

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DES  
SCIENCES DE LA NATURE ET  
DE LA VIE  
N°.....



DOMAINE : SCIENCES DE LA  
NATURE ET DE LA VIE  
FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES  
OPTION : BIODIVERSITE ET  
PHYSIOLOGIE VEGETALE

Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique

Par

SASSOUI Hassiba, LADJAL Yousra et YOUSFI Leyla

Intitulé :

**Contribution à la valorisation phytochimique des  
plantes médicinales locales : *Melissa officinalis* L.  
et *Daphne gnidium* L.**

Soutenu le 13.6.2022 devant le jury composé de :

Dr. MEDJKAL Samir	MCA	Université de Msila	Président
Dr. BENDIF Hamdi	MCA	Université de Msila	Encadreur
Mme.KHALFA Hanane	MAA	Université de Msila	Examinatrice

Année universitaire : 2021 / 2022

---

---

### Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail :*

*A ma chère mère qui m'a soutenue moralement et matériellement dans ma vie et mes études en particulier, Je veux remercier mon père, qui m'a apporté un soutien.*

*Je veux aussi remercier mes chère sœurs et frères, pour m'avoir encouragé.*

*Merci d'avoir été là pour me soutenir à tout moment.*

*Hassiba*

---

---

### Dédicace

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

A Ma mère HOURIA qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études  
A Mon cher père MOUSSA qui m'a appris les sens de la persévérance tout Au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses Encouragement

A Mon frère SADDAM HOUSSEYN et MOURAD

A Ma sœur SIHAM et son fils OKBA

A Ma sœur MOUNA, son mari MAROINE et ses enfants

EL MOATASSIM BILLEH, ANNES, KHADIDJA

A Ma sœur HAYAT, son mari KHALED et ses enfants ALAA, ARWA, ARYAM

A Mon oncle Khelifa et toute la famille YOUSFI

A mes amies HASSIBA, YOUSRA , SIHAM , QAMAR , MARWA , AHLAM , LOUBNA

A mes collègues de promotion Master 2 Biodiversités physiologie végétale 2022

*Leyla*

---

---

### Dédicace

*Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant De m'avoir donné la force et le courage pour accomplir ce modeste travail que je dédie :*

*A mes très cher parents Nadir et Zineb que j'aime tant, sans lesquels je ne serai jamais arrivée là où j'en suis.*

*A mes sœurs : Hassina, Merzaka, Naziha. A mes frères : A.malk, A.raouf, A.nour.*

*A mes petites enfants : Ranim, Tasnim, Oubey, Rinad, Hanin, Ibaa, Raid, Baraa.*

*A tout ma famille LADJAL.*

*A tous mes amies et tous mes collègues de promotion*

*Yousra*

---

---

---

## **Remerciement :**

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

*Nous exprimons nos profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à notre encadrant **Dr.BENDIF Hamdi**, pour son encadrement*

*Nos remerciements vont aux membres du jury le président **Dr. MEDJKAL Samir** et l'examinatrice **Mme.KHALFA Hanane***

*Nous remercions **Mme.AKRIB Fadila**, pour son aide dans notre travail de laboratoire*

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

**Merci à Tous...**



---

---

## *Table des matières*

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Liste des abréviations**

**Résumé**

**Introduction .....1**

***Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... 2***

**I. Plantes médicinales et phytothérapie ..... 3**

1 Généralités sur les plantes médicinales ..... 3

2 Aperçu sur l'utilisation des plantes médicinales : ..... 3

3 Substances bioactives : ..... 4

3.1. Les alcaloïdes : ..... 4

3.2. Les polyphénols ..... 5

    Les Flavonoïdes ..... 5

    Les Tannins ..... 6

    Les coumarines : ..... 6

    Les saponines : ..... 6

**II. Plante médicinale étudiée ..... 7**

1 *-Mélissa officinalis* L.(Lamiaceae) : ..... 7

1.1 Généralités sur la famille de Lamiaceae : ..... 7

1.2 Généralités sur le genre *Mélissa* : ..... 7

1.3 . La plante médicinale *Mélissa officinalis*..... 7

1.3.1. Description botanique : ..... 7

1.3.2. Habitat et distribution géographique : ..... 8

1.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle : ..... 9

1.3.4. Travaux antérieurs : ..... 9

2.*Daphne gnidium* L.(Thymelaeaceae) : ..... 10

2.1. Généralités sur la famille de Thymelaeaceae : ..... 10

2.2. Généralités sur le genre <i>Daphne</i> :.....	10
2.3. La plante médicinale <i>Daphne gnidium</i> .....	10
2.3.1. Description botanique :.....	10
2.3.2. Habitat et distribution géographique.....	12
2.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle .....	12
2.3.4. Travaux antérieurs .....	12
<b>Chapitre II: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>13</b>
1 Matériel végétal.....	14
2 La récolte des plantes .....	14
3 Préparation des échantillons :.....	14
4 Préparation des extraits .....	14
1. Préparation des extraits par infusion :.....	14
2. Préparation des extraits éthanolique par macération :.....	14
5 Criblage phytochimique .....	15
5.1. Mise en évidence des alcaloïdes : .....	15
5.2. Mise en évidence des sucres réducteurs .....	15
5.3. Mise en évidence composés phénolique : .....	15
5.4. Mise en évidence des glycosides.....	16
5.5. Mise en évidence des protéines et des acides amines .....	16
5.6. Mise en évidence des flavonoïdes .....	16
5.7. Mise en évidence des tanins .....	16
5.8. Mise en évidence des saponines.....	16
5.9. Mise en évidence des quinones .....	16
5.10. Mise en évidence des coumarines :.....	17
5.11. Mise en évidence des huiles et graisses fixes : .....	17
5.12. Mise en évidence des lignines : .....	17
6 Détermination du rendement d'extractions .....	17
7 Extraction liquide-liquide.....	17
7.1 Extraction par l'éther de pétrole : .....	17
7.2 Extraction par chloroforme :.....	17
7.3 Extraction par l'acétate d'éthyle :.....	18
7.4 Extraction par n-butanol : .....	18
8 Analyses chromatographiques par CCM.....	18

---

9	Analyses colorimétriques par spectrophotométrie .....	19
1.	Dosage des polyphénols totaux : .....	19
2.	Dosage des flavonoïdes .....	20
10	Activité antioxydants: .....	21
<b>Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>		<b>22</b>
1	Rendement d'extractions .....	23
2	Criblage phytochimique .....	23
3	Analyses chromatographiques par CCM.....	27
4	Analyses colorimétriques par spectrophotométrie .....	31
4.1	Dosage des polyphénols totaux.....	31
4.2	Dosage des flavonoïdes.....	31
4.3	Activité antioxydante .....	32
<b>Conclusion .....</b>		<b>36</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>37</b>

---

## Liste de tableaux

<b>Tableau 1:</b> Rendement d'extraction (%) d' <i>M. officinalis</i> . et <i>D. gnidium</i> . ....	23
<b>Tableau 2:</b> Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre du deux plantes étudiées <i>M. officinalis</i> et <i>D. gnidium</i> .....	24
<b>Tableau 3 :</b> éléments de la Chromatographie sur Couche Mince (groupes phytochimiques) de la <i>M. officinalis</i> .....	28
<b>Tableau 4 :</b> éléments de la Chromatographie sur Couche Mince (groupes phytochimiques) de la <i>D. gnidium</i> .....	29

---

## Liste de figure :

<b>Figure 1:</b> Structure de base des flavonoïdes.....	5
<b>Figure 2:</b> Structure des Coumarine .....	6
<b>Figure3 :</b> Mélisse officinale ( <i>Melissa officinalis</i> ) .....	8
<b>Figure4:</b> La plante médicinale <i>Daphne gnidium</i> .....	11
<b>Figure5:</b> Fleur et fruit de la plante <i>D. gnidium</i> .....	11
<b>Figure 6:</b> CCM de <i>M. officinalis</i> avant et après révélation.....	30
<b>Figure 7:</b> CCM de <i>D. gnidium</i> avant et après révélation .....	30
<b>Figure 8:</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux .....	31
<b>Figure 9:</b> Courbe d'étalonnage de quercetine pour les dosages des flavonoïdes.....	32
<b>Figure 10:</b> Inhibition du DPPH de la plante <i>D. gnidium</i> .....	32
<b>Figure 11 :</b> Inhibition du DPPH de la plante <i>M. officinalis</i> .....	33
<b>Figure 12:</b> Courbe d'étalonnage d'inhibition de Trolox.....	33

---

## Liste des abréviations

**AlCl<sub>3</sub>** :chloride aluminium

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**Cm** : centimètre

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

**EQ** : équivalents quercétine

**EAG** :équivalents d'acide gallique

**FeCl<sub>3</sub>** :Chlorure ferrique

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

**g** : Gramme

**GABA** :Acide : aminobutyrique

**h** : Heur

**HCl** :Acide chlorohydrique

**liq-liq** :liquide-liquide

**MeOH** : méthanol

**mg** : milligramme

**ml** : millilitre

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium

**NaNO<sub>2</sub>** : Nitrite de sodium

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**nm** : nanomètre

**OMS** : organisation Mondiale de la Santé

**R<sub>f</sub>** : Rapport frontal

**UV** : Ultraviolet

**µg** : microgramme

**V** : volume

**%** : Pourcentage

## Résumé

A travers notre étude de deux plantes médicinales locales : *Mélissa officinalis* et *Daphne gnidium*. Nous avons obtenu des extraits par Extraction solide –liquide avec l'éthanol. L'analyse qualitative nous a permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes, sucres, phénols, glycosides, protéines, acides aminés, flavonoïdes, tanins, saponines et coumarine en différentes quantités. L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince a révélé la présence des : acide phénolique, flavons, Anthocyanidine, flavonones, isoflavonoïdes, coumarine. Le procédé de dosage nous a permis de montrer que le taux des polyphénols pour *Mélissa officinalis* est 1,875 mg EAG/g d'extrait, quant à *Daphne gnidium* est 7,5 mg EAG/g. Le taux des flavonoïdes chez les deux espèces est estimé à 5,27 µg de EQ/mg pour *Mélisse officinalis* et 5,27 µg de EQ/mg pour *Daphne gnidium* L. En ce qui concerne l'activité antioxydante, le test DPPH nous a permis d'enregistrer une bonne activité pour les deux extraits. La valeur IC<sub>50</sub> de *Mélissa officinalis* a été 0,17mg/ml et 0.14 mg/ml pour *Daphne gnidium*.

**Mots-clés :** *Melissa officinalis*, *Daphne gnidium*, polyphénols, flavonones, DPPH.

## Abstract:

Through our study of two local medicinal plants: *Melissa officinalis* and *Daphne gnidium*. We obtained extracts by Solid Liquid Extraction with ethanol. The qualitative analysis allowed us to highlight the presence of alkaloids, sugars, phenols, glycosides, proteins, amino acids, flavonoids, tannins, saponins and coumarin in different amounts. Qualitative analysis by thin-layer chromatography revealed the presence of: phenolic acid, flavons, Anthocyanidine, flavonones, isoflavonoïdes, coumarin. The assay showed that polyphenols for *Melissa officinalis* are 1.875 mg GAE/g extract, while *Daphne gnidium* is 7.5 mg GAE/g. Flavonoids in both species are estimated to be 5.27 µg QE/mg for *Melissa officinalis* and 5.27 µg QE/mg for *Daphne gnidium* L. For antioxidant activity, the DPPH test allowed us to record good activity for both extracts. *Melissa officinalis* IC<sub>50</sub> was 0.17mg/ml and 0.14 mg/ml for *Daphne gnidium*.

