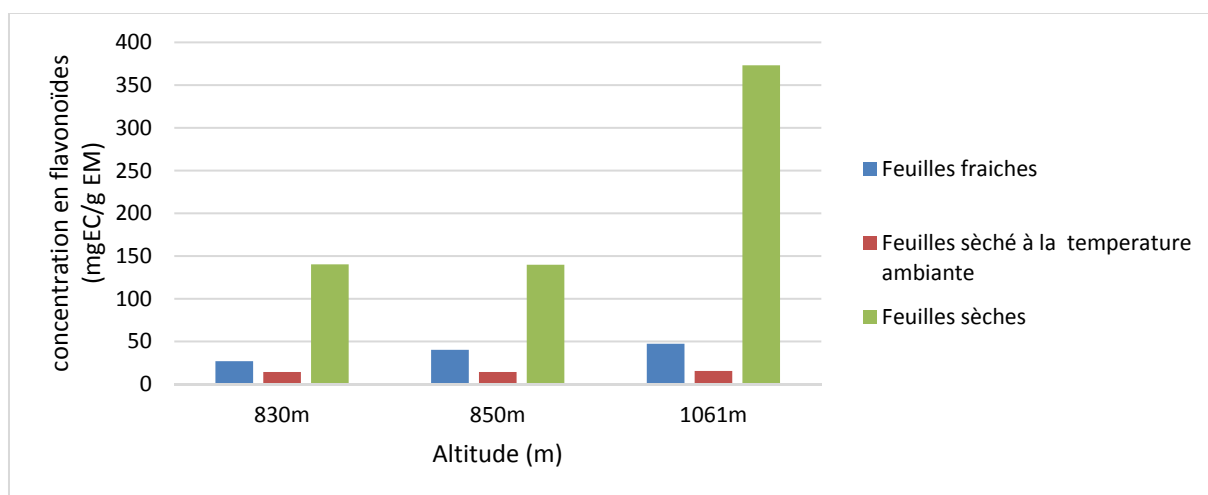


Figure 39: Concentration des flavonoïdes totaux du *Daphne gnidium* en fonction de l'état des feuilles et de l'altitude.

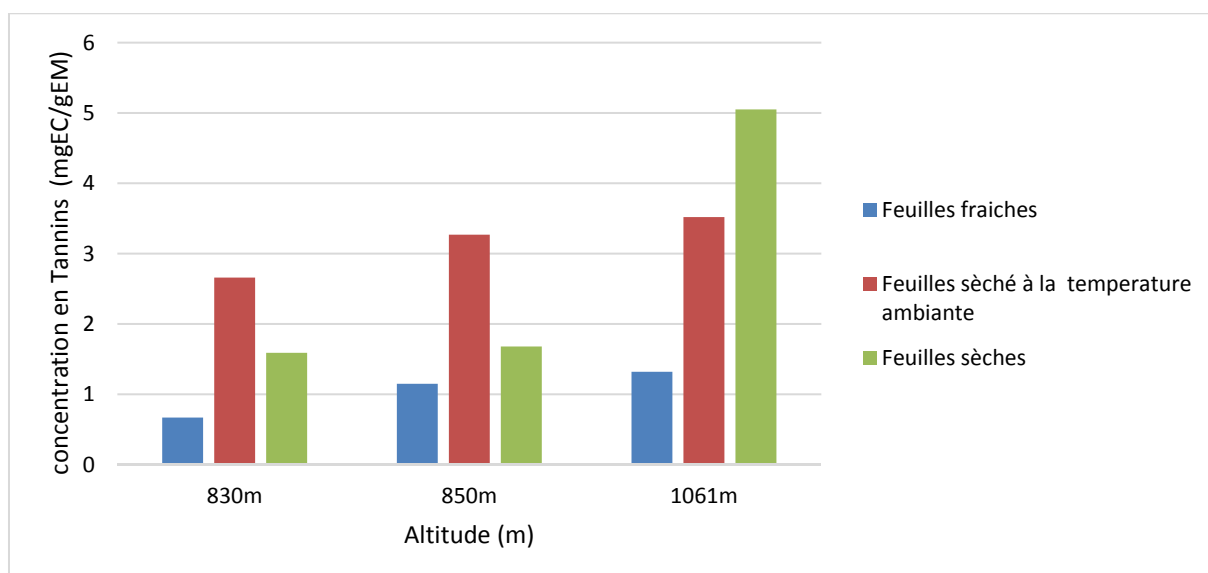


Figure 40: Concentration des tanins condensés du *Daphne gnidium* en fonction de l'état des feuilles et de l'altitude.

Ainsi, les valeurs des phénols totaux les plus remarquables sont enregistrées à 1061m d'altitude à raison de 794,61mgeqGA/g d'EM, suivi par la valeur de 310,19 mgeq GA/g d'EM à 850m d'altitude puis, la valeur de 288,21 mg eqGA/g d'EM à 830m d'altitude.

Par contre, pour les feuilles fraîches, les valeurs sont beaucoup plus basses et la teneur la plus importante enregistrée à 1061 m, n'est que de 284,11 mg eqGA/g d'EM (valeur inférieure à celle enregistrée pour les feuilles séchées à 830m seulement) ; ce taux diminue encore plus à une altitude plus basse (228,13 mgeqGA/g d'EM à 850m et 169,60 mg eqGA/g d'EM à 830m).

Les mêmes constatations ont été faites pour les flavonoïdes totaux extraits des feuilles séchées à l'étuve, qui révèlent une teneur allant de 139,83 mg eqGA/g d'EM à 830 m jusqu'à

---

373,19 mg eqGA/g d'EM à 1061 m. Un taux allant de 26,94 mg eqGA/g d'EM jusqu' à un taux de 47,44 mg eqGA/g d'EM ont été enregistrés pour les feuilles fraîches, respectivement avec l'altitude.

Les tanins totaux marquent aussi, les meilleures concentrations à une altitude de 1061m, que ce soit pour les feuilles fraîches ou pour les feuilles séchées à l'étuve, avec les valeurs de 1,32 mg eqGA/g d'EM et 5,05 mg eqGA/g d'EM, respectivement.

En plus, les résultats du dosage des composés phénoliques obtenus à partir des feuilles du *Daphne gnidium* séchées à la température ambiante, montrent que les teneurs restent toujours inférieures à celles obtenus pour les feuilles séchées à l'étuve mais plus remarquables par rapport à celles des feuilles fraîches.

Un tel résultat permet de déduire qu'il ya une bonne corrélation entre les composés phénoliques extraits des feuilles du *Daphne gnidium* et l'altitude.

En fait, les composés phénoliques sont synthétisés dans les plantes non seulement pour des exigences biologiques et des besoins de la défense évolutive contrôlée (**Bryant et al., 1991**), mais aussi pour la tolérance des stress environnementaux tels que la sécheresse, et le rayonnement électromagnétique (**Ncube et al., 2012**).

De ce fait, l'accentuation des composés phénoliques au niveau des plantes, est une réponse aux mécanismes d'évitement ou de tolérance des différents stress abiotiques, et biotiques. Les mécanismes d'évitement réduisent l'impact d'un stress bien qu'il soit présent dans l'environnement, tels que la sécheresse, les hautes températures, la salinité, le froid et le gel etc. et favorisent entre autre, la synthèse de certains composés phytochimiques pour lutter contre ces stress (**Mazliak, 1986**)

En fin, cette étude d'optimisation nous a permis de mettre en évidence le meilleur procédé méthodologique et la meilleure technique concernant l'état du matériel végétal utilisé dans l'extraction, pour avoir le meilleur rendement en composés phénoliques.

Ce volet a fait l'objet d'une troisième publication.

De même, cette étude d'optimisation a été aussi entamée dans la détermination du pouvoir antioxydant vis-à-vis le radical DPPH, des extraits phénoliques des feuilles du *Daphne gnidium*. Il s'agit, de ce fait, de connaître la capacité antioxydante des extraits méthanoliques des feuilles du *Daphne gnidium* fraîches, séchées à l'étuve et à la température ambiante. Ce pouvoir a été

évalué par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne d'un passage de couleur violette à la couleur jaune à 515 nm.

Les résultats de cette étude sont représentés dans le Tableau 13 et illustrés dans la Figure 41

Tableau 13: Résultats de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques des feuilles fraîches, séchées à l'étuve et séchées à la température ambiante du *Daphne gnidium*

	<b>F-F 830 m</b>	<b>F-F 850m</b>	<b>F-F 1061m</b>	<b>F-S 830m</b>	<b>F-S 850m</b>	<b>F-S 1061m</b>	<b>F-T-A 830m</b>	<b>F-T-A 850m</b>	<b>F-T-A 1061m</b>
<i>EC</i> <sub>50</sub> (mg/ml)	29,31	4,03	17,4	6,22	4,57	0,46	7,05	5,23	1,24

(F-F : Feuille fraîche-F-S : feuille sèche-F-T-A : feuille séché à le température ambiante)

