



N° d'Ordre : 80 /2020

Formation Doctorale : RNE2D

Discipline : Chimie

Spécialité : Gestion et Valorisation des Bioressources

**Laboratoire : Laboratoire d'Ingénierie d'Electrochimie de Modélisation
et d'Environnement (LIEME)**

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

EL YOUSFI Kamal

Enquête ethnobotanique, Étude phytochimique et Activités biologiques de Cinq Plantes médicinales

Soutenue le 24 / 12 / 2020 devant le jury composé de :

Pr. TALEB Mustapha	FSDM-Fès	Président
Pr. ABDELLAOUI Abdelfattah	FSDM-Fès	Rapporteur
Pr. EL BACHIRI Ali	FS-Oujda	Rapporteur
Pr. ECHCHGADDA Ghizlane	ENA-Meknès	Rapporteur
Pr. BENCHEIKH Rachid	FST-Fès	Examineur
Pr. MISBAHI Houria	FST-Fès	Co-directrice de thèse
Pr. GRECHE Hassane	FST-Fès	Directeur de thèse

Remerciements

Il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui, grâce à leur aide précieuse, ont permis la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Professeur **Greche Hassane** (directeur de thèse) Professeur de l'université Sidi Mohammed Ben Abdellah.

Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements pour avoir accepté de codiriger ce travail.

A Madame le Professeur **Misbahi Houria** (co-directeur de thèse) Professeur de l'université Sidi Mohammed Ben Abdellah.

Je lui adresse tous mes sincères remerciements pour ses conseils et ses orientations tout au long de ce travail.

A Monsieur le Professeur **Mustapha Taleb** (président de thèse) Professeur de l'université Sidi Mohammed Ben Abdellah.

Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être président de ce jury de thèse.

Aux membres de jury.

Je vous remercie sincèrement pour avoir pris le temps de lire et juger cette thèse, pour vos remarques avisées et vos nombreux conseils.

Je voudrais aussi remercier tous mes amis (es) et mes collègues qui m'ont aidé, soutenu et supporté tout au long de ce travail.

Et enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille pour son soutien et sa confiance tout au long de ce travail.

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, une étude ethnobotanique de cinq plantes (*Daphne gnidium* L, *Origanum elongatum*, *Cistus salvifolius*, *Cistus laurifolius* et *Thymus willdenowii*. Boiss) a été réalisée dans la caïdat de Beni Ammart (Al Hoceïma) du mois de septembre au mois de décembre 2015. Les résultats obtenus montrent que parmi les trois familles recensées, la *Lamiaceae* est la famille la plus sollicitée d'un point de vue ethnobotanique. Le feuillage, le fruit et les graines constituent les parties les plus utilisées, la décoction, la macération et l'infusion sont les formes galéniques les plus pratiquées. Concernant les maladies traditionnellement traitées par ces plantes, on cite les affections respiratoires, les affections digestives et les affections dermatologiques.

L'étude phytochimique a concerné l'analyse qualitative et quantitative par la révélation des composés phénoliques et la détermination de la teneur en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, quant aux teneurs en flavonoïdes, ils sont évalués par la méthode au trichlorure d'aluminium. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits méthanolique, hexanique, acétate d'éthyle et dichlorométhane par les méthodes de piégeage du radical libre (*DPPH*), la capacité antioxydante totale (*CAT*) et le test de blanchissement de β -carotène, a montré que les extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle d'*O. elongatum*, *C. salvifolius* et *C. laurifolius*, manifestent le pouvoir antioxydant le plus élevé par rapport aux autres extraits. L'extrait méthanolique d'*O. elongatum* a exprimé la meilleure activité antiradicalaire ($IC_{50} = 0,267 \pm 0,06$ mg/ml). Les extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle d'*O. elongatum*, *C. salvifolius* et *C. laurifolius*, expriment aussi une activité vasodilatatrice plus prononcée que chez les deux autres plantes ou avec d'autres types de solvants.

L'analyse spectroscopique (*UV/VIS*), des extraits de *C. salvifolius*, *O. elongatum* et *D. gnidium* a manifesté une absorbance importante dans l'ultra-violet, de 250 à 450 nm, comparablement avec des fractions de référence utilisées pour la protection contre les radiations ultraviolettes.

Mots clés : Enquête ethnobotanique, Etude phytochimique, Activités antioxydante et vasodilatatrice, chromatographie (*CC*), spectrophotomètre (*UV/VIS*).