**Keywords:** *Melissa officinalis*, *Daphne gnidium*, polyphenols, flavonones, DPPH

## المخلص

من خلال دراستنا لنباتين طبيين محليين: *Melissa officinalis* و *Daphne gnidium*. حصلنا على مستخلصات بواسطة Extraction solide –liquide مع الإيثانول. سمح لنا التحليل النوعي بتسليط الضوء على وجود القلويدات والسكريات والفينولات والجليكوزيدات والبروتينات والأحماض الأمينية والفلافونويد والعفص والصابونين والكومارين بكميات مختلفة. كشف التحليل النوعي بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عن وجود: حمض الفينوليك، الفلافون، الأنثوسيانيد، الفلافونون، الإيزوفلافونويد، الكومارين. أظهر الفحص أن البوليفينول *Melissa officinalis* هو 1.875 ملغ EAG/g مستخلص، في حين أن *Daphne gnidium* هو 7.5 ملغ EAG/g. تقدر الفلافونويد في كلا النوعين بـ 5.27 µg EQ / mg لـ *Melissa officinalis* و 5.27 µg EQ / mg لـ *Daphne gnidium* L. بالنسبة للنشاط المضاد للأكسدة، سمح لنا اختبار DPPH بتسجيل نشاط جيد لكلا المستخلصين. كان *Melissa* IC<sub>50</sub> 0.17 ملجم/مل و 0.14 ملجم/مل لـ *Daphne gnidium*.

الكلمات المفتاحية: *Melissa officinalis*, *Daphne gnidium*, polyphenols, flavonones, DPPH

---

# INTRODUCTION



---

## Introduction

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurale et urbaine en Algérie et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent. Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement. L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires. Cependant, la flore médicinale algérienne reste peu connue jusqu'à nos jours, car sur les quelques milliers d'espèces végétales, seules 146 sont dénombrées comme médicinales.

L'étude de la médecine traditionnelle et du traitement par les plantes est donc particulièrement intéressante car peu de travaux de recherche ont concerné cet aspect, et plus particulièrement l'utilisation des espèces spontanées en médecine traditionnelle. En négligeant l'aspect floristique réel du terrain (**Hamel et al.,2018**).

Le but de notre étude est la valorisation de deux espèces médicinales qui sont: *Melissa officinalis* de la famille des Lamiaceae et *Daphane gnidium* de la famille des Thymelaceae. Cette étude vise la réalisation d'une extraction et à connaître les composés bioactifs présents dans celles-ci, ainsi que ses propriétés biologiques caractéristiques tel que l'activité antioxydante.

Ce mémoire s'articule sur trois chapitres : Le premier chapitre débute par une étude bibliographique qui est focalisée sur les plantes médicinales, généralités, leurs classifications, applications et aussi généralités sur les espèces *Melissa officinalis* et *Daphane gnidium*, le deuxième chapitre traite les différentes étapes de préparation des deux plantes étudiées et les protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction et les diverses techniques de l'identification des composés bioactifs existant dans ces espèces. Dans le troisième chapitre, nous représentons les résultats concernant les espèces bioactifs trouvés et l'activité antioxydante avec interprétation détaillée de ces résultats. Ce mémoire termine par une conclusion générale qui résume tous les résultats obtenus grâce à cette étude.

---

## *Chapitre I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*



---

## I. Plantes médicinales et phytothérapie

### 1 Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales, et ce depuis les premières ères de l'existence de l'être humain, ont constitué une source de produits à activité pharmacologique, utilisées pour soulager les maux, soigner les douleurs et alléger les souffrances. De plus cette utilisation a pris une plus grande ampleur avec les rituels religieux dans différentes civilisations (**Thboussine, 2020**).

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

La Phytothérapie utilise des plantes médicinales dans leur totalité ou certaines parties de la plante dans des buts thérapeutiques. La phytothérapie compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives depuis l'aube de l'humanité. C'est ainsi que les êtres humains utilisent des plantes depuis des siècles voire des millénaires à des fins thérapeutiques sur l'ensemble de notre planète (**Beat , 2013**).

### 2 Aperçu sur l'utilisation des plantes médicinales

Les plantes sont une alternative thérapeutique à ne pas négliger de par leurs nombreux effets généraux : anti-infectieux, anti-inflammatoires, antispasmodiques, antalgiques, antipyrétiques, reconnus de longue date et leur toute particulière utilité en cas de troubles digestifs. Des fiches d'orientation médicales à la phytothérapie- aromathérapie sont en cours de rédaction par une commission pluridisciplinaire de médecins, pharmaciens et biologistes afin de mieux guider nos consultations et nos patients(**Létard et al.,2015**).L'utilisation des

---

plantes médicinales est ancienne que l'humanité elle-même, il existe de nombreuses preuves dont des documents écrits, des monuments conservés et même des médicaments à base de plantes.

La conscience de l'utilisation des plantes médicinales est le résultat de nombreuses années de lutttes contre des maladies grâce auxquelles l'homme a appris à consommer des drogues dans les écorces, les graines, les fruits et d'autres parties des plantes ; la science a inclus dans la pharmacothérapie moderne une gamme de médicaments d'origine végétale connus par les civilisations anciennes et utilisés tout au long des millénaires (**Sofowora, 2010**).

Les grands types d'usage des plantes médicinales et aromatiques par l'homme sont cosmétique (astringentes, adoucissantes, cicatrisantes, capillaires, pigmentaires et anti-ecchymose), aromatique et condimentaires, alimentaires, industriels (tinctoriales, fibres, textiles, insecticides) et médicinales (**Anthoula, 2003**).

### **3 Substances bioactives**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Ce sont des produits à structure chimique souvent complexe, ils sont très dispersés et très différents selon le type d'espèce. Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores et dans les relations entre la plante et son environnement (**Lutge et al.,2002 ; Abderrazak et Joël,2007**). Ces molécules biologiques ne sont pas, par définition, nécessaires et vitaux pour la cellule ou l'organisme mais elles ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes (**Gravot, 2008**).Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Abderrazak & Joël, 2007**).

#### **3.1. Les alcaloïdes :**

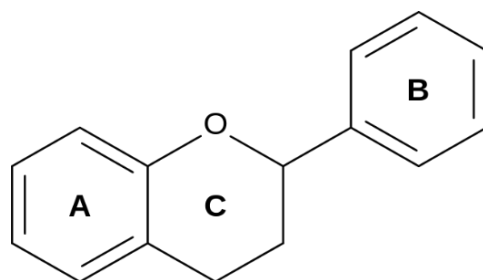
Les alcaloïdes sont des composés organiques d'origine naturelle, éventuellement reproductibles par voie synthétique, le plus souvent végétale, azotés, plus ou moins basique (**Beunton, 2009**).On estime à plus de 10.000 alcaloïdes différents isolés à partir de sources végétales, animales ou microbiennes(**Badiaga, 2011**).Les alcaloïdes sont utilisés dans le traitement de l'asthme bronchique et comme médicament analgésique et antiallergique (L'éphédrine, isolée d'*Ephedra sinica*), ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (La berbérine, isolée de *Berberis vulgaris*), et sont utile dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (la galanthamine agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la cholinesterase) (**Mauro, 2006**) .

### 3.2. Les polyphénols

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (ABEDINI, 2013). Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques : Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Knaggs, 2003). Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement et économiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant (ABEDINI, 2013).

#### Les Flavonoïdes

Les Flavonoïdes lato sensu sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tous les flavonoïdes plus de 4 000 ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane (Bruneton, 1999).



**Figure 1:** Structure de base des flavonoïdes

([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoid\\_basis.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoid_basis.svg))

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

---

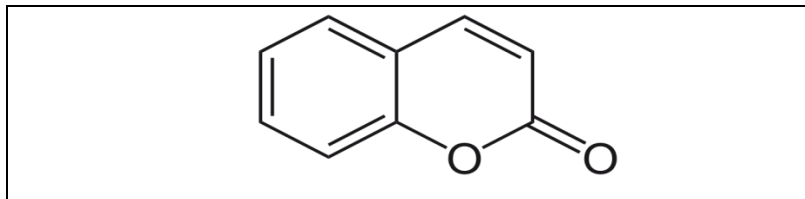
## Les Tannins :

Les tannins sont très abondants chez les angiospermes dicotylédones (Tannins hydrolysables) et les gymnospermes (Tannins condensés). Leur masse moléculaire est comprise entre 500 et 3000 PM (Atefeibu, 2002). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques. Ils sont constitués soit de polyol (ou polyalcool ou glycol, caractérisé par des groupes hydroxyle) (glucose le plus souvent) ou de catéchine ou de triterpénoïde auquel sont attachés des unités galloyles (ou leurs dérivés) ou soit d'oligomères ou polymères de flavanols. On distingue, habituellement, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénique : tanins hydrolysables, tanins galliques (Beunton, 2009).

## Les coumarines

Présentes dans la nombreux végétaux, Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones que l'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-Z-cinnamiques (Beunton, 2009). Il existe quatre principaux sous-types de coumarines: les coumarines simples, les furanocoumarines et les pyranocoumarines et les coumarines à substitution pyrone. (Jain & Joshi, 2012).

Elle est produite en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexine. (Vivas de Gaulejac, 2001).



**Figure 2:** Structure des Coumarine

(<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cumarin2.svg>)

## Les saponines

Les saponines sont très fréquentes dans les plantes médicinales. D'un point de vue chimique, elles se caractérisent également par la présence d'un radical glucide (glucose, lactose) associé à un radical aglycone. Sa principale propriété physique est la forte réduction de la tension superficielle de l'eau. Toutes les saponines sont très moussantes et font d'excellents émulsifiants. (Blot & Bernard Guillier, 2012) .

---

## II. Plante médicinale étudiée

### 1-*Mélissa officinalis* L. (Lamiaceae)

#### 1.1 Généralités sur la famille de Lamiaceae :

C'est une famille très homogène: une Lamiacées est facile à reconnaître. Elles comprennent 6500 espèces dont l'aire de dispersion est *extrêmement étendue, mais* avec une prépondérance pour les *régions Méditerranéennes* :Thym, Lavande, Romarin caractérisent la flore des garrigues. Les Lamiacées sont rares, par contre, dans les régions arctique et haute montagne. De nombreuses lamiacées seront rencontrées en herborisation, lamier blanc. Lierre terrestre, Bugle, Ballote fétide, Origan, serpolet, sauge des prés ...

Beaucoup de lamiacées sont utilisées en Pharmacie et en parfumerie pour leurs essences : Lavande, Menthe, Sauge officinale, Mélisse. Quantités d'aromates appartiennent à cette famille : Thym, Romarin, Origan, Marjolain, Sarriette, Basilic (**Guignard, & Dupont, 2012**).

#### 1.2 Généralités sur le genre Mélissa

La Mélisse (*Melissa officinalis* L.) D'autres synonymes : citronnelle ,citronnade, piment des ruches, thé de France (**Valnet, 2003**), est un genre appartenant à la famille des lamiacées. Il existe trois sous-espèces de *M. officinalis*: sous-espèce *officinalis*, sous-espèce *inodora* et sous-espèce. *Altissima*(**Sari et Ceylan 2002**) . L'*officinalis* est la plus utilisée en thérapeutique (**Carant et al., 1998**).

L'étymologie de *Mélissa* (abeille en grec) rappelle que son nectar est avidement recherché par les abeilles (**Wichtl et Anton, 2003**).

Nom botanique : *Melissa officinalis* L.