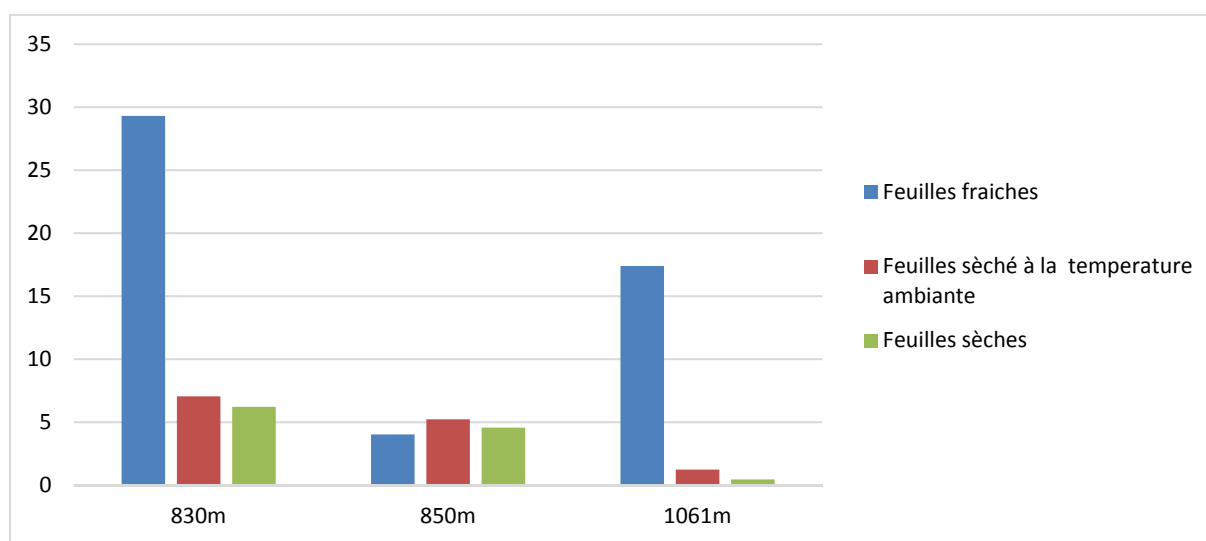


Figure 41: activité antioxydante des extraits méthanoliques évaluée en IC 50 dans les à différentes altitudes

L'activité antioxydante des extraits a été déterminée à partir des IC<sub>50</sub>, qui correspondent à la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH

En fait, il faut noter qu'elle est exprimée en IC<sub>50</sub> qui est inversement proportionnels à la capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour inhiber la concentration en radicaux de 50%.

Cependant, Les résultats indiquent, que la capacité antioxydante des différents extraits méthanoliques des feuilles du *Daphne gnidium* est beaucoup plus intéressante pour les feuilles séchées à l'étuve ou à la température ambiante que celle venant d'être cueillies :

Pour les feuilles séchées à l'étuve, l'activité s'accroît avec l'altitude, en enregistrant les valeurs IC<sub>50</sub> de 0,46 mg/ml à 1061 m d'altitude, 4,57 à une altitude de 850 m puis elle descend à 6,22mg/ml à une altitude de 1061m.

Elle est moins intéressante pour les composés phénoliques extraits des feuilles fraîches des individus du *Daphne* poussant à une altitude de 850 m et qui marque une valeur IC50 de (4,03 mg/ml) ; elle commence à diminuer dès qu'on monte en altitude. Elle enregistre alors la valeur de 17,40 mg/ml à l'altitude de 1061 m.

En parallèle, les résultats du pouvoir antioxydant des composés phénoliques extraits des feuilles séchées à la température ambiante montrent que les valeurs IC50 sont moins importantes par rapport à celle des feuilles séchées à l'étuve. Mais plus intéressante par rapport à celle des feuilles fraîches ; ainsi, on enregistre une valeur de 7,05 mg/ml pour les composés phénoliques isolés des feuilles des individus localisés à une altitude de 830 m et une valeur de 5,23 mg/ml pour ceux localisés à une altitude de 850 m. Cette valeur diminue encore pour atteindre 1,24 mg/ml à une altitude de 1061 m.

Nos résultats montrent, alors, que les composés phénoliques extraits des feuilles du *Daphné* présentent une bonne activité antioxydante, conférant au groupe hydroxyle une capacité remarquable à piéger les radicaux libres.

Ce pouvoir antioxydant est d'autant plus intéressant que les feuilles soient sèches et que les individus du *Daphne gnidium* localisés à haute altitude fournissent les meilleurs résultats, qui sont, de ce fait, en corrélation significative avec les composés phénoliques.

Nos résultats ont été confirmés par certains phytochimistes qui déclarent que les antioxydants sont plus concentrés quand la température est élevée et quand la lumière est assez forte (**Triantaphylidés, 2008 ; Havaux, 1999**)

L'analyse statistique de corrélation a mis en évidence les relations d'association et d'opposition des différentes variables et individus en visualisant le positionnement de chacun.

Cette étude montre effectivement, une bonne corrélation entre les composés phénoliques des feuilles du *Daphne gnidium*, quel que soit leur état (fraîches, séchées à l'étuve ou à la température ambiante) et l'activité antioxydante, avec un coefficient de corrélation, ( $R = 0,764$ ), nous pouvons expliquer cette corrélation par la capacité du groupe hydroxyle à piéger les radicaux libres. Nous rappelons que les antioxydants réagissent dans les mécanismes de réponse des plantes supérieures, au stress abiotique et biotique.

Une bonne corrélation est aussi signalée entre les composés phénoliques des feuilles, et l'altitude avec un  $R = 0,489$ , pour les flavonoïdes,  $R = 0,668$ , pour les phénols totaux et  $R = 0,63$  pour les tanins.

La synthèse des résultats statistiques de la présente étude fait conclure que le rendement des composés phénoliques des feuilles fraîches, séchées à la température ambiante et séchés à l'étuve est en fonction étroite avec l'altitude et les conditions environnementales.

### VII.5 Détermination des composés phénoliques des fleurs du *Daphne gnidium* et de leur pouvoir antioxydant

La quantification des composés phénoliques des fleurs du *Daphne gnidium* (Figure 42) à partir des extraits méthanoliques a révélé un taux aussi bien intéressant que celui des feuilles

En revanche, ce taux est plus remarquable pour les individus localisés dans les hautes altitudes que ceux localisés dans les basses altitudes, avec une teneur de 179mg eq AG/ g extrait, à 1061m et une teneur de 142 mg eq AG/ g extrait, à 830m, pour les phénols totaux.

La même observation a été faite pour les flavonoïdes avec une valeur de 80 mg eq C/ g extrait en 1061m tandis qu'à 830m, elle n'est que de 61 mg /g extrait.

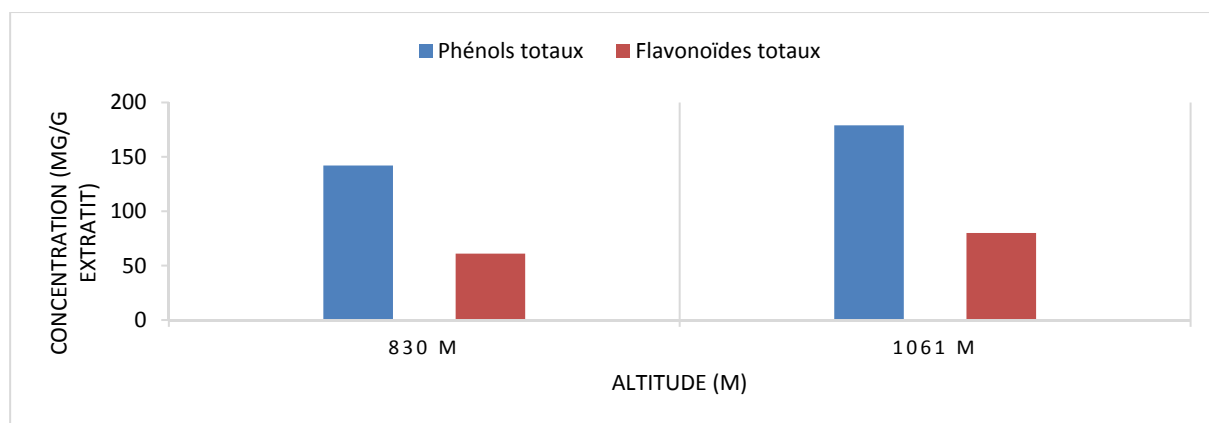


Figure 42: Dosage des composés phénoliques des fleurs de *Daphne gnidium* à deux altitudes : 830 m et 1061 m

Cependant, les résultats de l'activité antioxydante (Figure 43) ont montré que les extraits méthanoliques des fleurs cueillies des individus des hautes altitudes ont un pouvoir antioxydant supérieur (1,12mg/ml) à ceux des bases altitudes (5.92 mg/ml).

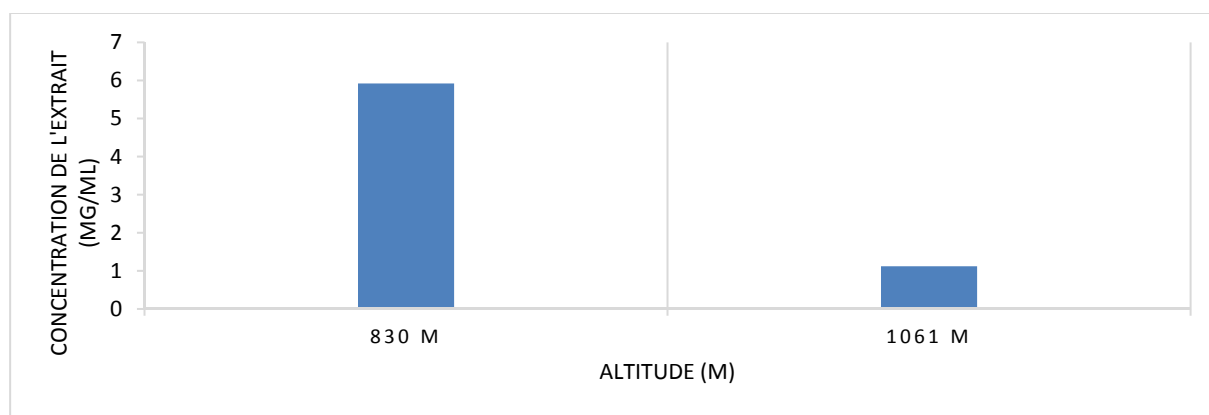


Figure 43: pouvoir antioxydant des composés phénoliques des fleurs de *Daphne gnidium* à 830 m et 1061m d'altitude.

La même constatation a été faite pour les extraits méthanoliques des feuilles étudiés auparavant, qui indique que l'activité antioxydante augmente avec l'altitude.