Abstract

As part of the development of natural resources, an ethnobotanical study of five plants (*Daphne gnidium* L, *Origanum elongatum*, *Cistus salvifolius*, *Cistus laurifolius* and *Thymus wilddenowii*. Boiss) was carried out in the caidat of Beni Ammart (Al Hoceima) from September to December 2015. The results obtained shows that among the three families identified, from an ethnobotanical point of view, *Lamiaceae* is the richest among them. Foliage, fruit and seeds are the parts most used. Decoction, maceration and infusion are the most used dosage forms. Concerning the diseases treated by these plants; we can cite respiratory, digestive and dermatological diseases.

The phytochemical study concerned the qualitative and quantitative analysis using the revelation of phenolic compounds and the determination of their total polyphenol contents by the Folin-Ciocalteu method, as for the flavonoid contents it has been evaluated using the aluminum trichloride method. The evaluation of the antioxidant activity of the methanolic, hexanic, ethyl acetate and dichloromethane extracts has been carried out by the (*DPPH*) free radical scavenging methods, the total antioxidant capacity (*TAC*), beta carotene bleaching assay have shown that the methanolic and ethyl acetate extracts of *O. elongatum*, *C. salvifolius*, *C. laurifolius*, exhibit a greater antioxidant power than the other extracts. The methanolic extract of *O. elongatum* expressed the best anti-free radical activity ($IC_{50} = 0.267 \pm 0.06 \text{ mg / ml}$). The methanolic and ethyl acetate extracts of *O. elongatum*, *C. salvifolius*, *C. laurifolius*, exhibit also a more pronounced vasodilator activity than in the other two plants or with other types of solvents.

Spectroscopic (UV/VIS) analysis of aqueous extracts of *C. salvifolius*, *O. elongatum* and *gnidium* showed a high absorbance in ultraviolet, from 250 to 450 nm, compared with reference fractions used for protection against ultraviolet radiation.

Keywords: Ethnobotanical survey, Phytochemical study, Antioxidant and vasodilator activities, chromatographic (*CC*), spectrophotometer (*UV / VIS*).

في إطار تنمية الموارد الطبيعية، أجريت دراسة نباتية (إثنوبوتانيك) لخمس نباتات (*Daphne gnidium*، *Thymus willdenowii*، *Boiss* و *Cistus laurifolius*، *Cistus salvifolius*، *Origanum elongatum*) في قيادة بني عمارت إقليم الحسيمة في الفترة الممتدة من شهر شتنبر إلى شهر دجنبر من سنة 2015. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن من بين العائلات الثلاث المدرجة، العائلة النباتية (*Lamiaceae*) هي الأكثر تداولاً لدى الساكنة في الطب التقليدي بينما تعتبر أوراق النباتات والفاكهة والبذور هي الأجزاء الأكثر استخداماً، أما بالنسبة لأكثر أشكال الجرعات شيوعاً نجد الشكل المغلي و النقع والتسريب. فيما يتعلق بالأمراض التي يتم علاجها تقليدياً بهذه النباتات، نجد أمراض الجهاز التنفسي وأمراض الجهاز الهضمي والأمراض الجلدية.

إهتمت الدراسة الكيميائية النباتية بالتحليل النوعي والكمي عن طريق الكشف عن المركبات الفينولية وتحديد محتوى البوليفينول الكلي بطريقة (*Folin-Ciocalteu*)، أما بالنسبة لمحتويات الفلافونويد، فتم تقييمها عن طريق استخدام ثلاثي كلورور الأومنيوم. في حين تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الميثانول والهكسان وإيثيل أسيتات وثنائي كلورور الميثان بواسطة طرق إزالة الجذور الحرة (*DPPH*) والقدرة الكلية المضادة للأكسدة و (*CAT*) واختبار تبييض البيتاكاروتن (*β-carotène*). وقد أظهرت النتائج أن مستخلصات الميثانول وإيثيل أسيتات للنباتات (*O. elongatum* و *C. salvifolius* و *C. laurifolius*) لها أعلى قوة مضادة للأكسدة مقارنة بالمستخلصات الأخرى. بين إختبار إزاحة جذر (*DPPH*) أن مستخلص الميثانول لنبته (*O. elongatum*) يملك أعلى قدرة إزاحية (مغ/مل) $IC_{50} = 0.267 \pm 0.06$ كما أظهرت أيضاً مستخلصات الميثانول وإيثيل الأسيتات لنباتات (*O. elongatum* و *C. salvifolius* و *C. laurifolius*) عن نشاط موسع للأوعية أكثر وضوحاً مقارنة مع النبتتين المتبقيتين أو مع أنواع أخرى من المذيبات.