Nom français : Mélisse officinale

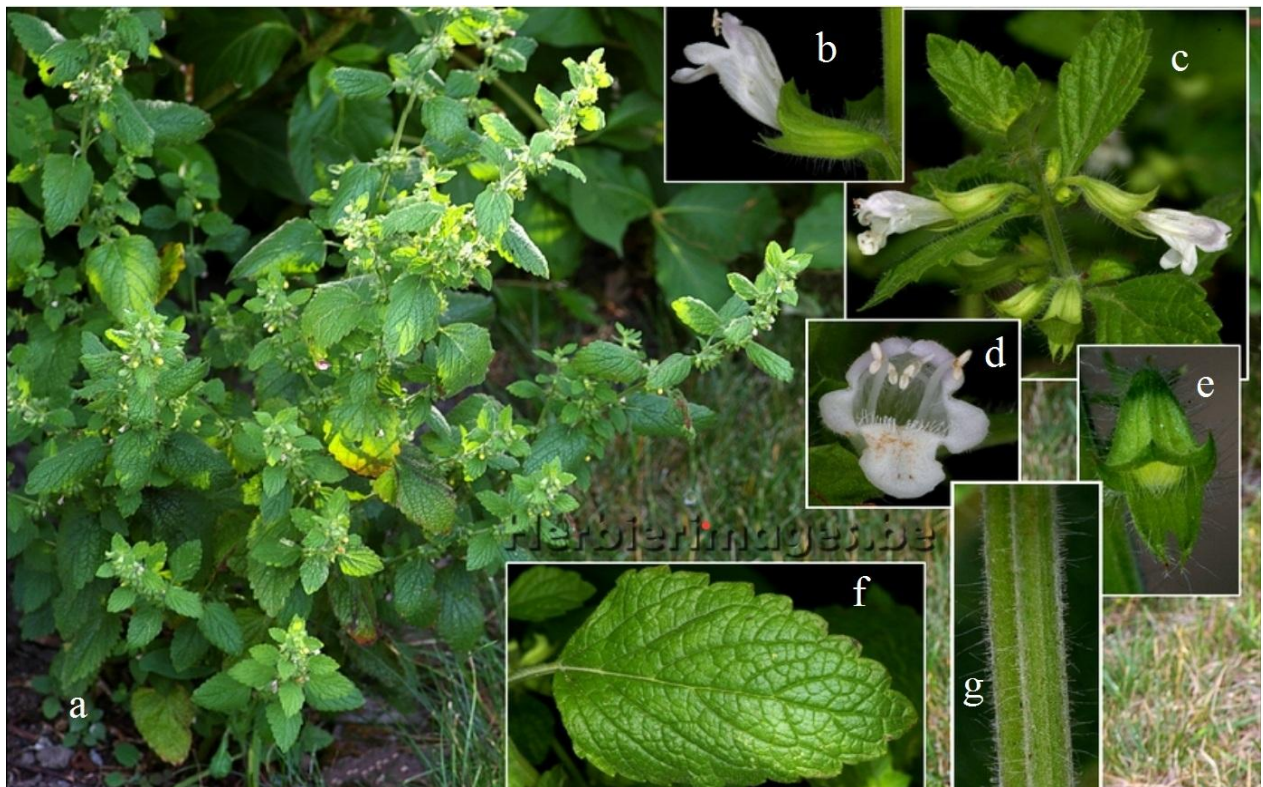
Nom anglais : Lemon balm

#### 1.3 . La plante médicinale *Mélissa officinalis* L.

##### 1.3.1.Description botanique :

La Mélisse (**Figure a**) est une plante herbacée vivace, à tiges quadrangulaire dressées et ramifié, haute de 30 à80 cm, mollement velue à odeur de citronnelle très agréable (**BELOUED, 2001**).Les feuilles (**Figure f**) plus ou moins pétiolées, mesurant environ 8 cm de long et jusqu'à 5cm de large, largement ovoïdes, sont arrondies ou presque cordiformes ridé, est de couleur vert foncé sur la face supérieure et vert plus clair sur la face inférieure. La fine nervure est proéminente sur la face inférieure. Le bord de la feuille est

irrégulièrement crénelé ou dentelé. La face supérieure gaufrée est faiblement pubescente, la face inférieure presque glabre ou légèrement pubescente le long des nervures, mais finement ponctuée (Wichtl et Anton 2003). Fleurs blanchâtres (Figure b) ou jaunâtres, 6 à 12 en verticilles (Figure c) axillaires, espacées, brièvement pédonculées et bien plus courtes que les feuilles. Calice poilu (Figure e), tubuleux en cloche à 13 nervures, à l'inférieure bifide, corolle bilabée à tube saillant arqué, ascendant, à lèvre supérieure dressée concave, échancrée, l'inférieure à 3 lobes ; 4 étamines (Figure d) (BELOUED, 2001). Le fruit est un tétrakène, Contient de petites graines brun foncé et brillantes..



**Figure3** :Mélisse officinale (*Melissa officinalis*)

<http://www.herbierimages.be>

**a** : plante entière, **b** : fleur zygomorphe

**c** : fleurs disposées en verticilles à la base des feuilles

**d** : quatre étamines ; **e** : Calice poilu ; **f** : feuille ; **g** : tige

### 1.3.2. Habitat et distribution géographique :

Originnaire d'Europe méridionale, d'Asie occidentale et d'Afrique du Nord, la mélisse pousse à présent dans le monde entier On la cultive par semis ou par boutures au printemps.

---

On cueille les parties aériennes dès le début de l'été et juste avant que les fleurs éclosent(Larousse des plantes médicinales..., 2001). Plante de la région méditerranéenne, d'odeur très citronnée, cultivée en Anjou, Provence, à Milly (Seine-et- Marne). Trop âgée, la mélisse sent la punaise, d'où la nécessité de la récolter au moment de la floraison (Valnet, 2003).

### 1.3.3. Utilisation en médecine traditionnelle :

Les Grecs et les Romains de l'Antiquité utilisaient la mélisse dans pansements chirurgicaux pour plaies et en préparations pour traiter morsures et piqûres venimeuses ou infectieuses telles que causées par chiens et scorpions (Birdane et al., 2007). Le mélisse, d'un emploi populaire, est justifiée contre la digestion difficile, les douleurs d'estomac et pour stimuler la sécrétion biliaire. On utilise dans la faiblesse du cœur, les palpitations, les bourdonnements d'oreilles. On l'utilise également contre le rhumatisme ancien. En usage externe, la mélisse réduite en poudre est employée comme sternutatoire, contre les maux de tête. Des applications de plante écrasée ou des lotions d'infusion sur les plaies, cament la douleur et d'inflammation (BELOUED, 2001).

### 1.3.4. Travaux antérieurs :

L'extrait aqueux de *M.officinalis* montré la plus forte inhibition de l'activité GABA transaminase dans divers extraits végétaux testés (Awad et al., 2007). Dans une étude en double aveugle, in extrait séché spécialement préparé à partir de feuilles de Mélisse a été étudié et l'activité antivirale in vitro de cette plante contre les infections à herpès simplex a été confirmée (Dimitrova et al., 1993).

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles de *M.officinalis* a été étudiée pour son activité antimicrobienne in vitro, les résultats ont montré que l'huile essentielle présentait une activité antimicrobienne élevée contre tous les micro- organisme ciblés principalement contre 5 bactéries pathogènes humaines, 1 levure *Candida albicans* et 2 champignons phytopathogènes testés (Mazzanti et al., 2008).

L'activité antimicrobienne de *M.officinalis* l'huile essentielle a été étudiée et il a été montré que l'activité antibactérienne la plus efficace était exprimée sur une souche multi-résistante de *Shigella sonnei*. Un taux significatif d'activité antifongique a été présenté sur les espèces de Trichophyton (Wolbling et al., 1994).

---

L'huile essentielle de *M.officinalis*, c'est avérée avoir des activités anti-inflammatoires, soutenant l'application traditionnelle de cette plante dans le traitement de diverses maladies associées à l'inflammation et à la douleur (**Bounihiet al.,2013**).

## **2.Daphne gnidium L.(Thymelaeaceae)**

### **2.1. Généralités sur la famille de Thymelaeaceae :**

Les Thymelaeaceae sont une famille de taille moyenne composée de 50 genres et d'environ 900 espèces qui sont principalement confinées en Afrique, en Australie et en Asie ( **Rogers, 2009**). Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids (**Borris et al.,1988**).La famille Thymelaeaceae est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies car il a anti-leucémie, propriétés pharmacologiques anti-tumorales, anti-goutte, *anti-inflammatoires et antimicrobiennes* (**Zaidi et al.,2015**)

### **2.2. Généralités sur le genre Daphne :**

Le Garou est un arbuste de la famille des Thymelaeaceae. Il croit assez communément dans les maquis méditerranéens, en particulier dans les régions montagneuses du Tell Nord - Africain. On le retrouve souvent sur les talus escarpés bordant les oueds. Les parties les plus utilisées de cette plante sont les feuilles, les fruits et l'écorce (**EL FENNOUNI, 2012**).Le genre *Daphne* comprend 70 espèces d'arbustes réparties en Europe, en Asie tempérée et subtropicale (**Brickell & Mathew, 1976**).Les membres du genre *Daphne* ont été d'intérêt en raison de leur excellente valeur médicinale (**Cottiglia et al.,2001**) .

#### **Noms vernaculaires :**

*Nom français* : Garou, Daphné Garou, Thymèle, Saint Bois

*Nom anglais* : Flax-leaved Daphne

*Nom arabe* : Lazzaz

### **2.3. La plante médicinale Daphne gnidium**

#### **2.3.1.Description botanique :**

*D. gnidium* est un arbuste à feuilles persistantes qui pousse dans la région méditerranéenne et peut atteindre 2 m de hauteur (**Harizi et al.,2011**) ,de 60 cm à 2 m de haut ou plus, à rameaux minces très feuillés. Des feuilles persistantes ou caduques, lancéolées-

---

linéaires, larges de 5-7mm au plus, cupsidées, très denses (Mohammedi, 2013). Les fleurs blanches petites et tubulaires, sont pédonculées, poilues sur le calice, souvent odorantes sont groupées en panicules terminales ; la floraison de juillet à octobre (EL FENNOUNI, 2012). Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé. La floraison va d'octobre à mars, c'est une plante entomogame.



**Figure4:**La plante médicinale *Daphne gnidium*



**Figure5:**Fleur et fruit de la plante *D.gnidium*

---

### **2.3.2.Habitat et distribution géographique :**

Espèce méditerranéenne, commune dans tout le tell Algérien, on la retrouve en Europe méridionale et occidentale. Elle est présente dans les forêts, les garrigues et les broussailles(**Guide illustré de la flore Algérienne , 2011**).

### **2.3.3.Utilisation en médecine traditionnelle :**

Les racines, en poudre, de *D. gnidium* ont été utilisées dans la médecine traditionnelle comme un abortif et l'écorce a été utilisé comme un agent diurétique, pour le traitement des douleurs dentaires (**Borris et al.,1998**), et contre l'hépatite(**Bellakhdar et al.,1991**). Les feuilles en infusion ont été employées comme un agent hypoglycémiant(**Ziyyat et al.,1997**).En Algérie, la partie aérienne de *D. gnidium*, a été utilisée avec l'huile d'olive contre les douleurs inflammatoires (**AMENI , 2015**).Il était utilisé pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique. Le Garou possède des effets cytotoxique, antioxydant et antimicrobien (**Mohammedi, 2013**).

### **2.3.4. Travaux antérieurs :**

Une étude a montré le pouvoir inhibiteur des racines du *D. gnidium*, sur la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose dans la lignée cellulaire de cancer du sein humain MCF-7 (**Chauki et al.,2009**).L'extrait alcoolique des feuilles agit comme un anti-inflammatoire in vitro par inhibition des macrophages et des lymphocytes activés. Il a présenté également une activité antibactérienne contre *Bacillus lentus* et *Escherichia coli*, mais était inactive contre les champignons (**Cottigli et al,2001 ; Harizi et al,2011**).

---

## *Chapitre II: MATÉRIELS ET MÉTHODES*



---

## 1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de deux espèces des plantes médicinales : *M. officinalis*, *D. gnidium*.

## 2 La récolte des plantes

L'étude phytochimique a été réalisée sur les parties aériennes (les feuilles et tiges) de *M. officinalis*, qui a été récoltée de la région de M'sila en Mai 2019. L'identification taxonomique a été confirmée par **Dr. K. Rabbas** au département de biologie de l'Université de M'sila, utilisant la flore d'Algérie (**Quezel et Santa 1962**).

*D. gnidium* a été récoltées à Bordj Bou Arreidj en juin 2009. L'identification taxonomique du matériel végétal a été confirmée par le **Dr. K. Rabbas** au Département de biologie de l'Université de M'sila, utilisant Flore d'Algérie (**Quezel et santa 1962**).