Nous devons noter que les travaux antérieurs réalisés sur le *Daphne gnidium* n'ont jamais entamé le volet phytochimique ou le volet de valorisation de cet organe, c'est surtout le volet histologique qui a fait l'objet de pas mal d'études, surtout les travaux de **Roccotiello et al. (2009)**.

En effet, ce travail de valorisation de la fleur du *Daphne gnidium* a mérité d'être publié et a fait l'objet d'une publication internationale.

## VII.6 Résultats de l'extraction des flavonoïdes au niveau des tige et caractérisation de leur profil chimique

Dans la continuité des travaux menés sur le potentiel phytochimiques de l'espèce choisie pour cette étude, nous avons privilégié la caractérisation chimique des flavonoïdes, en utilisant la méthode de chromatographie HPLC et la méthode RMN  $^{13}\text{C}$ , pour l'identification de ses composés. Afin d'identifier un plus grand nombre de composés, nous avons procédé au fractionnement des flavonoïdes puis l'analyse des fractions.

### VII.6.1 Extraction des flavonoïdes des tiges de *Daphne gnidium*

Le procédé d'extraction des flavonoïdes des tiges de *Daphne gnidium* a adopté la méthode de fractionnement, en utilisant la méthode des solvants à polarité décroissante, pour obtenir à la fin, quatre fractions : la fraction chloroformique, celle de l'acétat d'étylique, du N-butanol, et la fraction de l'eau (extrait aqueux).

Les résultats du dosage quantitatif des différents composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes) à partir du fractionnement sont portés sur le Tableau 14

Tableau 14 : Résultats du dosage des phénol totaux, des flavonoïdes des différents extraits des tiges de *Daphne gnidium* L

	Phénols totaux (mgAGE/g extrait)	Flavonoïdes totaux (mgCE/g extrait)
Extrait de l'acétate d'éthyle	29,14±0,92	5,92±0,12
Extrait de l'eau	27,31±0,17	5,46±0,43
Extrait de chloroforme	26,22±0,62	5,12±0,35
Extrait de N-butanol	32,21±0,42	6,19±0,62

Le dosage en composés phénoliques a révélé une richesse au niveau de chaque fraction classée par ordre décroissant : L'extrait d'acétate d'éthyle > l'extrait de N- butanol > l'extrait de chloroforme > extrait aqueux.

### VII.6.2 Identification et caractérisation du profil chimique des extraits flavonoïdique de la tige du *Daphne gnidium*

L'analyse des flavonoïdes par HPLC a été réalisée sur les quatre fractions. Ainsi, le spectre de chaque composé est enregistré et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés standards utilisés dans cette étude, il s'agit de la Naringine, l'Apigénine, la Taxifoline, la Catéchine et la Fisetine (Figure 44).

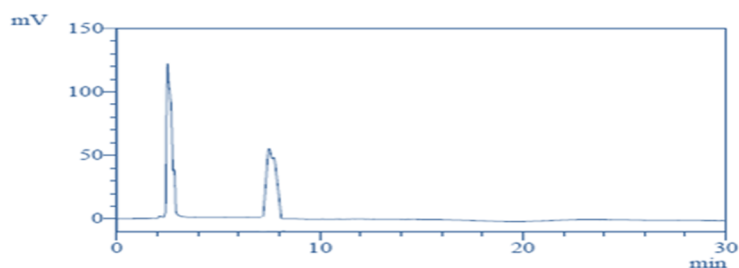


Figure 41-a

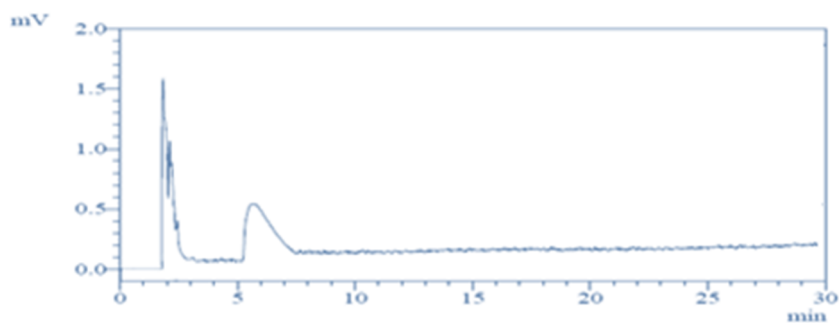


Figure 41-b

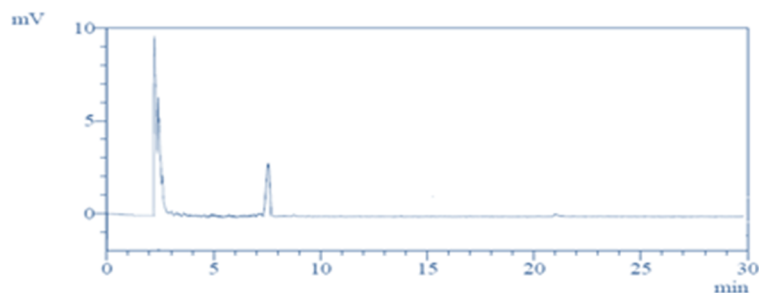


Figure 41-c

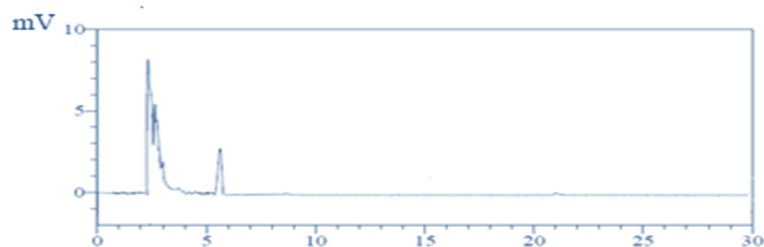


Figure 41-d

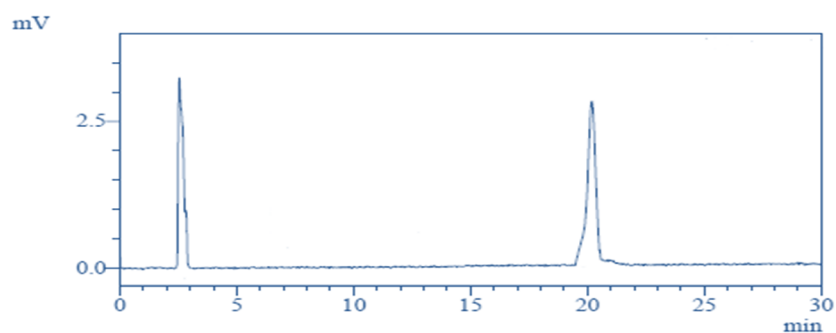


Figure 41-e

Figure 44: -a : Le spectre de l' HPLC de catéchine-b : Le spectre de l' HPLC de Naringin  
 -c : Le spectre de l' HPLC de Taxifoline-d Le spectre de l' HPLC de Apigenin –e : Le spectre  
 de l' HPLC de Fisetin

Nous avons identifié, alors, cinq composés dans les différentes fractions, la fraction du chloroforme, d'acétyl méthyl et du N-butanol en quantité appréciable (Tableau 15).

Tableau 15 : composés identifiés dans les différentes fractions flavonoïques du *Daphne gnidium* par HPLC

<i>Extrait</i>	Flavonoids
<b><i>Chloroforme</i></b>	Naringin- apeginin –taxifolin
<b><i>N butanol</i></b>	Naringin- Fisetine
<b><i>acetate d'éthyle</i></b>	Naringin-Apigenin-Taxifolin-Cathechin

Nous avons reproduit sur les Figure 45, Figure 46, Figure 47 les spectres du chromatogramme de cette analyse HPLC.

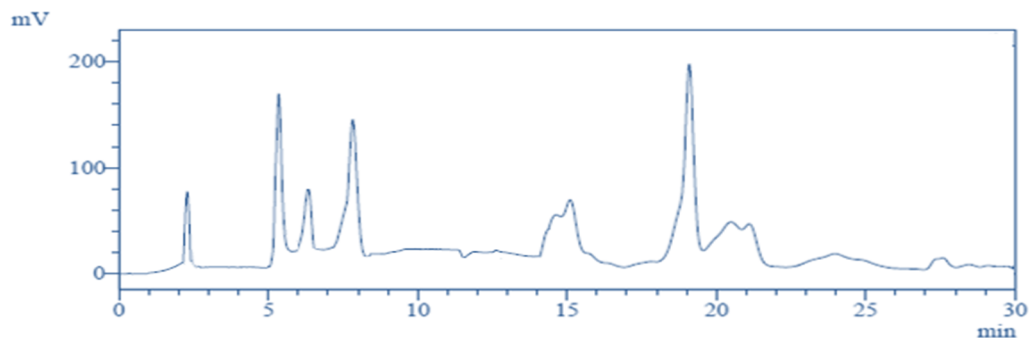


Figure 45: Le spectre d'HPLC de la fraction du chloroforme de la tige de *Daphne gnidium*

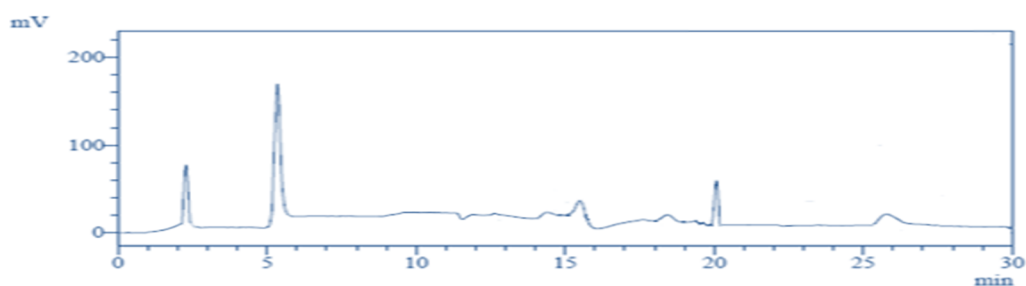


Figure 46: Le spectre d'HPLC de la fraction de n-butanol de la tige de *Daphne gnidium*

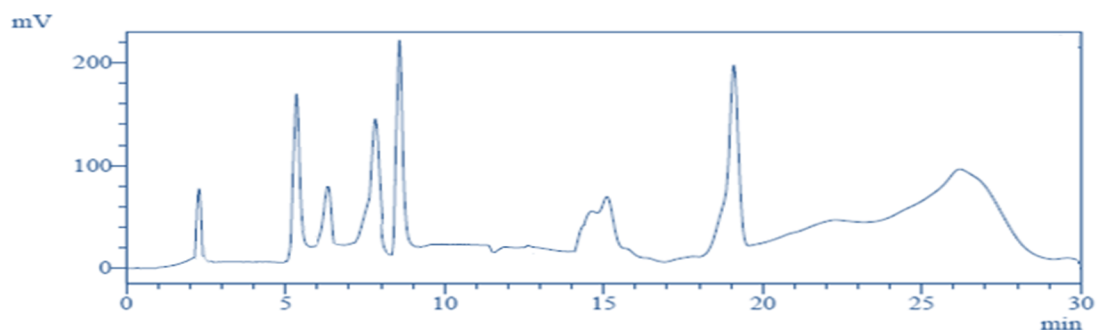
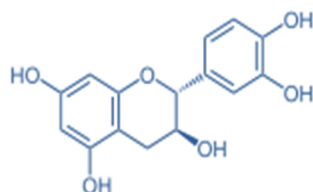
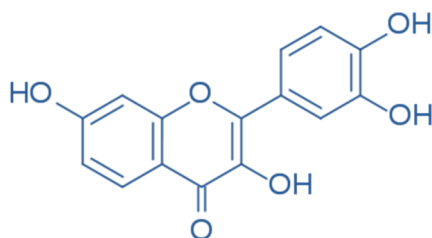


Figure 47: Le spectre d'HPLC de la fraction de l'acétate d'éthyle de la tige de *Daphne gnidium*

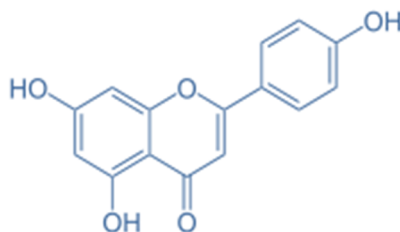
les structures des molécules identifiées sont représentées dans la Figure 48 ci-dessous:



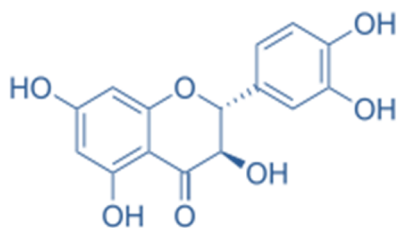
**Catechin** -2-(3,4-dihydroxyphenyl) chromane-3,5,7-triol



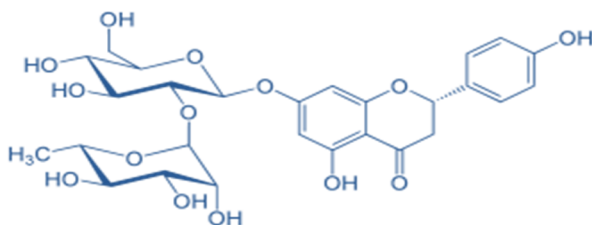
**Fisetine** : 3,3',4',7-tétrahydroxy-2-phénylchromèn-4-one



**Apigénin** : 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4H-1-benzopyran-4-one



**Taxifolin** : 3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phénylchromén-4-one



**Naringin** :-O-(6-Deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl [oxy]-2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphényl)-4H-1-benzopyran-4-one

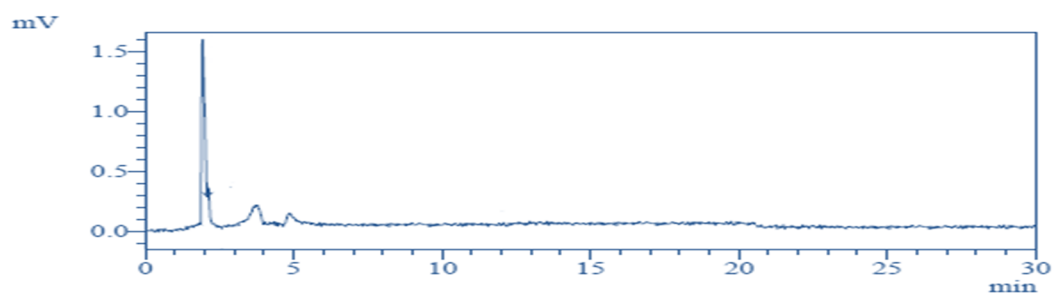
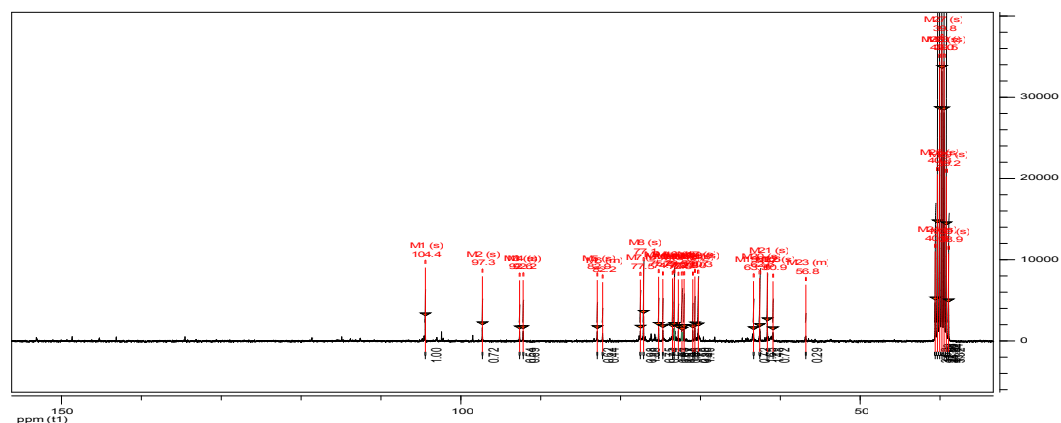
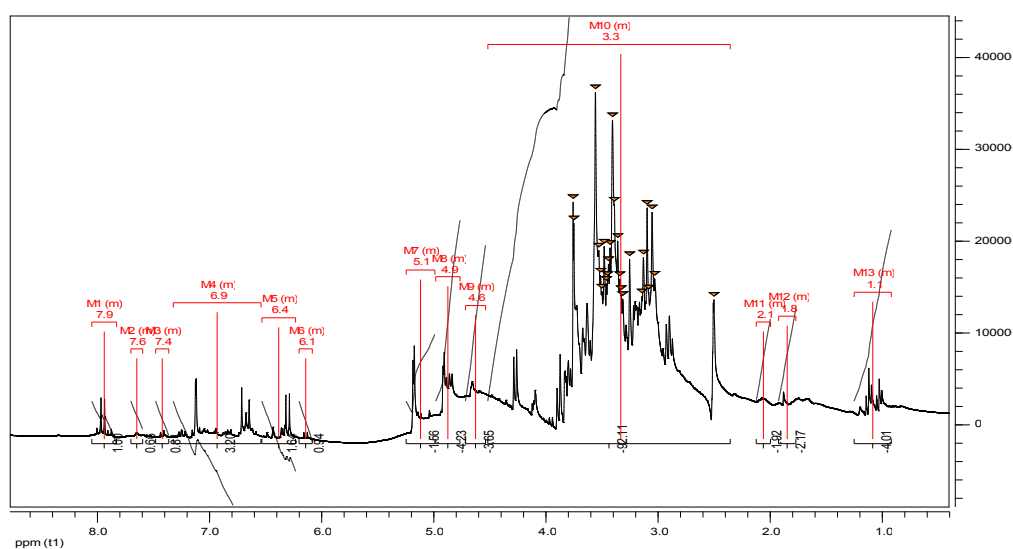
Figure 48: structures des molécules identifiées dans les différentes fractions de la tige de *Daphne gnidium*

Au niveau de la fraction aqueuse, un seul spectre (Figure 49) est indiqué mais, qui ne correspond à aucun des standards utilisés dans cette étude d'identification ; la structure de cette molécule indéterminée a été identifiée à l'aide de la méthode RMN H1, C13 et H1-H1.

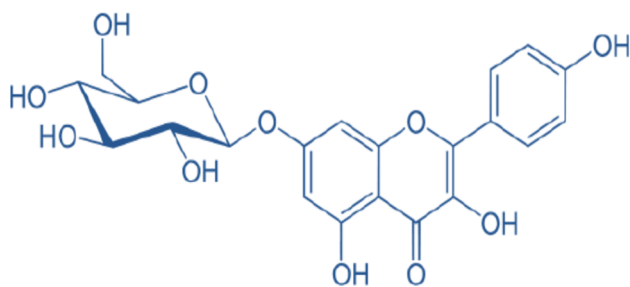
Il s'agit de de la molécule de Kampferole (Tableau 16,Figure 52)

Tableau 16 : Les bandes RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  utilisées pour l'identification du composé de l'extrait aqueux de *Daphne gnidium* L.