## 3 Préparation des échantillons

Après récolté les plantes, le produit obtenu a été séché à la température ambiante (20-25°C) à l'air libre pendant environ un mois, jusqu'à la stabilisation de leur masse pour éviter des risques éventuels d'oxydation des polyphénols et de préserver le maximum l'intégrité des molécules. Ensuite, les échantillons ont été broyés et stockés à l'obscurité dans un milieu sec.

## 4 Préparation des extraits

### 1. Préparation des extraits par infusion

Pour préparer un infusé, on met 80 ml d'eau distillée sur la plaque chauffante jusqu'à ébullition (15 min). Après on met 10g de poudre dans l'eau distillé bouillante pendant 15 min. Puis on filtre le mélange.

### 2. Préparation des extraits éthanolique par macération

20g de les plantes en poudre, est mis dans un bécher, on ajoute 100ml du solvant (éthanol) pendant 24h, ce procédé est répété 3 fois. Le mélange obtenu pour chaque jour subit une filtration avec papier filtre au quelle l'obtention d'un extrait brute. Les diverses fractions récupérées sont réunies et évaporées sous pression réduite à une température inférieur à 40 C° jusqu'à l'obtention d'un résidu sirupeux, par Rota vapeur.

---

## 5 Criblage phytochimique

L'analyse phytochimique est réalisée sur la base des tests de coloration caractéristiques en vue de mettre en évidence les grands groupes chimiques. Elle a porté d'une part sur les extraits de décoction, éthanolique, aqueux et d'autres parts sur partitions des drogues des plantes répertoriées. Les différents groupes chimiques ont été caractérisés selon les techniques décrites dans les travaux de (Nemlin et Brunel, 1995 ; Békro et al., 2007 ; Bruneton, 2009). Les résultats sont classés selon : Présence : + ; Absence : -

### 5.1. Mise en évidence des alcaloïdes

#### Test d'iode :

Dans un tube à essai on met 3 mL de la solution d'extrait (de la plante) et on ajoute quelques gouttes de solution d'iode.

Le résultat positif est l'apparition d'une couleur bleue, qui disparaît à l'ébullition et réapparaît au refroidissement (Bhatt et Dhyani, 2012 ; Basumatary, 2016).

**Teste de Dragendorff :** Dans un tube à essai on met quelque ml de l'extrait avec 1 ou 2 ml du réactif de Dragendorff. Le résultat positif est l'apparition d'un précipité brun rougeâtre (Silva et al., 2017 ; Singh et Kumar, 2017).

### 5.2. Mise en évidence des sucres réducteurs

**Test de Fehling :** Dans un tube à essai on met 1 ml du extrait avec 1 ml de chacune des solutions de Fehling A et B, puis on bouilli au bain-marie.

Le résultat positif est l'apparition d'un précipité rouge (Silva et al., 2017).

### 5.3. Mise en évidence composés phénolique

**Test d'iode :** Dans un tube à essai, on met 1 mL d'extrait avec quelques gouttes de Sol d'iode dilué.

Le résultat positif est l'apparition d'une couleur rouge passagère (Singh et Kumar, 2017).

**Test d'eau chaude :** On met de l'eau chaude dans un bécher et on ajoute une partie de plante mature est trempée ensuite on réchauffe pendant une minute.

Le résultat positif est l'apparition d'un anneau de couleur noir ou marron à la jonction du trempage (Pooja & Vidyasagar, 2016).

---

#### **5.4.Mise en évidence des glycosides**

**Test de Borntrager modifié :** On met extrait de plante avec la solution de chlorure ferrique, puis on fait une ébullition de 5 min et on refroidi, ensuite on ajoute un volume égal de benzène. Puis la couche de benzène est séparée. Enfin on ajoute la solution d'ammoniaque.

Le résultat positif est l'apparition une solution de couleur rose à rouge sang(**Tiwari et al., 2011 ;Pandey et Tripathi,2014**).

#### **5.5.Mise en évidence des protéines et des acides amines**

**Test de Biuret :** Dans un tube à essai, on met 2 ml d'extrait avec une goutte de sol de sulfate de cuivre à 2 % et 1mL d'éthanol à 95% et des pastilles de KOH. Le résultat positif est l'apparition d'un sol de couleur rose (en couche éthanolique) (**Silvaet al., 2017 ;Raaman,2006**).

#### **5.6.Mise en évidence des flavonoïdes**

**Test de réactif alcalin :** Dans un tube à essai, on met 1mL d'extrait avec 2mL de solution NaOH à 2% (on ajoute quelques gouttes de l'HCl dilué). Le résultat positif est l'apparition d'une couleur jaune intense, devient incolore par addition d'acide dilué (**Audu et al.,2007 ;Singh et Kumar, 2017 ;Gul et al.,2017**).

#### **5.7.Mise en évidence des tanins**

**Test de Braymer :** Dans un tube à essai, on met 1 ml de l'extrait et on ajoute 3 ml de l'eau distillée et 3 gouttes de la solution de chlorure ferrique à 10 %.Le résultat positif est l'apparition d'une couleur bleu-vert (**Singh et Kumar, 2017 ;Uma et al.,2017**).

#### **5.8.Mise en évidence des saponines**

**Test d'huile d'olive :** Dans un tube à essai, on met l'extrait aqueux et on ajoute 5 ml d'eau distillée on secoue vigoureusement et on rajoute quelques gouttes d'huile d'olive (on secoue vigoureusement). Le résultat positif est l'apparition de la mousse (**Gul et al., 2017 ; Kumar et al.,2013**).

#### **5.9.Mise en évidence des quinones**

**Test de HCl concentré :** Dans un tube à essai, on met l'extrait de la plante avec de HCl concentré. Le résultat positif est l'apparition d'une couleur verte (**Basumatary, 2017**).

---

### 5.10. Mise en évidence des coumarines

**Test de NaOH:** Dans un tube à essai, on met l'extrait de plante avec du NaOH à 10% et du chloroforme. Le résultat positif est l'apparition d'une couleur jaune (**Kumar et al., 2018**).

### 5.11. Mise en évidence des huiles et graisses fixes

**Test ponctuel / Test de tache :** On presse une petite quantité d'extrait de plante entre les papiers filtres. Le résultat positif est l'apparition d'une tache d'huile sur le papier (**Raaman, 2006 ; Nanna et al., 2013**)

### 5.12. Mise en évidence des lignines

**Test de Labat :** Dans un tube à essai, on met la solution d'extrait avec de l'acide gallique. Le résultat positif est l'apparition d'une couleur vert olive (**Bhatt et Dhyani, 2012 ; Nanna et al., 2013**).

## 6 Détermination du rendement d'extractions

Le rendement d'extraction (%) est calculé par la formule ci-dessous :

$$R (\%) = (\text{Masse de l'extrait sec} / \text{Masse du matériel végétal utilisé}) * 100$$

## 7 Extraction liquide-liquide

Extrait brut sont repris dans 100 ml d'eau distillée obtenue subit à une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter parles solvants suivants :

### 7.1 Extraction par l'éther de pétrole :

L'éther de pétrole est un solvant polaire. Il permet d'extraire les alcaloïdes, les trapénoïdes, coumarines, acide gras. On ajoutés 100 ml de éther de pétrole à la phase aqueuse, ce procédé est répété 3 fois, après l'agitation et décantation, on récupère la phase organique supérieur (**Ben Hamida & Belmiloud , 2008**).

### 7.2 Extraction par chloroforme :

Le chloroforme est un solvant plus polaire que l'éther de pétrole. Il permet d'entraînes les composés naturels de faible polarités tels que les trapénoïdes, les graisses et la chlorophylle ainsi que les flavonoïdes aglycones. On ajoutés 100 ml de chloroforme à la phase aqueuse, ce procédé est répété 3 fois, après l'agitation et décantation, on récupère la phase organique inferieur dont la couleur est vert de menthe ((**Ben Hamida & Belmiloud , 2008**).

---

### 7.3 Extraction par l'acétate d'éthyle :

L'acétate d'éthyle est un solvant plus polaire que le chloroforme. Il permet d'extraire la majorité des hétérosides et flavonoïdes pourtant des groupements phénoliques. On ajoutés 100 ml de acétate d'éthyle à la phase aqueuse, ce procédé est répété 3 fois, après l'agitation et décantation, on récupère la phase organique supérieur dont la couleur est jaune (**Ben Hamida & Belmiloud , 2008**).

### 7.4 Extraction par n-butanol :

Le n-butanol est un solvant plus polaire que l'acétate d'éthyle, il permet d'extraire les alcaloïdes, les flavonoïdes, tanins et saponosides. On ajoutés 100 ml de n-butanol à la phase aqueuse, ce procédé est répété 3 fois, après l'agitation et décantation, on récupère la phase organique supérieur dont la couleur est rouge foncé

La phase organique de chaque solvant subit une évaporation à sec par le Rotavapeur pour éliminer le solvant utilisé (**Ben Hamida & Belmiloud , 2008**).

## 8 Analyses chromatographiques par CCM

**Principe :** Dans un support solide remplie d'un solvant (phase mobile) on place un mélange de composés qu'on souhaite séparer et que l'on appel phase stationnaire. Par capillarité, la phase mobile se déplace le long de la phase stationnaire (**Diallo, 2005**) et va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. L'identification des composés se fait selon la distance parcourus qu'on appelle rapport frontal RF (RF est le rapport de la distance de migration du composé par rapport à celle du solvant).

**Rapport frontal :** On appelle rapport frontal Rf d'une espèce chimique, le rapport entre la distance x parcourue par l'espèce et la distance y parcourue par l'éluant pendant le même temps. Rf dépend de la nature du produit, de l'éluant et de la phase fixe.

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue la substance } x}{\text{Distance parcourue le système } y}$$

### Mode Opérateur

#### Préparation de la plaque chromatographique :

Prendre une plaque d'aluminium recouverte de silice. Ne pas toucher avec les doigts. Découper avec un cutter une plaque. Tracer au crayon sans appuyer une ligne (ligne de dépôt)

---

à 1 cm du bord inférieur de la plaque ensuite, marquer légèrement au crayon sur cette ligne, l'emplacement du dépôt.

### **Préparation de la cuve :**

La cuve chromatographique doit être bien fermée et préparée à l'avance pour que l'atmosphère à l'intérieur soit saturée en vapeur les systèmes. Pour cela, sous la hotte, verser le système dans un bécher sec de 100 ml, sur une hauteur de ½ cm. Recouvrir la cuve pour notre cas, plusieurs les systèmes ont été testés :

- Système 1 : Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau : 8/1/0,5
- Système 2 : N-butanol / Acétate d'éthyle / Water : 5/1/0,5
- Système 3 : Toluène / Chloroforme / Méthanol : 4/4/1

### **Dépôt de l'échantillon :**

A l'aide d'une pipette pasteur, prélever une goutte d'un chaque extrait (extrait brut, extrait d'éther de pétrole, extrait de chloroforme, extrait d'acétate d'éthyle, extrait de n-butanol) et la déposer à l'emplacement marqué. Ensuite, laisser sécher avant d'effectuer un nouveau dépôt.

### **Elution :**

Lorsque les dépôts sont secs, introduire la plaque verticalement dans la cuve (la ligne de dépôt ne doit pas tremper dans système) et refermer. Au cours de système, l'éluant migre sur la plaque en imprégnant la silice. Après, retirer la plaque de la cuve avec des pinces, après le séchage de plaque La lecture des résultats des CCM se fait à l'aide d'une lampe UV (à 365 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés.

## **9 Analyses colorimétriques par spectrophotométrie**

### **1. Dosage des polyphénols totaux :**

#### **Principe**

Le test de Folin-Ciocalteu est couramment utilisé pour évaluer le TPC des produits naturels (Singleton et coll., 1999), avec quelques modifications. Ce test est basé sur l'oxydation des groupes phénoliques par les acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques (réactif FC). Après oxydation, l'absorbance d'un complexe vert-bleu peut être mesurée à 750 nm.