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
<b>2</b>	<b>5.14 d</b>	<b>76.12</b>
<b>3</b>	<b>5.12 d</b>	<b>127.76</b>
<b>4</b>		<b>92.64</b>
<b>5</b>	<b>6.29</b>	<b>112.59</b>
<b>6</b>	<b>6.32</b>	<b>129.26</b>
<b>7</b>	<b>6.71 d</b>	<b>157.49</b>
<b>8</b>	<b>7.12 d</b>	<b>121.85</b>
<b>9</b>	<b>7.13</b>	<b>157.49</b>
<b>10</b>		<b>125.82</b>
<b>1'</b>		<b>150.70</b>
<b>2'</b>	<b>6.70</b>	<b>118.66</b>
<b>3'</b>		<b>145.25</b>
<b>4'</b>	<b>7.15 d</b>	<b>153.13</b>
<b>5'</b>	<b>6.70 d</b>	<b>134.53</b>
<b>6'</b>		<b>143.13</b>
<b>C=O</b>		<b>158.57</b>
<b>Glucose</b>		
<b>1</b>	<b>3.70</b>	<b>74.70</b>
<b>2</b>	<b>3.14</b>	<b>72.04</b>
<b>3</b>	<b>3.62</b>	<b>73.49</b>
<b>4</b>	<b>3.83</b>	<b>62.57</b>
<b>5</b>	<b>3.14</b>	<b>70.25</b>
<b>6</b>	<b>3.78</b>	<b>61.61</b>

Figure 49: le spectre d'HPLC de la fraction aqueuse de la tige de *Daphne gnidium*Figure 50: Le spectre RMN C13 de la fraction aqueuse des tiges de *Daphne gnidium*Figure 51: Le spectre RMN H1 de la fraction aqueuse des tiges de *Daphne gnidium*

Nous avons reproduit sur les figures suivantes le spectre (Figure 50, Figure 51) RMN C13, H1 de la fraction aqueuse et la structure de la seule molécule qu'elle renferme (, Figure 52).



**Kaempferol 7-O-glucoside**

Figure 52: structure de la molécule de Kaempferol

En revanche, les travaux réalisés, par le chercheur **Deiana et al. (2003)**, sur la caractérisation des flavonoïdes des tiges du *Daphne gnidium* de la région d'Italie ont révélé neuf molécules de flavonoïdes (l'apigénine, la luteoline, la quercétine, orientine, l'isoorientine, la luteoline 7-O-glucoside, l'apigénine 7-O-glucoside, la genkwanine, la 5-O-β-D-primeverosylgenkwanine, et enfin la α-tocophérolwère).

Nous constatons alors, que les molécules identifiées dans nos échantillons originaire des monts de Tessala ne sont pas les mêmes que ceux identifiés par **Deiana et al. (2003)**.

Cette différence peut être expliquée par les différences des origines géographiques ou par les méthodes d'extraction utilisées, ou encore par la période de récolte du matériel végétal.

En fait, **Richter (1993)** a signalé que la teneur et la composition chimique des différents métabolites secondaires varient en fonction d'un grand nombre de paramètres d'origine extrinsèque et intrinsèque et d'ordre technologique. De ce fait, les facteurs extrinsèques touchent particulièrement l'origine géographique et les conditions écologiques (climat et sol).

### VII.6.3 Détermination de l'activité antioxydante des extraits flavonoïques des tiges du *Daphne gnidium*

Nous rappelons que l'activité antioxydante des extraits est déterminée à partir des IC<sub>50</sub>, qui correspondent à la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH

Ainsi, l'activité antioxydante des fractions flavonoïques a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle présente le pouvoir le plus intéressant, par rapport aux autres fractions, en enregistrant une valeur de (0,09±0,002mg/m.); il est moins remarquable dans l'extrait N- butanolique avec une valeur de IC<sub>50</sub> de (0,1±0,007 mg/ml ), une valeur de 0,116±0,004 mg/ml pour l'extrait chloroformique et 0,122±0,003 pour l'extrait l'aqueux.

En comparant nos résultats avec le témoin d'acide ascorbique ( $IC_{50} = 0,11 \text{ mg/ml}$ ), nous constatons que toutes les fractions ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui-ci à l'exception de la phase aqueuse qui représente un activité légèrement inférieure (Figure 53).

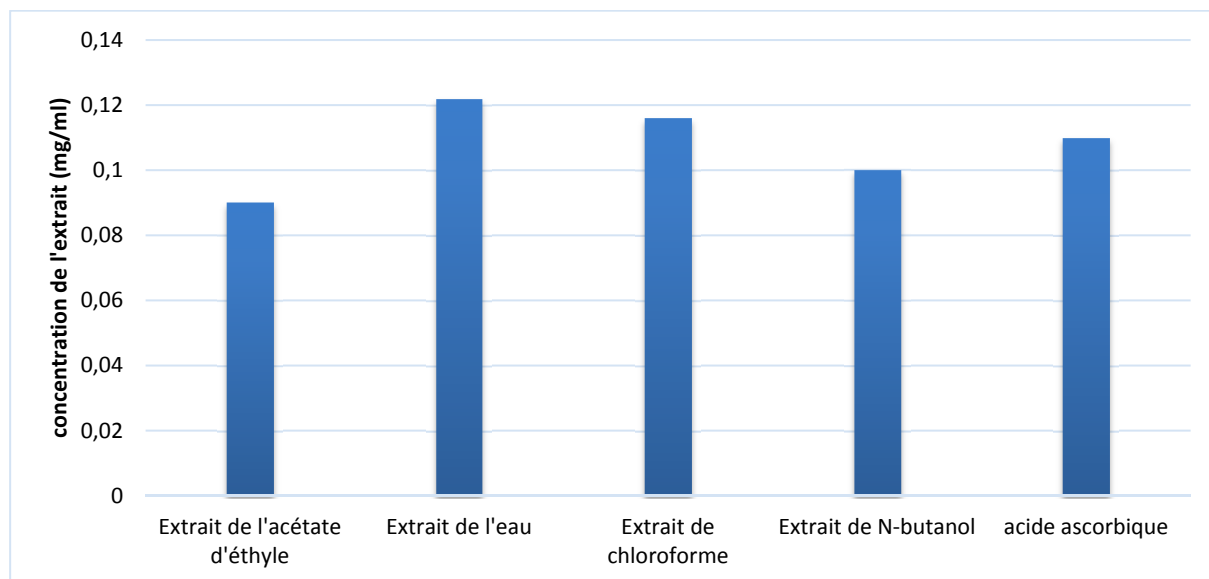


Figure 53 : activité antioxydante des différentes fractions des tiges de *Daphne gnidium* évaluées en  $IC_{50}$

Ainsi, le pouvoir antioxydant remarquable des flavonoïdes extraits des tiges de *Daphne gnidium* originaire de l'Algérie, fait de cette espèce un remède potentiel pour lutter contre les maladies où le stress oxydatif est impliqué.

## Conclusion générale

Le présent travail a porté sur l'étude de l'espèce *Daphne gnidium* L. dans les monts de Tessala.

L'enquête ethnobotanique dans la région d'étude sur les plus célèbres plantes médicinales a révélé l'efficacité de leurs utilisations contre plusieurs maladies et nous a fait sortir un manque des données sur le plan écologique de l'espèce *Daphne gnidium* L. qui est connue de son utilisation traditionnelle dans la région

L'inventaire floristique effectué a permis de recenser 46 espèces appartenant à 23 familles botaniques réparties sur 5 types biologiques avec les thérophytes et les hémicryptophytes en premier lieu et 16 origines biogéographique dont le type Méditerranéen est le dominant.

L'étude de l'habitat de *Daphne gnidium* L. dans les monts de Tessala a mis en relief la plante comme étant une espèce caractéristique des garrigues à *Calycotome spinosa* Link, et à *Chamaerops humilis* L. qui est un matoral dégradé influencé par l'activité anthropique.

L'étude de l'origine de dissémination de cette plante nous a permis de conclure que *Daphne gnidium* L est une plante ornithochore, démontrée par le rôle d'ingestion chez l'oiseau *Passer domesticus* sur la germination des graines.

L'étude éco-phytochimique a mis en évidence une bonne corrélation entre la teneur des phénols totaux, des flavonoïdes totaux, des tanins condensés et le pouvoir antioxydant des feuilles de *Daphne gnidium* L., avec l'altitude et que les Composés phénoliques sont plus concentrés en exposition sud en raison de la forte intensité lumineuse.

L'étude phytochimique des flavonoïdes isolés a révélé cinq nouvelles molécules : quatre par HPLC : la Naringine, l'Apigénine, la Taxifoline, la Catéchine et une molécule par RMN : la Kaempferol 7-O-glucoside.

En revanche il est indispensable à signaler que c'est la première fois que ces 5 molécules sont isolées de l'espèce *Daphne gnidium* L qui lui confère une forte activité antioxydante. Par conséquent, *Daphne gnidium* peut avoir une grande importance dans la prévention et les traitements des maladies dans lesquelles les radicaux libres et les oxydants sont impliqués.

Ainsi le dosage des composés phénoliques des fleurs et l'évaluation de leur activité antioxydante révèle que ce nouveau organe peut être exploité en pharmacognosie par rapport aux valeurs importantes trouvées.

Nous souhaitons que d'autres plantes médicinales de la région soient valorisées en suivant la même approche utilisée dans cette étude.

En perspective, nous espérons entamer le volet toxicologique déterminant la dose minimale bioactive non toxique, ainsi que d'autres activités biologiques du *Daphne gnidium*, notamment l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire.

D'autre part, nous désirons aussi dans le cadre de l'étude écologique, élargir la zone d'étude pour réaliser d'autres relevés floristique qui sont importants pour mieux comprendre l'autoécologie et l'association de cette plante, un manque dans les bases de données de la phytosociologie de cette plante peut être complété surtout au niveau national

Nous visons aussi entreprendre le volet biotechnologique de l'espèce en utilisant la culture *in vitro* pour sélectionner une lignée non toxiques et spécifique aux molécules qu'on veut extraire et cela rentre dans le cadre de la valorisation des substances bioactives naturelles de cette espèce.

Enfin l'approche multidisciplinaire entamée dans ce travail de recherche, écologie, éco-phytochimie, phytochimie et étude de l'activité biologique, approuve l'usage traditionnel de cette plante et révèle son intérêt dans le cadre d'une exploitation en pharmacie dans un contexte d'un développement durable. Nous proposons de ce fait la domestication de cette espèce spontanée et sa culture dans des champs pour un usage industriel.