---

## Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode du Folin-Ciocalteu ,a 0,5ml de chaque extrait des plantes de concentration(0,1g /100ml), sont ajoutés respectivement 2ml de Folin-ciacolteu dilué au 1/10 dans l'eau distillée et 1,8ml de carbonate de sodium (7,5 % ) . Après 2 h d'incubation à température ambiante (37 °C) et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 750 nm .

le Blanc est composé de 2ml de Folin-ciacolteu dilué au 1/10 dans l'eau distillée, avec un de 1,8ml de Na<sub>2</sub> Co<sub>3</sub>, dans les mêmes conditions opératoires.

On prépare le test de standard (l'acide gallique) une solution 0,5mg/ml de l'eau à des concentrations allant de( 0 à 500mg/ml)

Le TPC a été calculé par la formule suivante:  $C = c * V / m$

Où: c ; est la concentration d'acide gallique, déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (mg /ml) V : est le volume de solution échantillon.

m : est le poids de l'échantillon dans le test (g).

## 2. Dosage des flavonoïdes

### Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée avec la méthode du trichlorure d'aluminium. L'AlCl<sub>3</sub> forme un complexe jaune avec les flavonoïdes qui absorbe dans le visible à 510 nm. Le flavonoïde utilisé comme référence dans cette méthode est le Quercetine .

### Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode du trichlorure d'aluminium. Ainsi 0,5 ml de chaque extraits des plantes de concentration (0,1g /100ml) , sont prélevés, auxquels sont ajoutés successivement 0,3ml de Nitrite de sodium , incube le mélange pendant 5 min, après 5 min on a ajouté 0,3 ml d' AlCl<sub>3</sub>(10%) puis 2ml NaOH et 1,9mL d'eau distillée . Après 15 min d'incubation à température ambiante (37 °C) et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 510 nm .

On prépare le Blanc est composé de 0,5 ml de solvant a versé 0,3 ml de NaNO<sub>2</sub> puis on a agité et on a incubé à 5 min et après on a ajouté 0,3 ml d'AlCl<sub>3</sub> et on a ajouté 2 ml de NaOH puis également on a agité 1,8 ml d'eau distillée et on a après l'agitation on a incube le mélange 15 min

On prépare le test de standard(Quercetine) une solution (0,1mg/10ml) de le MeOH ,à des concentrations allant de(0-10mg/ml) ,dans les mêmes conditions opératoires.

---

## 10 Activité antioxydants

### Test du DPPH

#### Principe

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité anti-radicalaire de l'extrait. La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence des extraits. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie.

Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatique (**Kelouila & Bouchentouf , 2018**).

#### Préparation de la solution DPPH :

A été préparé en dissolvant 2.4mg de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) en 2 ml du méthanol (CH<sub>3</sub>-OH) pour obtenir une solution de DPPH.

Nous prenons 1ml de cette solution et y ajoutons 24 ml de méthanol, où l'appareil de spectrophotométrie doit enregistrer l'intensité de l'absorbance 1.1 +/- 0.02 abs. La lecture de la densité optique à 517 nm. Laissez- le pendant 2 heures dans le noir

#### Mode opératoire

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH, selon le protocole décrit par(**Bursal & Gulcin, 2011**), Pour chaque échantillon végétal, on prépare une solution mère d'extrait de plante à 1 mg/ml, une gamme de concentration est préparée par double dilution successive. Puis à chaque concentration d'extrait on relevé un volume (50µl), un même volume de solution méthanolique de DPPH (1250µl) est ajouté , Le mélange est vigoureusement agité. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante (37 °C) et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 517 nm. On prépare le Blanc est composé de 50µl un méthanol avec un 1250µl solution méthanolique de DPPH, dans les mêmes conditions opératoires. Le standard (Trolox) est une solution (0.1mg/ml) de le MeOH , une gamme de concentration double dilution successive ( 0.1- 0.05 – 0.025 -0.0125 -0.0062- 0.0031-0.015mg/ml ). Est mesuré de la même façon que l'échantillon. L'activité de piégeage des radicaux libres de chaque solution a été calculée en pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante : **Inhibition = [(ABS blanc–ABS Sample)/ABS blanc] x 100**

**ABS blanc :** L'Abs blanc correspond à l'absorbance du blanc

**ABS Sample:** 'Abs échantillon représente l'absorbance des extraits des plantes

---

## *Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION*

## 1 Rendement d'extractions

Les résultats du rendement des extraits brut, éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme et n-butanol de *M. officinalis*. Et *D. Gnidium* sont mentionné au tableau suivant.

**Tableau 1:**Rendement d'extraction (%) d' *M. officinalis*. et *D. gnidium*.

Matière végétale 20g	Rendement (%)	
	<i>M.officinalis</i>	<i>D. gnidium</i>
Extrait Brut	28.5	39.5
Ether de pétrole	9.5	12.5
Acétate d'éthyle	10	11.5
Chloroforme	27	32

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité(Mohammdi,2013).





Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans la plante nous ont permis de calculer le rendement de différente fractions . Suivant le **tableau 1**, la fraction d'extrait brut présente le rendement le plus élevé pour les deux plantes ;pour *D. gnidium* était 39.5 %et pour *M. officinalis* était 28.5%, en comparaison avec les autres fractions, par contre le rendement le plus faible est enregistrée pour l'éther de pétrole dans *M.officinalis* et l'acétate d'éthyle dans *D.gnidium*.





## 2 Criblage phytochimique

Certains métabolites primaires et secondaires qui composent la plante ont été sélectionnés, nous permettant de connaître la phytochimie de la plante médicinale. C'est pourquoi nous avons fait des tests chimiques sur les deux plantes étudiées :*M. officinalis* et *D. gnidium*.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques de deux plantes étudiées *M. officinalis*.et *D. gnidium*. Mentionnés dans le **tableau 02**, montrant la présence des : Alcaloïdes, Sucres Réducteur, Composé phénolique, Saponines, Coumarines, Tannins, Glycosides, Lignanes, huiles et graisses fixes, Protéines et acides aminés (**Tableau 02**).

**Tableau 2:** Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre des deux plantes étudiées *M. officinalis* et *D. gnidium*

Métabolites	<i>M. officinalis</i>	<i>D. gnidium</i>	Résultat
Alcaloïdes	+++	+++	
Sucres Réducteur	+++	+++	
Composés phénolique	+	+	
Glycosides	+++	+++	

<p><b>Protéines et des Acides aminés</b></p>	<p>-</p>	<p>++</p>	
<p><b>Flavonoides</b></p>	<p>+++</p>	<p>++</p>	
<p><b>Tannins</b></p>	<p>+++</p>	<p>++</p>	
<p><b>Saponines</b></p>	<p>+</p>	<p>+</p>	

Quinones		+	
Coumarines	+	+++	
Huiles et graisses fixes	+++	+	
Lignanes	++	++	

Réaction très positive : +++ Réaction positive : ++ Réaction moyenne positive : + Test négative :-

---

La mise en évidence des alcaloïdes dans l'extrait d'infusion de deux plantes étudiées *M. officinalis* et *D. gnidium* est confirmée par l'apparition d'un précipité brun rougeâtre au contact avec le réactif Dragendorff (**Tableau 02**).

La présence des Tannins est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique qui donnant une coloration bleu-vert dans les deux plantes étudiées *M. officinalis* et *D. gnidium*(**Tableau 02**).

Le test positive des Flavonoïdes nous a montré leur présence dans l'extrait éthanolique de deux plantes étudiées *M. officinalis* et *D. gnidium* avec une apparition d'une couleur jaune intense, devient incolore par addition d'acide dilué (**Tableau 02**).

Les tests phytochimique réalisés ont montré l'absence des Quinones dans la plante étudiées *M. officinalis*.(**Tableau 02**).

Selon **Oka et al. (1998)** et **Schieber et al. (2005)**, les feuilles de la mélisse contiennent les différents composants du métabolisme secondaires, les flavonoïdes, les glycosides, et anthocyanine, les alcaloïdes, les tannins.

Dans notre travail, cette présence est très marquée au niveau des feuilles. Selon **Mohammedi (2013)**, le screening phytochimique réalisé sur les feuilles de *D. gnidium* de Tlemcen a révélé la présence des polyphénols, flavonoïdes et les tannins, tandis que l'étude mené par **Boughrara (2016)**, sur *D. gnidium*. Récolté d'El Kala à mise en évidence la présence des alcaloïdes.

### 3 Analyses chromatographiques par CCM

Il s'agit d'un screening des groupes phytochimiques par chromatographie sur couche mince. Les éléments de cette méthode chromatographique sont consignés dans les **tableaux 03 et 04** et **figures 05 et 06**.

Dans la plante *M. officinalis* et d'après nos résultats et selon **Markham (1982)**, in **Akroum (2011)**, le screening phytochimique réalisé dans notre travail confirme la richesse de la plante en flavonoïdes et aussi leur présence sous différentes formes, flavones et flavonols qui pouvaient être sous forme aglycone, monoglycosylée, biglycosylée, triglycosylée.

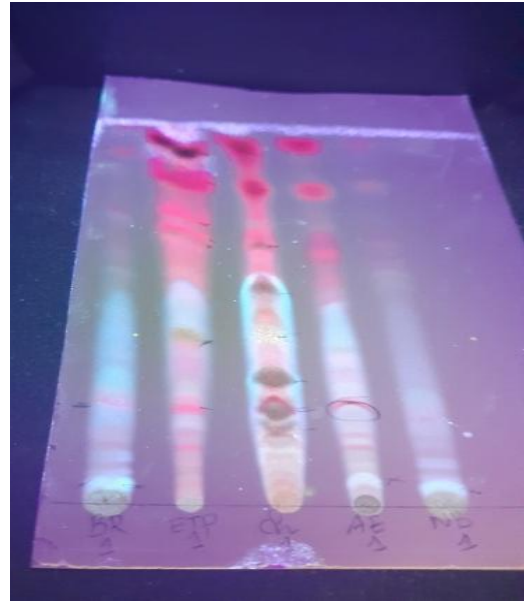
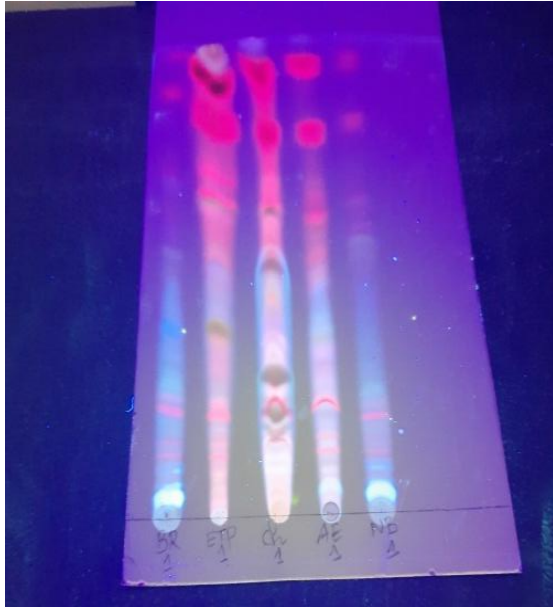
Dans la plante *D. gnidium*: les bandes de fluorescence bleu correspondraient aux acides phénols ou à la présence de coumarines selon **Diallo(2005)**, Tandis que celle colorées en brun correspondraient aux flavonols et flavones selon **Dahou et al., (2003)**. Selon nos résultats de la chromatographie sur couche mince et selon le screening phytochimique de *D. gnidium*. Apparaît que la plante contient des acides phénols, flavonoïdes, et coumarines

**Tableau 3** : éléments de la Chromatographie sur Couche Mince (groupes phytochimiques) de la *M.officinalis*

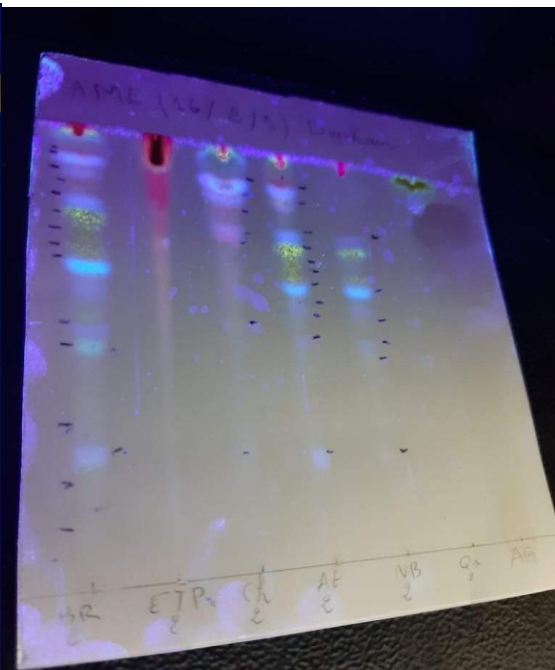
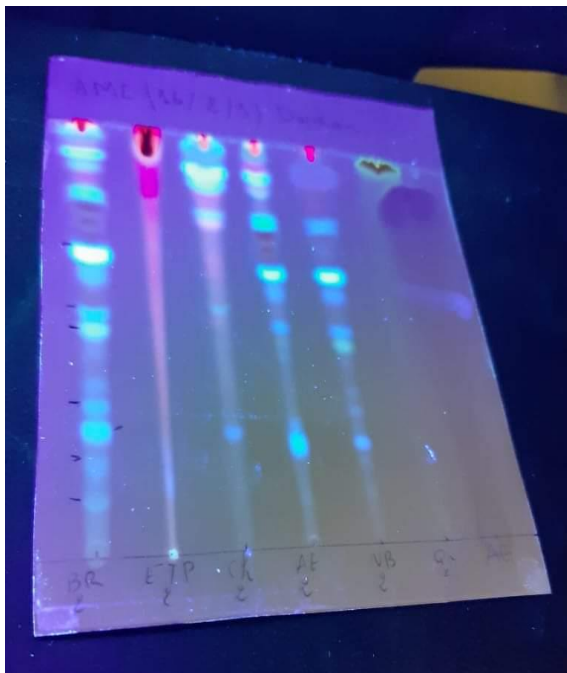
Extrait	Phase mobile	Révélation	Interprétation
<b>Extrait brut</b>	Toluène / Chloroforme / Méthanol 4/4/1	Sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,05):Acide phénol; -Violet (RF:0,11):Flavons; -Rouge (Rf:0,21):Anthocyanidine
		Réactif d'ALCL3	-Bleu fluorescent (Rf:0,05):Flavonols, Flavons, Isoflavones, Flavonones;
<b>Ether de pétrole</b>	Toluène / Chloroforme / Méthanol 4/4/1	sans traitement UV 365 nm	-Rouge (Rf:0,13 ; 0,21 ; 0,63 ; 0,67 ; 0,79) : Anthocyanidine -Marron (RF:0,34 ; 0,60):Coumarines
		Réactif d'ALCL3	-Rouge (Rf:0,13 ; 0,21 ; 0,63 ; 0,67 ; 0,79) : Anthocyanidine -Marron (RF:0,34 ; 0,60):Coumarines
<b>Chloroforme</b>	Toluène / Chloroforme / Méthanol 4/4/1	sans traitement UV 365 nm	-Rouge (Rf: 0,79) : Anthocyanidine -Marron (RF:0,16 ; 0,26 ; 0,47):Coumarines
		Réactif d'ALCL3	- Jaune (RF :0,47) : Flavonols
<b>Acétate d'éthyle</b>	Toluène / Chloroforme / Méthanol 4/4/1	sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,05):Acide phénol -Rouge (RF:0,21 ; 0,79):Anthocyanidine
		Réactif d'ALCL3	-Bleu (RF:0,05):Acide phénol -Rouge (RF:0,21 ; 0,79):Anthocyanidine
<b>N-butanol</b>	Toluène / Chloroforme / Méthanol 4/4/1	sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,05):Acide phénol -Rouge (RF:0,17):Anthocyanidine
		Réactif d'ALCL3	-Bleu (RF:0,05):Acide phénol -Rouge (RF:0,17):Anthocyanidine

**Tableau 4 :** éléments de la Chromatographie sur Couche Mince (groupes phytochimiques) de la *D.gnidium*.

Extrait	Phase mobile	Révélation	Interprétation
<b>Extrait brut</b>	Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau : 8/1/0,5	Sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,26;0,52;0,82):Acide phénol - Vert clair (RF:0,31):Flavonoïdes -Jaune (RF:0,48):Flavonols -Bleu ciel (RF:0,67;0,92):Flavonoïde -Maron (RF:0,71, 0,74, 0,78):coumarines -Violet (RF:0,87):Flavons -Rouge (Rf:0,94):Anthocyanidine
		Réactif d'ALCL3	-Bleu (RF:0,26;0,82;0,92):Acide phénol -Vert (Rf:0,48):Flavonols, Flavonones, Aurones; -Mauve (RF:0,52;0,61):Anthocyanidine ; -Jaune (RF:0,56;0,71;0,74;0,78):Flavonols; -Bleu ciel (RF:0,67):Flavonoïde; -rouge (Rf:0,87;0,94):Anthocyanidine
<b>Ether de pétrole</b>	Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau : 8/1/0,5	sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,30):Acide phénol
		Réactif d'ALCL3	-Bleu (RF:0,30):Acide phénol
<b>Chloroforme</b>	Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau : 8/1/0,5	sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,23;0,54;0,78;0,88;0,92):Acide phénol; -Mauve (RF:0,47;0,83):Anthocyanidine
		Réactif d'ALCL3	-Mauve (RF:0,74;0,83):Anthocyanidine; -Bleu (0,78;0,88;0,92):Acide phénol; -Jaune (RF:0,99) : Flavonols
<b>Acétate d'éthyle</b>	Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau : 8/1/0,5	sans traitement UV 365 nm	-Bleu (RF:0,26;0,50;0,59;0,64;0,79;0,92):Acide phénol -Marron (RF:0,71;0,74;0,78):Coumarines -Violet (Rf:0,87):Flavons -Rouge (RF:0,94):Anthocyanidine
		Réactif d'ALCL3	-Bleu (RF:0,26;0,50;0,59;0,79;0,92):Acide phénol Jaune(RF:0,46;0,71;0,74;0,78,0,87;0,98): Flavonol -Bleu fluorescent (Rf:0,64):Flavonols, Flavons, -Isoflavones, Flavonones; -Rouge (RF:0,94):Anthocyanidine
<b>N-butanol</b>	Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau : 8/1/0,5	sans traitement UV 365 nm	-Bleu(RF:0,26;0,52;0,66;0,79):Acide phénol -Jaune (RF:0,48):Flavonols -Violet (RF:0,56):Flavons
		Réactif d'ALCL3	-Bleu (RF:0,26;0,52;0,66):Acide phénol -Jaune (RF:0,48;0,68;0,74):Flavonols -Mauve (Rf:0,81):Anthocyanidine



**Figure 6:**CCM de *M.officinalis* avant et après révélation

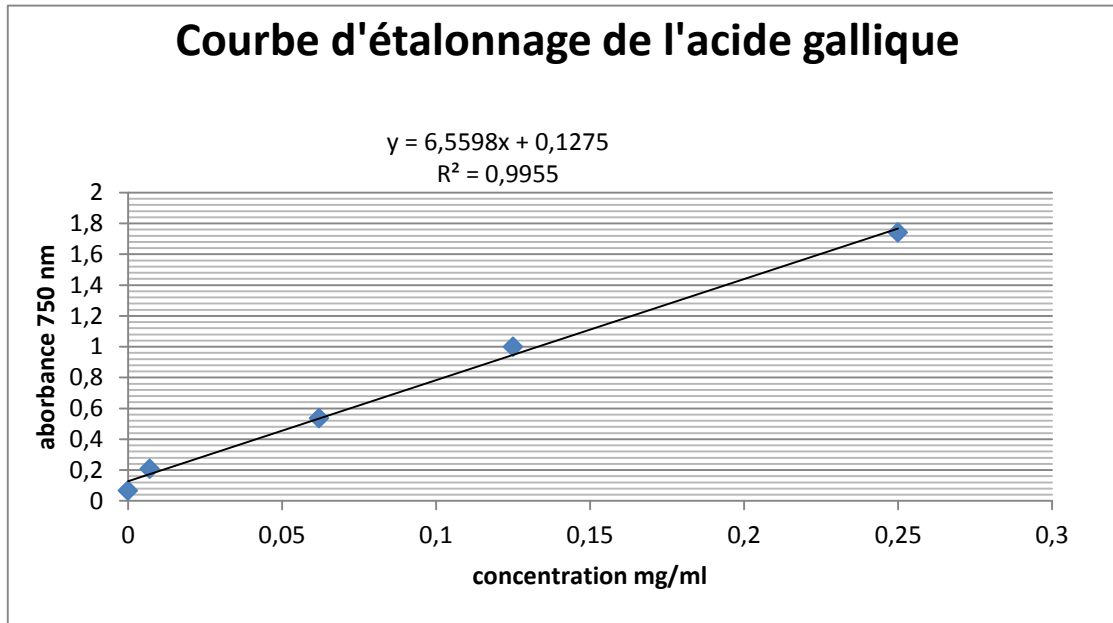


**Figure 7:**CCM de *D. gnidium* avant et après révélation

## 4 Analyses colorimétriques par spectrophotométrie

### 4.1 Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu les plus utilisés, la Teneur phénolique totale exprimée en milligrammes d'équivalents acide gallique (EAG) par gramme d'extrait (mg EAG / g Ex), les résultats obtenus à partir d'une courbe d'étalonnage, ayant l'équation :  $y = 6.5598x + 0.1275$  ;  $R^2 = 0,9955$

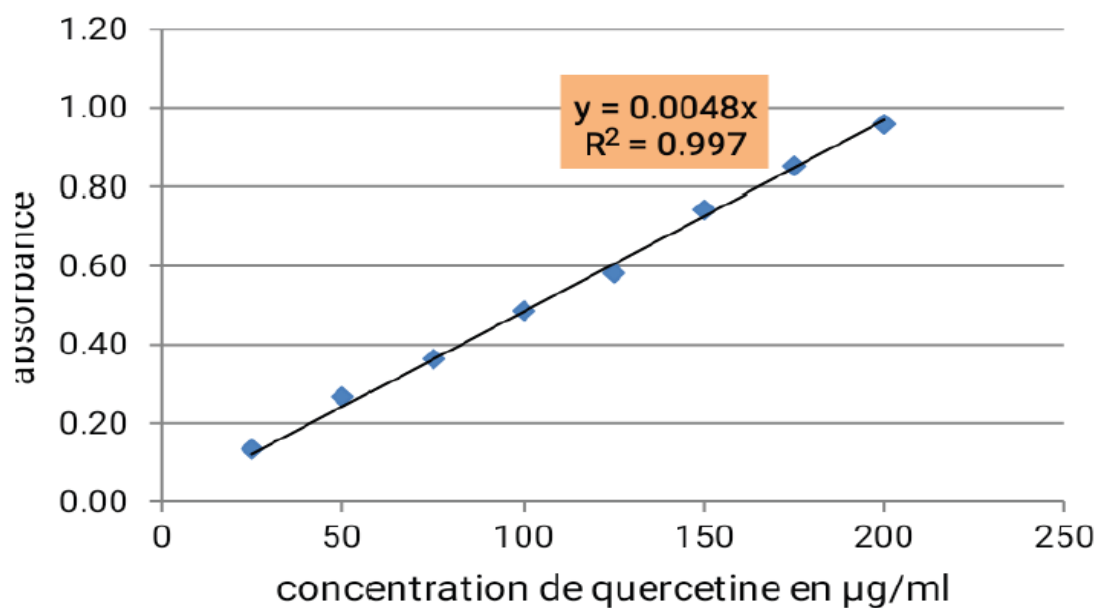


**Figure 8:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

Les résultats des polyphénols totaux de deux plantes montrent des teneurs proches et varient de 1.875mg (EAG/g Ex) et de 7.5mg (EAG/g Ex) pour l'*M. officinalis* et *D. gnidium* respectivement. Pour les deux plantes étudiées *M.officinalis* et *D. gnidium* nous nous sommes remarquables une variabilité des teneurs en phénols totaux. La teneur élevée est constatée dans *D. gnidium* (7.5mg EAG/g Ex), mais dans *M. officinalis* la teneur est un peu moindre (1.875mg (EAG/g de Ex).