## Références bibliographiques

1. A.N.A.T. (1997). Plan directeur d'aménagement et d'urbanisme du groupement des communes de Sidi Bel Abbes.
2. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci* , 196, 67–76.
3. Aidoud, A. (1983). *Contribution à l'étude des écosystèmes steppiques du sud Oranais. Phytomasse, productivité primaire et application pastorales*. Thèse de doctorat. Université des sciences et technologies Houari Boumedién (Alger).
4. Aksoy, L. , Kolay, E., Agilunu, Y., Aslan, Z & Kargıog, M. (2013). Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi Journal of Biological Sciences* , 20, 235–239.
5. Alcaraz, C. (1980). *La végétation de l'Ouest algérien*. Thèse de doctorat d'État. Université de Perpignan.
6. Allain, P. (1996). *Pharmacologie : les médicaments* (éd. ESTEM).
7. Alonso-Amelot, M., Oliveros-Bastidas, A., & Calcagno-Pisarelli, M. (2007). Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to sunlight exposure, elevation and rain regime. *Biochemical Systematics and Ecology* , 35, 1-10.
8. Amadou, D. (2005). *Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygium guineense willd. (myrtaceae)*. Thèse de doctorat. Université de Bamako.
9. Aubert, G. (2003). *Biodiversité et processus écologique à l'interface sol-végétation dans les hêtraie sur limon de haute Normandie*. . thèse de Doctorat. Université de Rouen.
10. Awika, J., & Rooney, L. (2004). Sorghum phytochemicals and their impact on human health. *Phytochemistry* , 65, 1199-1221.
11. B.N.E.D.E.R. (1990). Etude d'aménagement et de développement des zones de montagne de la wilaya de Sidi Bel Abbés : perspectives de développement des exploitations agricoles zone nord. Rapport.

12. Bachir Bouiadjra, S., EL Zerey, W., & Benabdeli, K. (2011). Étude diachronique des changements du couvert végétal dans un écosystème montagneux par télédétection spatiale : cas des monts du Tessala (Algérie occidentale). *Physio-Géo (Géographie Physique et Environnement)* , 5, 211-225.
13. Baize, D. (1988). *Guide des analyses courantes en pédologie* (éd. INRA). Paris.
14. Baraka, D. (2008). *Baraka DInventaire des plantes médicinales dans les monts du Tessala*. Mémoire de Magister, Université de Tlemcen.
15. Belaiche, P. (1979) *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*, tome I, Ed. Maloine.
16. Bellakhdar, J . (1997) *La pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Ibis Press, France.
17. Benabadji, N& Bouazza, N. l'impact de l'homme sur la forêt dans la région de Tlemcen. *For. Médi* , 22, 22 269-274.
18. Benabdeli, K. (1983). *Mise en point d'une méthodologie d'appréciation de l'action anthropozoogène sur la végétation de la région de Télagh( Algérie)*. . Thèse de doctorat.3ème cycle. Aix-Marseille.
19. Benabdeli, K. (1996). *Aspects physionomico-structural et dynamique des écosystèmes forestiers face à la pression anthropozoogène dans les Monts de Tlemcen et les Monts de Daya Algérie septentrionale occidentale*. Thèse de Doctorat d'État, Université Djilali liabes (Sidi Bel Abbes ).
20. BenAbdellah, M. A., Amrani S.M., Elhaitoum A & Ollier, S. (2010) Analyse phytoécologique des groupements à thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) et à chêne vert (*Quercus rotundifolia* Lam.) dans les monts de Tlemcen (Algérie occidentale). (*ecologia mediterranea*). 36,no. 2 :99-115.
21. BenAbdellah, M. A., S.M, A., A, E., & Ollier, S. (2010). Analyse phytoécologique des groupements à thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) et à chêne vert (*Quercus rotundifolia* Lam.) dans les monts de Tlemcen (Algérie occidentale). *ecologia mediterranea* , 36 (2), 99-115.
22. Bendaanoun, M. (1981). *Etude cynécologique et dynamique de la végétation halophile et hydro-halophile de l'estuaire de Bou-Reg Reg( atlantique Maroc)*. *Application et*

- perspective d'aménagement*. Thèse de Doctorat. Université de St Jérôme. Aix-Marseille III.
23. Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C., & Leyser, O. (2006). The Ara-bidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr. Bio*, 16, 553–563.
24. Benyahia, M., Benabdeli, K & Moueddene K.(2001) Géologie, pédologie et système de production dans les monts de Tessala (Sidi Bel Abbés). *Ecosystème*, 1, 70-75
25. Berche, P., Gaillard, J., & Simonet, M. (1986). *Bactériologie: bactéries des infections humaines*. Médecine-Sciences Flammarion.
26. Bewley, J.D.& Black, M. (1994) *Seeds: physiology of development and germination*, 2nd edn. Plenum Press, New York.
27. Boissenin, M., Gomez, S., Barre, N., Chambrey, C & Tassin, J.( 2006) Interactions entre l'avifaune frugivore et la flore ligneuse en forêt sèche de Nouvelle-Calédonie. Institut Agronomique néo-Calédonien
28. Boizot, J., & Charpentier, N. (2006). *Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougier*. Le cahier des Techniques de l'Inra.
29. Bonfili, L., Cecarini, V., Amici, M., Cuccioloni, M., Angeletti, M & Keller, J. (2008). Natural polyphenols as proteasome modulators and their role as anti-cancer compounds. *FEBS. J*, 275, 5512-5526.
30. Bonin, G., & Taton, T. (1990). réflexion sur l'apport sur l'analyse factorielle des correspondances dans l'étude des communautés végétales et leurs environnements. *Ecologia Mediterranea*, 403-414.
31. Boubaker, A., Kayouli, C., & Buldgen, A. (2001). Composition chimique et teneur en composés phénoliques des espèces arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. *Options Méditerranéennes, CIHEAM*, 315-317.
32. Boudiaf, K. (2006). *Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de Nigella sativa*. Mémoire de Magister. Université de Sétif.

33. Boudjellal., k. (2009). *Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'Elaeagnus angustifolia L.* Mémoire de Magister.Universite -el hadj lakhder –Batna.
34. Bouhadjera, k. (2005). *Contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes Oudneya africana r.br. et Aristida pungens L.* Thèse de Doctorat.Université de Abubaker Belkaid (Tlemecen).
35. Bouklikha, M.(2001). Essai d'améliorations édaphiques des sols argileux pour une
36. Bouterfas, K. (2011). *Etude de Marrubium vulgare L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) autoécologie, histologie, quantification de quelques polyphénols et évaluation du pouvoir antimicrobien des flavonoïdes.* Mémoire de Magister.Université de Djilali Liabes (Sidi Bel Abbess).
37. Bouzid, K. (2012). Contribution à l'étude de Fritillaria oranensis Pomel dans les Monts de Tessala (Algérie Occidentale) : habitat écologique et rareté. Mémoire de Master, Université Djilali Liabès, Sidi Bel Abbès.
38. Bouzid, W. (2009). *Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de crataegus monogyna jacq* (éd. Universite -El hadj Lakhder). Mémoire de Magister.Universite -El hadj Lakhder.
39. Bouzidi, M., Latrèche, A., Attaoui, I., Mehdadi, Z., & Benyahia, M. (2009). Caractérisation des matorrals et des garrigues à Urginea pancration Phil. dans le Djebel Tessala (Algérie occidentale). *Physio-Géo(Géographie Physique et Environnement)* , 3, 131-149.
40. Brown, J. A. 1980. Review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds.*Mutat. Res.*75, 243–277.
41. Bruneton, J. (1987). *Éléments de Phytochimie et de Pharmacognosie.* Techniques et Documentation-Lavoisier, Paris.
42. Bruneton, J. (1999). *pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales* (éd. Edition Médicinales internationales). paris.
43. Bruneton, J. (2005). *Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux.* Lavoisier, Paris, 3ème édition.
44. Bryant, J.P., Chapin III, F.S., Klein, D.R., (1983) *Oikos* 40, 357–368.

45. Cabrera, H.M., Rada, F. & Cavieres, L. (1998). Effects of temperature on photosynthesis of two morphologically contrasting plant species along an altitudinal gradient in the tropical high Andes. *Oecologia*, 114, 145-152.
46. Cardon, D. (2003). *Le monde des teintures naturelles*-Belin, Paris.
47. Cartea, M.E., Francisco, M., Soengas, P. & Velasco, P. (2010). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16, 251-280.
48. Cavin, A. (2011). *Investigation phytochimique des trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires : Tinospora crisp (MENISPERNACEAE), Merremia emarginata (CONVOVULACEAE) et Oreophea eneandra (ANNONACEAE)*. Thèse de Doctorat. Université de Lausanne.
49. 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 extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 153-160.
50. Chambers, J.C., Vander Wall, S.B. & Schupp, E.W. (1999). Seed and seedling ecology of Pinon and Juniper species in the pygmy woodlands of western north America. *Bot Rev*, 65, 1-38
51. Charnot, A. (1945). *La toxicologie au Maroc*. Mémoire de la Soc. Sci. Nat. du Maroc, Rabat, Edition Siège de l'I.S 717.
52. Chavan, U., Shahidi, F., & Naczki, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry* 75:509-512, 75, 509-512.
53. Chemli, R. (2003). Plantes médicinales et aromatiques de la flore de Tunisie. *CIHEAM-Options Méditerranéennes*, 23, 119-125
54. Cherifi, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., & Bachir Bouiadjara, S. (2011). Impact de l'action anthropozoogène sur l'écosystème forestier du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Sécheresse*, 22, 197-206.
55. Christie, R.J., Alfenito, M.R. & Walbot, V. (1994). Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194, 541-549.