### 4.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes, dans les extraits est exprimée en microgrammes équivalent quercétine par milligramme de d'extrait ( $\mu\text{g EQ/g Ex}$ ), les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'extrait, ayant  $y=0.0048$  ;  $R^2=0.997$

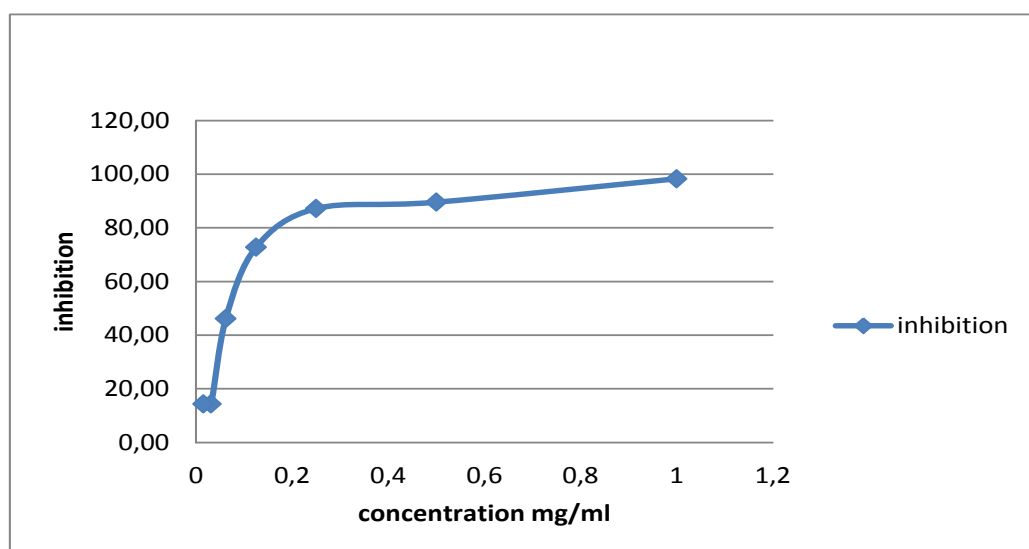


**Figure 9:** Courbe d'étalonnage de quercetine pour les dosages des flavonoïdes

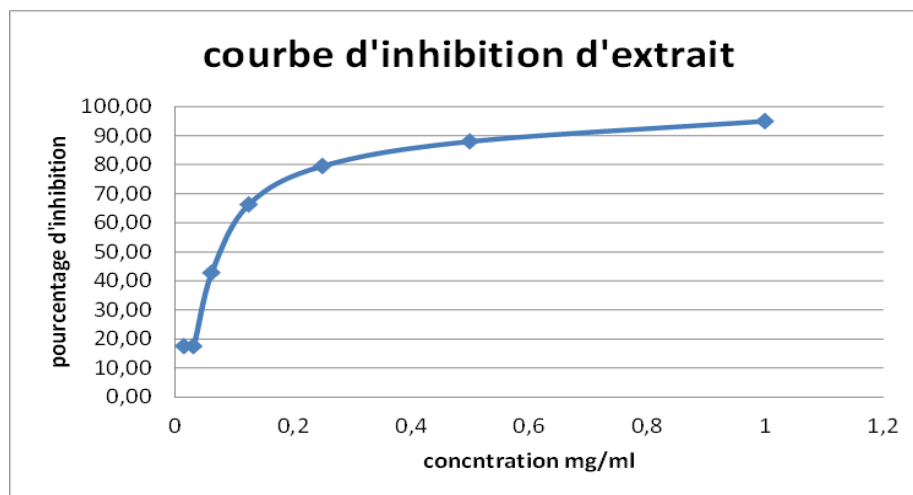
Les résultats des teneurs flavonoïdes de deux plantes montrent des teneurs varies de 5.27µg EQ/mg Ex) et de 4.5µg EQ/mg Ex) pour l'*M.officianlis* et *D.gnidium* respectivement.

### 4.3 Activité antioxydante

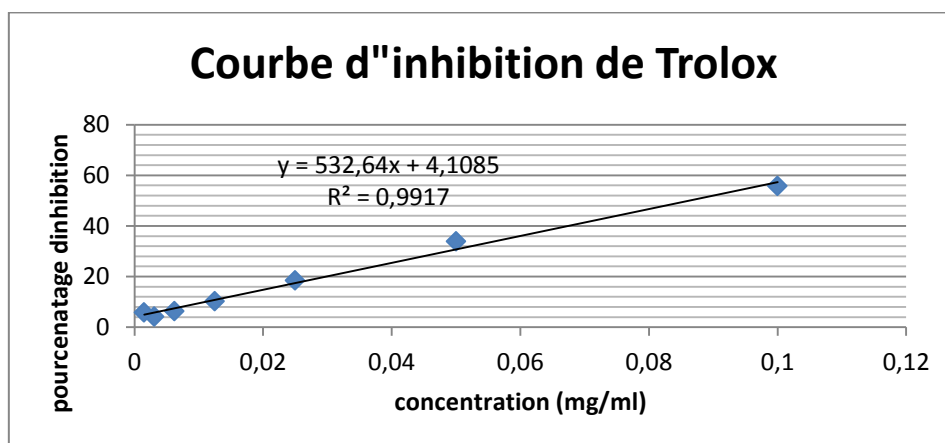
L'activité antioxydante des différentes plantes de *D. gnidium* .et *M. officinalis* été évaluée par spectrophotométrie, mesurable à 517 nm. Les courbes d'activité antioxydante sont exprimées en pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de différentes plantes utilisées et de Trolox pris comme antioxydant de référence (**figure 10**).



**Figure 10:** Inhibition du DPPH de la plante *D. gnidium*



**Figure 11 :** Inhibition du DPPH de la plante *M.officinalis*



**Figure 12:** Courbe d'étalonnage d'inhibition de Trolox

Nos extraits de *M. officinalis* et de *D. gnidium* ont montré une bonne activité antioxydante (0,17mg /ml) et (0,14mg/ml) respectivement par rapport au standard (Trolox)(0,08mg/ml) en termes de IC50. À partir de ces résultats et d'après les premières étapes de notre travail (étude phytochimique : CCM , Dosage ) , on peut déduire qu'il y a une corrélation significative entre la présence des polyphénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits.

D'après (Van et al.,1995). Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants, susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R\*), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (Fl-o) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable(Jovanovic et al.,1995).

---

# Conclusion



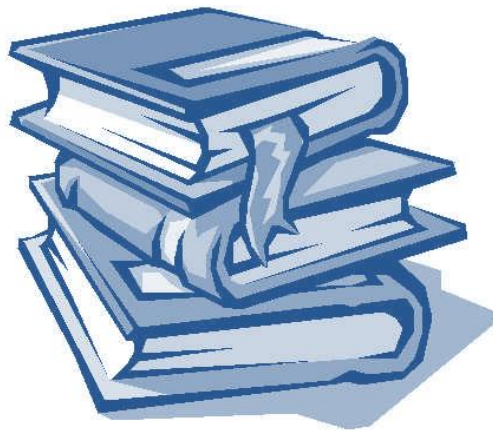
---

## Conclusion

Les plantes médicinales contiennent une énorme richesse biologique qui leur permet de fournir de nombreux traitements, le nombre de produits naturels obtenus à partir de plantes a maintenant atteint plus de 100000 et chaque année de nouveaux composés chimiques sont découverts. L'objectif de ce travail consistait à la caractérisation phytochimique, la valorisation et la détermination d'activité antioxydant des extraits actifs de deux plantes étudiées (*M. officinalis* et *D. gnidium*). Qualitativement, les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence sur le matériel végétal broyé de deux plantes étudiées la présence des alcaloïdes, sucres réducteur, composées phénolique, glycosides, flavonoïdes, tannins, saponines, coumarines, huiles et graisse fixes, lignanes dans les plantes étudiées. Le résultat de la chromatographie sur couche mince (CCM) montre que l'extrait éthanolique de *M. officinalis* et *D. gnidium* contient des acides phénols, flavons, anthocyanidine, flavonols, isoflavones, flavonones, coumarines. La teneur des phénols totaux, et des flavonoïdes est variable entre les deux plantes étudiées. Le teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans *D. gnidium*, elle est de l'ordre de 7.5 mg EAG/g Ex, puis *M.officinalis* avec une teneur de 1.875 mg EAG/g Ex. Concentration des flavonoïdes nous avons observé des teneurs rapprochées en flavonoïdes dans les deux plantes étudiées (*M. officinalis* et *D. gnidium* ), elles représentent une valeur de 5.27 µg EQ/mg Ex et 4.5µg/mg Ex , respectivement. L'activité antioxydante des extraits des deux plantes est évaluée par l'étude de leurs pouvoir a piégé le radical libre DPPH, les résultats montre que l'extrait de *D.gnidium* et *M.officinalis* concentration (0,14mg/ml 0,17mg/ml) possède une bonne activité antioxydante. Pour développer cette étude, il est nécessaire de mener les activités antibactériennes et anti-inflammatoires des extraits de *Mélissa officinalis* L et *Daphne gnidium* L.

---

## *Références bibliographiques*



---

**Abedini, A. (2013).** *Evaluation Biologique Et Phytochimique Des Substances*. These De Doctorat, Université Lille2.

**Basumatary, A. (2016).** Preliminary Phytochemical Screening Of Some Compounds From Plant Stem Bark Extracts Of *Tabernaemontana Divaricata* Linn. Used By Bodo Community At Kokrajhar District, Assam, India. *Basumatary Ar. Preliminary Phytochemical Screening Of Some Compounds From Plant Stem Bark Extracts Of Tabernaemontana Divaricata Archives Of Applied Science Research*, 8(8), 47-52.

**Birdane, Y., Büyükokurog, M., Birdane, F., Cemek, M., & Yavuz1, H. (2007).** Anti-Inflammatory And Antinociceptive Effects Of *Melissa Officinalis* L. In Rodents. *158(2)*, 75-81.

**Chaouki, W., Leger, D., Liagre, B., Cherrah, Y., Beneytout, J.-L., & Hmamo, M. (2009).** Roots Of *Daphne Gnidium* L. Inhibit Cell Proliferation And Induce Apoptosis. *64(8)*, Pp542.

**Rogers, Z. (2009).** *A World Checklist Of Thymelaeaceae (Version 1)*. Missouri Botanical Garden, St. Louis.

**Tihboussine, K. (2020).** *Interactions Plantes Médicinales-Médicaments :Enquête Au Niveau Du Service De Médecine Interne A A L'hôpital Militaire D'instruction Mohammed V*. Docteur En Pharmacie, Université Mohammed V De Rabat.

**Zaidi, A., Bukhari, S., Khan, F., Noor, T., & Iqbal, N. (2015).** Ethnobotanical, Phytochemical And Pharmacological.

**Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., & Benjelloun, W. (1997).** Phytotherapy Of Hypertension And Diabetes In Oriental Morocco. *Journal Of Ethnopharmacology*, 58, 45-54.

*Larousse Des Plantes Médicinales..* (2001).

*Guide Illustré De La Flore Algérienne .* (2011).

**Abderrazak, M., & Joël, R. (2007).** *La Botanique De A A Z*. (Dunod, Éd.) Paris.

**Ameni, D. (2015).** *Effets Antioxydants Des Extraits De La Plante Médicinale Daphne Gnidium L. Utilisée En Algérie*. Doctorat En Sciences, Université Ferhat Abbas Sétif 1.

**Anthoula, A. (2003).** *Plantes Aromatiques Et Médicinales. Strategie Et Politique Agricole*. Direction Des Etudes Et De La Coordination.

**Atefeibu, E. (2002).** *Contribution A L'etude Des Tannins Et De L'activité Antibacterienne D'acasia Nilotica Var Andesonii*. Université Cheikh Anta Diop Dakar .