56. Chung, K., & Wei, C. (2001). Are tannins a double edged sword in biology and health? *Trends in Food Science et Technology* , 9, 168-175.
57. Coque, R. (1977). Géomorphologie. Ed. Armand collin. Paris. 452p.
58. Cornet A., 2002- La désertification un problème d'environnement, un problème de développement. Résumé de la conférence Agropolis Museum. 29 Jun. 2002.
59. Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs* (éd. Yves Dacosta). Paris.
60. De Bruyne, T., Pieters, D., Deelstra, H., & Vlietink, A. (1999). Condensed vegetable tannins : Biodiversity and biological activities 27 : 445-459. *Biochemical Systematics and Ecology* , 27 , 445-459.
61. De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography* , 112, 31 - 63.
62. Debuigue, G., 1984, Larousse des plantes qui guérissent, Librairie Larousse, p.5-6.
63. Deiana, A., Rosa, V., Casu, F. & Cottiglia, L (2003). Bonsignore and M.A. Dessì, chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. *J. A.O.C.S.*, 80, 65-70.
64. Deschner, E.E., Ruperto, J., Wong, G & Newmark, H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *arcinogenesis*. 12:1193–119.
65. Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids : Old and new aspects of class of natural therapeutic drugs. *Life sciences* , 65, 337-353.
66. Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G. & Tattini, M. (2013). Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Envir. Exper. Bot.*, in press.
67. Diallo, A., (2004). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd. (*Myrtaceae*) . Université de Bamako. Thèse de doctorat.
68. Dif, M. M. & Benchiha, H. (2012). Etude botanique, histologique et valorisation biochimique de *Papaver rhoeas*. des monts de Tessala. Mémoire de Master. UDL-SBA.
69. Djazoz, R. (1982). *Précis d'écologie*. villars : Gauthier.
70. Djebali, S. (1984). *steppe algérienne, phytosociologie et écologie* (éd. OPU).

71. Djermouni, K&Navef, B., (2004). 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition palais de livre
72. DSA(1992) Etude d'aménagement et développement des zones de la Montagne de la wilaya
73. Duran J.H.(1954). Les sols d'Algérie. Publication des services hydrauliques, vol. 1, Alger.
74. Elangovan, V., Sekar, N& Govindasamy, S. (1994) Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene induced tumorigenesis-*Cancer Lett*, 87, 107–113.
75. Ferka-Zazou, N. (2006). *Impact de l'occupation spatio-temporelle des espaces sur la conservation de l'écosystème forestier : Cas de la commune de Tessala, wilaya de Sidi Bel Abbes*. Mémoire de magister.Université de Tlemcen.
76. Fernandez, M. (2003). De Quelques plantes dites médicinales et de leurs fonctions, Editions Aenigma.
77. Ferrándiz, M.L& Alcaraz, M.J (1991)Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids.*Agents Actions*. 32, 283–288.
78. Ferreti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A. & Neri, D. (2010). Cherry antioxidants: From farm to table. *Molecules*, 15, 6993-7005.
79. Flet, C., 1984, Les substances naturelles sources de médicaments nouveaux, Ed.Le Moniteur.
80. Fukumoto, L.R & Mazza, G. (2000).Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*, 48,3597–3604.
81. Gábor, M., Cody, V., Middleton, E., Harborne, J., & Beretz, A. L. ( 1988.). Plants flavonoids in biology and Medecine II. *Biochemical., Cellular and Medecinal properties* , 1-15.
82. Gao, H., Nishida, J., Saito, S., & Kawabata, J. (2007). Inhibitory Effects of 5, 6, 7 Trihydroxyflavones on Tyrosinase. *Molecules* , 12, 86-97.
83. Gaussen, H., and Leroy H. F.,1982- Précis de botanique, végétaux supérieurs. Edition Masson. Paris.
84. Genet,M., Li, M., Luo, T., Fourcaud, T., Clément-Vidal., A.& Stokes, A.,( 2011) Linking carbon supply to root cell-wall chemistry and mechanics at high altitudes in *Abies georgei*, 107(2),311-320.

85. Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M.C., Ferrándiz, M.L., Bustos, G., Payá, M., Gunasegaran, R & Alcaraz, M.J. (1994). Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. *Life Sci.* 54, 333–338.
86. Glynn, C., Ronnberg-Wast ljung, A.C., Julkunen-Tiitt o, R. & Weih, M. (2004). Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entom. Exper. Applic.*, 113, 1-14.
87. Glyphis, J.P., Milton, S.J & Siegfried WR (1981) Dispersal of *Acacia cyclops* by birds. *Oecologia* 48: 138-141
88. Goldstein, G., Rada, F. & Azócar, A. (1985). Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in an Andean giant rosette species. *Oecologia*, 68, 147-152.
89. Goldstein, G., Rada, F. & Azócar, A., (1985). *Oecologia*, 68,1985,p. 147-152.
90. Gong Y, Liu X., He W H., Xu HG., Yuan F.&Gao Y X ., (2012) Investigation into the antioxidant activity and chemical composition of alcoholic extracts from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue. *Fitoterapia*. 83, 481–489
91. Greco J.(1966).L'érosion, la défense et la restauration des sols. Le reboisement en Algérie.
92. Guignard, J.L. (1996). *Abrégé de biochimie végétale* (éd. Masson). Paris.
93. Guinochet, M. (1980). Essai sur quelques syntaxons des Cisto-Rosmarinetea et des Quercetea ilicis d'Algérie et de Tunisie. *Phyto-écologia* 7 : 227 , 7, 227.
94. Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S. & Somers, D.J. (2012). Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLOS One*, 7,40695.
95. Guo, X.Y., Wang, J., Wang, N.L., Kitanaka, S & Yao, X.S.(2007) 9, 10-Dihydrophenanthrene derivatives from *Pholidota yunnanensis* and scavenging activity on DPPH free radical. *J. Asian Nat-Prod. Res.* 9, 165–174
96. Hadjadj Aoul, S. (1995). *Les peuplements du Thuya de berbérie (Tetraclinis articulata, Vahl, Master) en Algérie : phytoécologie, syntaxonomie et potentialités sylvicoles*. Thèse. Doc. d'État, Univ. Aix-Marseille III.
97. Halitim A., 1988-Sols des régions arides d'Algerie.OPU.Alger.

98. Hamza, T. (1993). *Introduction à la biologie moderne* (éd. Berti).
99. Havaux, M. & Niyogi., K.K,(2009).Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A., nr. 96, 8762–8767.
100. Heim, E., & Tagliaferro, A. . (2002). flavonoide antioxydants : chemistery  
metabolisme and structure activity relationships. *The journal of nutritional  
biochemistry* , 13, 572-584 .
101. Henaoui, I. (2007). *Les cistes dans la région de Tlemcen : aspect écologique et  
cartographique*. . Mémoire de magister. Université de Tlemcen.
102. Herisset, A (1974) L'arsenal et l'herboristerie (simples et formules) et la  
phytothérapie, les actualités pharmaceutiques.
103. Heron, M.P., Hoyert, D.L., Xu, .J& Scott, C.,( 2008) Tejada-Vera, B. Deaths:  
Preliminary data for 2006. *Natl. Vital Stat. Rep.*, 56, 1–52.
104. Hodek, P., Trefil, P., & Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile  
biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-  
Biological Interactions* , 21.
105. Hollman, P., Hertog, M., & Katanc, M. (1996). Analysis and health effects of  
flavonoids. *Food chem* , 51, 43-46.
106. Holthuijzen, A& Sharik , T.L., (1985) . The avian seed dispersal system of eastern red  
cedar (*Juniperus virginiana*). *Can J Bot.* 63, 1508-1515
107. Hrazdina, G. (1992). Compartmentation in aromatic metabolism. *In*: H.E. Stafford &  
R.K Ibrahim (eds.), *Phenolic Metabolism in Plants*. Plenum Press, New York.
108. Huetz De Lemps, A. (1970). *La végétation de la terre* (éd. Masson). Paris.
109. Igor Passi, L. (2002). *Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxylo \_des  
Lam. (Rutaceae)*. Thèse de pharmacie.Université de Bamako.
110. Ikermoud, M. (2000). *Évaluation des ressources forestières nationales*. (éd. DGF).  
Alger.
111. Inderjit (1996). Plant phenolics in allelopathy. *Bot. Rev.*, 62 , 186-202.
112. Iserin, P., 2001, Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse.
113. Jackson, M. (1962). *Soil chemical analysis* (éd. Constable and Comp). England.

114. Julkunen-Titto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 33, 213-217.
115. Kahle, K Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F. & Richling, E.,(2011)Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol- Nutr. Food Res.*50, 418-423.
116. Kalea, A.Z., Lamari, F.N., Theocharis, A.D., Cordopatis. P., Schuschke, D.A., Karamanos, N.K. & Klimis-Zacas, D.J.,(2006)Wild blueberry (Vaccinium angustifolium) consumption affects the composition and structure of glycosaminoglycans in Sprague-Dawley rat aorta. *J. Nutr. Biochem.* 17, 109-116.
117. Kefeli,, V (1974). Natural growth inhibitors and phytohormones. Russ. Moskva, Nauka,
118. Kiekken, R.(1962). Géologie et stratigraphie des monts du Tessala. Ed. Fouquet. Oran.
119. Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes.*Molecules*, 15, 6285-6305.
120. Krefting, L.& Roe, E.I. (1949).The role of some birds and mammals in seed germination. *Ecol Monogr* 19, 269-286.
121. lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., Aphalo , delaRosa, T., & Lehto T (1997). *New Phytologist*, 137,1, 617–621
122. Le climat su Sahara. Vol 1, Mém. H.S. Inst. Rech. Saharienne.
123. Li, J., & Jiang, Y. (2007). Litchi Flavonoids: Isolation, Identification and Biological Activity. *Molecules.* , 12, 745-758..
124. Lopes, G., Sanches, A., Nakamura, C., Dias Filho, B., Hernandes, L., & Carlos P deMello, J. f. (2005). Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart.and *Stryphnodendronobovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*,99:265-272 , 99, 265-272.
125. Lucienne, A., (2010). Les plantes médicinales d'Algérie. Edition Berti.
126. Lugasi, A., Havar, J., Sagi, K., & Biro, L. (2003). the role of antioxydant phytonutrients in the prevention of disease. *Acta Bilogica Szeigediediensis* , 47, 119-124.
127. Lumthaler, M.B., Ambach, W. & Ellinger R. (1997). Increase in solar UV radiation with altitude. *J. Photochem. Photobiol.*, 39,130-134.

128. Macheix, J.. (2005). *les composés phénoliques des végétaux : un exemple des métabolismes secondaires d'une importance économique* (éd. universitaire Romandes). Lausanne.
129. Mamatas, S.(1984) La pharmacognosie appliquée, Ed. Phytoscience, le pharmacien de France.
130. Marc, T., Gerard, W& Denis, L.,(2001). Classification des anti-inflammatoires *in* Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4eme Edition, pp 126-128 P.
131. Marcy, J., A. Balunas, D.& Kinghorn. (1970). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431- 441.
132. Marfak, A. (2003). *radiolyse gamma des flavonoïde. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides*. Thèse de doctorat.Université de Limoges.
133. Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* , 51, 304-315.
134. Maruyama, E.& Ugamoto, M. (1989). Treatments for promoting germination of *Parkia oppositifolia* BENTH and *Schizolobium amazonicum* HUBER seeds. *J Jpn For Soc*, 71,209–211
135. Matkowski, A. & Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, 77, 346-353.
136. Matkowski. A. & Piotrowska, M.,(2006). *Fitoterapia*, 77,346-353.
137. McLusky, S.R., Bennet, M.H., Beale, M.H., Lewis, M.J., Gaskin, P. & Mansfield, R. (1999). Cellwall alterations and localized accumulation of feruoyl-3\_-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration of *Botrytis alii* are associated with actin polarization, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J.*, 17, 523-534.
138. Middleton., E.& Kandaswami, C., (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* 43,1167–1179.
139. Milane, H. (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques*. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg.

140. Molyneux, P., (2004.)The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl( DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn- J. Sci. Technol.* 26,211–219
141. Muanda, N. F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R & Younos ,C.(2009). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts, 3:147-160
142. Ncube, B., Finnie, J.F. & Van Staden, J. (2011). Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. *South Afr. J. Bot.*, 77: 387-396.
143. Ncube, N., Finnie J.F. & Van Staden, J. (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South Afr. J. Bot.*, 82: 11-20.
144. Nicholas W (1983). Germination of pretreated seed of Mesquite (*Prosopis chilensis*) under arid conditions in northern Sudan. *For Ecol Manage*,5,307–312
145. Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* , 66, 2012-2031.
146. ONM. (2010). *Organisation national météorologique de la wilaya de Sidi Bel Abbes. Feuille de relevés quotidienne de la période 1980-2010.* Alger.
147. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B & Del Rio, D., (2003). Salvatore S., Bianchi, M., Brighenti, F., Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J. Nutr*,133, 2812–2819,.
148. Pennycooke, J.C., Cox, S. & Stushnoff, C. (2005). Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia ×hybrida*). *Envir. Exp. Bot.*, 53, 225-232.
149. Peronny, S. (2005). *La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta)*. Thèse de doctorat. Muséum national d’histoire naturelle.
150. Perret, C. (2001). *Analysis de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par Btrytis cinerea Pers.* Thèse de Doctorat.Université de Neuchatel.
151. Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & J.O., D. (1999 ). *Méthodes d’évaluation du stress antioxydant chez l’homme : importance en matière de prévention* (éd. Edition MEDI SPHERE ).

152. Pouget M.(1980). Les relations sol végétation dans les steppes sud algéroises. Travaux et
153. Prasad, T.K. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids and protease activities. *Plant J.*,10, 1017-1026.
154. Price, M.L, Van Scoyoc, S. & Butler, L.G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 1214-1218.
155. Quézel, P. (1964). L'endémisme dans la flore de l'Algérie. *C. R. Soc. Biogeo.* , 137-149.
156. Quézel, P., & Santa, S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I* (éd. CNRS). Paris.
157. Quézel, P., & Santa, S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II* (éd. CNRS). Paris.
158. Quezel, P., Barbero, M., Benaïd, A., Loïsier, R., & Rivas Martinez, S. (1988). Contribution à l'étude des groupements pré-forestiers et des matorrals rifains. (Ecologia Méditerranéa). *Ecologia Méditerranéa* , 2, 76-122.
159. Rada, F., Azócar, A., Gonzalez, J. & Briceno, B. (1998). Leaf gas exchange in *Espeletia schultzii* Wedd, a giant caulescent rosette species, along an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes. *Acta Oecol.*, 19, 73-79.
160. Rechner, A.R., Wagner, E., Van Buren, L., Van de Put, F., Wiseman, S. & Rice-Evans, C.A. (2002). Black tea represents a major source of dietary phenolics among regular tea drinkers. *Free Radic. Res.*, 36, 1127-1135.
161. Ribereau, G.P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.
162. Richter G. (1993) Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. *Press Polytechniques et Universitaires, Romandes, Suisse*
163. Roccotielo,E.,Gasazza,G & Gali,L.(2009).The flower biology of *Daphne gnidium* L.(Thymelaceae).*Plant sys Evol*,279,41-49
164. Roose E., Arabi M., Chebbani R., Mazour M. & Morsli B.(1998). Les montagnes méditerranéennes d'Algérie. Impact de l'intensification de l'agriculture de montagne sur l'environnement et les revenus. *Rev. OSTROM*, 56, 26-27.

165. Rump, A.F., Schussler, M., Acar, D., Cordes, A., Ratke, R., Theisohn, M., Rosen, R., Klaus, W. & Fricke, U., (1968) Effects of different inotropes with antioxidant properties on acute regional myocardial ischemia in isolated rabbit hearts. *Gen. Pharmacol.* 26, 603–611.
166. Saccardyl. (1949). Note générale sur la lutte contre les érosions des sols en Algérie.
167. Sarni-Manchado, P., & cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Paris: Edition lavoisier.
168. Sassi, M. (2008) les plantes médicinales. Dar el fikr . Tunis.
169. Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Nutr*, 130, 2073-2085.
170. Scalbert, A. & Johnson, I.T., (2005) Saltmarsh, M., Polyphenols: Antioxidants and beyond -Am. J. Clin. Nutr., 8, 215–217
171. Seat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M & Benjelloun, W. J. (1997). *ethnopharmacol*, 58, 45-54.
172. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K & Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem*, 40, 945–948.
173. Sidibé, F. (2003). *Etude phytochimique et pharmacologique de Stereospermum kunthianum Cham. (Bignoniaceae)*. Thèse de Pharmacie. Université de Bamako.
174. Singleton, V.L. & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungsti acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 16, 144-158.
- Solecka, D. & Kacperska, A. (1995). Phenylalanine ammonialyase activity in leaves of winter oilseed rape plants as affected by acclimation of plants to low temperature. *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 585-591.
175. Stöckigt J., S. Y. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. 967, 85-113.
176. Storey, I.N.J. (1991). Allelopathy in bracken *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae: Pteridophyta). *Fern Gazzette*, 14, 51-53.
177. Svoboda, K & Svoboda T (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants Microscopix publications.

- Tanaka-Oda, A., Tanaka Kenzo, E & Fukuda, K (2009). Optimal germination condition by sulfuric acid pretreatment to improve seed germination of *Sabina vulgaris* Ant. J For Res, 14,251–256
178. Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A., Silva Vaz, M., Silveira, T & Marroni, C (2007). Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology* , 45, 1140- 1146.
179. Triantaphylidés, C. , Krischke, M., Hoerberichts, F.A. , Ksas, B., Gresser, G., Havaux M & Breusegem F.,(2008). *Plant Physiol.*,148,960–968.
180. Tricart J., (1978) Géomorphologie applicable. Ed. Masson. Collection de géographie applicable,108-114.
181. Verdrager, J.(1978). Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Ed. Maloine S.A.
182. Vieémont, J.D & Crabbe, J. (2000). Dormancy in plants: from whole plant behaviour to cellular control. CABI, Wallingford
183. Vigneau, C.( 1985), Plantes médicinales : Thérapeutique - Toxicité, Ed. Masson.
184. Vinson, J.A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N & Proch, J.( 2005) Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, 24, 44-50
185. W.Nowik, (2005) HPLC-PDA characterisation of *Daphne gnidium* L. (Thymemeacea) dyeing extracts using two different C-18 stationary phases *J. Sep. Sci*, 28, 1595–1600
186. Waridel, P.( 2003). Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L & *P. crispus* L. (Potamogetonaceae). Thèse de doctorat de l'université de Lausanne.
187. Willett, W.C.(2002) Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science*,296, 695–698.
188. Yagihashi, T., Hayashida, M & Miyamoto, T (1998). Effects of bird ingestion on seed germination of *Sorbus commixta*. *Oecologia*. 114,209-212
189. Yakhlef, G. (2010). *Etude De L'activite biologique des extraits De feuilles De Thymus vulgaris L. Et Laurus nobilis L.* (éd. Universite -el hadj lakhder –Batna). mémoire de magister.
190. Yang, C.S., Lambert , J.D. & Sang, S. (2009). Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch. Toxicol.*, 83, 11-21.
191. Yang, L., Lee, C., & Yen, K. (2002). Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukaemia cells. *Cancer Letters* , 157, 65-75.

192. Zhaki, I., Korine, C & Arad, Z. (1995). The effect of bat (*Rousettus aegyptiacus*) dispersal on seed germination in eastern Mediterranean habitats. *Oecologia*, 101, 335-342
193. Zhishen, J, Mengcheng, T. & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64, 555-559.
194. Zidorn, C. & Stuppner, H. (2001). Chemosystematics of taxa from the *Leontodon* section *Oporinia*. *Biochem. Syst.Ecol.*, 29, 827-837.
195. Ziska, L.H., Teramura, A.H. & Sullivan, J.H. (1992). Physiological sensitivity of plants along an elevational gradient to UV-B radiation. *Amer. J. Bot.*, 29 , 863-871.
196. Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M. & Benjelloun, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.*, 58, 45-54.