**Audu, S., Mohammad, I., & Kaita, H. (2007).** Phytochemical Screening Of The Leaves Of *Lophira Lanceolata* (Ochanaceae). *Life Science Journal*, 4(4), 75-79.

**Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V., & Arnason, J. (2007).** Effects Of Traditionally Used Anxiolytic Botanicals On Enzymes Of The  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (Gaba) System. *Canada Journal Of Physiology And Pharmacology*, 85 N° 9: 933-942.

**Badiaga, M. (2011).** *Etude Ethnobotanique, Phytochimique Et Activités Biologiques De Nauclea Latifolia Smith, Une Plante Médicinale Africaine Récoltée Au Mali*. Thèse De Doctorat, Université De Bamako.

- Beat , M. (2013).** La Phytothérapie – La Base Bien Documentée.
- Békro Y.A., B. J. (2007).** Etude Ethnobotanique Et Screening Phytochimique De *Caesalpinia Benthamiana* (Baill.). *Sciences Et Nature*, 4, 217-225.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., & Younos, C. (1991).** Repertory Of Standard Herbal Drugs In The Moroccan Pharmacopoea. *Journal Of Ethnopharmacology*, 35, 123-143.
- Belouad, A. (2005).** *Plantes Médicinales D'algerie*. Alger: Office Des Publication Universitaire.
- Beloued, A. (2001).** *Plantes Medicinales D'algerie* . Alger: 5.
- Beunton, J. (2009).** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales* (Ed. 4 Ed). Lavoisier.
- Beverly C.D. Et Sudarsanam G. (2011).** Ethnomedicinal Plant Knowledge And Practice Of People Of Javadhu Hills In Tamilnadu. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, 1(1), 79-81.
- Bhatt , S., & Dhyani , S. (2012).** Preliminary Phytochemical Screening Of *Ailanthus Excelsa* Roxb. *International Journal Of Current Pharmaceutical Research*, 4(1), 87-89.
- Blot, N., & Bernard Gouillier, B. (2012).** *Atlas Illustré Des Plantes Médicinales Et Curatives*. Paris: De Borée.
- Borris, R., Blasko , P., & Cordell , G. (1998).** Ethnopharmacologic And Phytochemical Studies Of The Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol*, 24, 41-91.
- Borris, R., Blaskó, G., & Cordell, G. (1988).** Ethnopharmacologic And Phytochemical Studies Of The. *Journal Of Ethnopharmacology*, 24, 41-91.
- Boughrara, B. (2016).** *Inventaire Et Etude Ethnobotanique Et Chimique Des Plantes A Intéret Thérapeutique Et Nutritif De Parc Nationale El-Kala*. Université: Badji Mokta, Annaba.
- Bounihi, A., Hajjaj, G., Alnamer, R., Cherrah, Y., & Zellou, A. (2013).** In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity Of *Melissa Officinalis* L. Essential Oil. *Adv Pharmacol Sci*.
- Brickell, C., & Mathew, B. (1976).** *Daphne: The Genus In The Wild And In Cultivation - Alpine Garden Society Guide* (Éd. 1é). Alpine Garden Society.
- Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie Phytochimie, Plantes Médicinales* (Vol. P 310). (T. E. Lavoisier, Éd.)
- Bursal, E., & Gulcin, I. (2011).** Polyhenol Contents And In Vitro Antioxydant Activites Of Lyophilised Aqueous Extract Of Kiwifruit (*Actinidia Deliciosa*). *Food Research International*, 44, 1482-1489.
- Carnat, A., Carnat, A., Fraisse , D., & Lamaison, J. (1998).** The Aromatic And Polyphenolic Composition Of Lemon Balm (*Melissa*. *Pharmaceutics Acta Helvetiae*(72), 301-305.
- Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris , C., Casu, M., Pompei, R., Et Al. (2001).** Antimicrobial Evaluation Of Coumarins And Flavonoids From The Stems Of *Daphne Gnidium* L. 8(4), Pp. Pp. 302–305.
- Dimitrova, Z., Dimov, B., Manolova, N., Pancheva, S., Ilieva, D., & Chichkov, S. (1993).** Antiherpes Effect Of *Melissa Officinalis* L. *Acta Microbiol Buig*, 29, 65-72.
- El Fennouni, M. (2012).** *Les Plantes Reputees Abortives Dans Les Pratiques Traditionnelles D'avortement Au Maroc*.

- Gravot, A. (2008).** *Introduction Au Métabolisme Secondaire Chez Les.* Equipe Pédagogique Physiologie Végétale., Université De Rennes 1 – L2 Ue Phr.
- Gul, R., Jan, S., Syed, F., Sherani, F., & Nusrat, J. (2017).** Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis Of Alkaloids, And Antioxidant Activity Of Crude Plant Extracts From Ephedra Intermedia Indigenous To Balochistan. *The Scientific World Journal*, 1-7.
- Hamel , T., Sadou , S., Seridi , R., Boukhdir , S., & Boulemtafes , A. (2018).** Pratique Traditionnelle D'utilisation Des Plantes Médicinales Dans La Population De La Péninsule De L'edough (Nord-Est Algérien). *Ethnopharmacologia*, 59, 75.
- Hedi Harizi Et Al. (2011).** Inhibition Of Proinflammatory Macrophage Responses And Lymphocyte Proliferation In Vitro By Ethyl Acetate Leaf Extract From Daphne Gnidium. *Cellular Immunology*, 267, 94–101.
- Hosseinzadeh , S., Jafarikukhdan, A., Hosseini , A., & Armand , R. (2015).** The Application Of Medicinal Plants In Traditional And Modern Medicine: A Review Of Thymus Vulgaris. *International Journal Of Clinical Medicine*, 6, 635-642.
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cumarin2.Svg>. (S.D.).
- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoid\\_Basis.Svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoid_Basis.Svg). (S.D.).
- J.-L.Guignard, F. (2012).** *Botanique Les Familles De Plantes.* 15 Edition.
- Jain, P., & Joshi, H. (2012).** Coumarin: Chemical And Pharmacological Profile. *Journal Of Applied Pharmaceutile*.
- Jovanovic, S., Steenken, S., Tasic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. (1994).** Flavonoids As Antioxdants. *J.Am.Chem.Soc*, 116(11), 4846-4851.
- Kelouila , A., & Bouchentouf , Z. (2018).** *Polyphenoles Et Activite Antioxydante De L'aloé Vera.*
- Knaggs, A. R. (2003).** The Biosynthesis Of Shikimate Metabolites. *Natural Product Reports*, 20, 119-136.
- Kumar , R., Venkateshwar, C., Samuel , G., & Rao , S. (2013).** Phytochemical Screening Of Some Compounds From Plant Leaf Extracts Of Holoptelea Integrifolia (Planch.) And Celestrus Emarginata (Grah.) Used By Gondu Tribes At Adilabad District, Andhrapradesh, India. *Nternational Journal Of Engineering Science Invention*, 2(8), 65-70.
- Kumar, R., Sharma , S., & Devi, L. (2018).** Investigation Of Total Phenolic, Flavonoid Contents And Antioxidant Activity From Extract Of Azadirachta Indica Of Bundelkhand Region. *International Journal Of Life Sciences And Scientific Resesrch*, 4(4), 1925-1933.
- Létard, J.-C., Canard, J.-M., Costil, V., Dalbiès, P., Grunberg, B., Lapuelle, J., Et Al. (2015).** Phytothérapie – Principes Généraux. 5(1), 29-35.
- Lutge , U., Kluge , M., & Bauer, G. (2002).** *Botanique* (Ed. 3ème Edition). Paris: Technique Et Documentation.
- Mauro, N. M. (2006).** *Synthèse D'alcaloïdes Biologiques Actifs: La (+)- Anatoxine Et La ( - )- Camptothécine.* Thèse De Doctora: Chimie, Université Joseph Fourier Grenoble I.
- Max Wichtl Et Robert Anton. (2003).** *Plantes Thérapeutiques.* Paris: Editions Tec&Doc.

- 
- Mazzanti, G., Battinelli, L., Pompeo, C., Serrilli, A., Rossi, R., Sauzullo, I., Et Al. (2008).** Inhibitory Activity Of Melissa Officinalis L. Extract On Herpes Simplex Virus Types 2 Replication. *Naturel Product Research*, 22, 1433-1440.
- Mohammedi, Z. (2013).** *Etude Phytochimique Et Activités Biologiques.*
- Molyneux, P., & Songklanakarin, J. (2004).** The Use Of The Stable Radical Diphenylpicrylhydrazyl (Dpph) For Estimating Antioxidant Actovity. *Sciences Technology*, 26(2):211-219.
- Nemlin , J., & Brunel , J. (1995). *Fascicule De Travaux Pratiques De Matière Médicale (3e Année).* Université Nationale De Côte-D'ivoire.
- Oka, N., Ikegami, A., Ohki, M., Sataka, K., Yagi, A., & Watanabe, N. (1998).** Citronellyl Disaccharide Glycoside As An Aroma Precursor From Rose Flowers. *Phytochemistry*, P: 1527-1529.
- Pandey, A., & Tripathi. (2014).** Concept Of Standardization, Extraction And Pre Phytochemical Screening Strategies For Herbal Drug. *Journal Of Pharmacognosy And Phytochemistry*, 2(5), 115-119.
- Pooja , S., & Vidyasagar, G. (2016).** Phytochemical Screening For Secondary Metabolites Of Opuntia Dillenii Haw. *Journal Of Medicinal Plants Studies*, 4(5), 39-43.
- Quézel, P., & Santa, S. (1962).** Nouvelles Flore D'Algérie Et Des Régions Désertiques Méditerranéennes. *Cnrs*, 2, 1170.
- Raaman, N. (2006).** Phytochemical Techniques. *New India Publishing Agency, New Delhi*, 19-24.
- Rauf , A., Rehman , W., Jan , M., & Muhammad , M. (2013).** Phytochemical, Phytotoxic And Antioxidant Profile Of Caralluma Tuberculata N.E. Brown. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 2(2), 21-25.
- Sari , A., & Ceylan, A. (2002).** Yield Characteristics And Essential Oil Composition Of Lemon Balm. *Turk J Agric For*, 217 -224.
- Schieber, A., Mihalev, K., Berardini, N., Mollov, P., & Carle, R. (2005).** Flavonol Glycosides From Distilled Petals Of Rose Damascena Mill. P: 379-384.
- Silva Go, A. A. (2017).** Extraction Methods, Qualitative And Quantitative Techniques For Screening Of Phytochemicals From Plants. *American Journal Of Essential Oils And Natural Products*, 5(2), 29-32.
- Singh V, K. R. (2017).** Study Of Phytochemical Analysis And Antioxidant Activity Of Allium Sativum Of Bundelkhand Region. *International Journal Of Life Sciences Scientific Research*, 3(6), 1451-1458.
- Sofowora, A. (2010).** *Plantes Médicinales Et Médecine Traditionnelle D'afrique.* (Karthala, Éd.)
- Tiwari , P., Kumar , B., Kaur , M., Kaur , G., & Kaur , H. (2011).** Phytochemical Screening And Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98- 106.
- Uma, K., Parthiban, P., & Kalpana, S. (2017).** Pharmacognostical And Preliminary Phytochemical Screening Of Aavaarai Vidhai Chooranam. *Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*, 10(10), 111-116.
- Valnet, D. J. (2003).** *Phytothérapie* (Éd. 6édition). Paris: Vigot.

- 
- Van, A., Tromp, M., Haenen, G., Van, D., Vijgh, W., & Bast, A. (1995).** Flavonoids As Scavengers Of Nitric Oxide Radical. *Biochemical And Biophysical Research*, 214(3), 755-9.
- Vivas De Gaulejac, N. (2001).** *Vin Et Santé. Les Bases Scientifiques Du French Paradox.*Féret.
- Wolbling, R., & Léonhardt, K. (1994).** Local Therapy Of Herpes Simplex With Dried Extract From Melissa Officinalis. *Phytomedicine*, 1(1), 25-31.