كشفت التحليل الطيفي (*UV / VIS*) لمستخلصات (*O. elongatum* و *C. salvifolius* و *D. gnidium*) امتصاصاً كبيراً في الأشعة فوق البنفسجية، من 250 إلى 450 نانومتر، مقارنة مع الكسور المرجعية المستخدمة في الحماية من الأشعة فوق البنفسجية.

الكلمات المفتاح: علم النباتات (إثنوبوتانيك)، دراسة كيميائية نباتية، أنشطة مضادات الأكسدة وموسع الأوعية، كروماتوجرافيا (CC)، مقياس الطيف الضوئي (*UV / VIS*).

Liste des abréviations

μg : Microgramme
4HR: 4-hexylresorcinol
A : Absorbance
A.E : Acétate d'éthyle
Ach : Acétylcholine
ADN : Acide désoxyribonucléique
 AlCl_3 : Trichlorure d'aluminium
ANOVA : Analyse de la variance
AVC: Accident vasculaire cérébral
B : Bande
BHA:Butylhydroxyanisole
BHT:Butylhydroxytoluène
BMDM : Butylmethoxydibenzoylméthane
C: *Cistus*
 ^{13}C : Carbone 13
CAT: catalase
CC:Chromatographie sur colonne
CCM : Chromatographie sur couche mince
 CO_2 : Dioxyde de carbone
CPG: Chromatographie en phase gazeuse
D : *Daphne*
DHBB : Diethylamino hydroxybenzoyl hexylbenzoate
DPPH:2,2-diphényl picrylhydrazyl
EAG:Etalonnage acide gallique
EQ:Etalonnage quercétine
Ex: Extrait
GPx: Glutathion peroxydase
H : Hydrogène
 $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$:Acide phosphomolybdique
 $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$:Acide phosphotungstique

HE : Huiles Essentielles

HPLC : Chromatographie liquide haute pression

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

IR : Infra-rouge

KCl : Chlorure de potassium

LDL : lipoprotéine de faible densité

LOX : Lipoxygénase

LVM:lit vasculaire mésentérique

M : Masse

mg : Miligramme

mmHg : Millimètre de mercure

Mo : Molybdène

N : Nord

NaCl : Chlorure de sodium

NDGA: Acide nordihydroguaiaretique

nm : Nanomètre

O: *Origanum*

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OMS : Organisation Mondiale de la santé

PABA: Acide para-aminobenzoïque

PAM : Plante Aromatique et Médicinales

PG: Gallate de propyle

PHE : Phényléphrine

PP : Pression de perfusion

PPS: produit de protection solaire

R:Rendement

RGPH : Recensement général de la population et de l'habitat

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RO· : Radical alkoxy

ROH: Alcool

ROO· : Radicaux peroxy

ROOH : Hydroperoxydes lipidiques

ROS : Espèce oxygénée réactive

RPE : Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique

SM : Spectroscopie de masse

SOD:Super- Oxyde dismutase

TBHQ:Tertiarybutylhydroquinone

THBP:trihydroxybutyrophenone

T : Thymus

TO° : Radical tocophéryle

TOH : Tocophérol

UVA : Ultra-violette A

UVB : Ultra-violette B

UV-vis: Ultra-Violet visible

vit-C: Vitamine C

vit-E: Vitamine E

% : Pourcentage

Liste des figures

Figure 1 : <i>Daphne gnidium</i> de Beni Ammart.....	9
Figure 2: <i>Origanum elongatum</i> de Beni Ammart.....	11
Figure 3: <i>Cistus salvifolius</i> de Beni Ammart.....	12
Figure 4: <i>T. willdenowii</i> Boiss de Beni Ammart.....	14
Figure 5 : <i>Cistus laurifolius</i> de Beni Ammart.....	15
Figure 6 : Quelques composés naturels à activités antioxydantes	23
Figure 7: Structure de la vitamine E	24
Figure 8 : Structure de la vitamine C	25
Figure 9 : Structure du β -carotène	26
Figure 10 : Structure du resvératrol	27
Figure 11 : Structure générale du noyau des flavonoïdes	31
Figure 12 : Noyau de base des coumarines.....	31
Figure 13 : Réaction du DPPH avec un polyphénol.	37
Figure 14 : Localisation du lieu ethnobotanique de la Caïdat Beni Ammart.....	45
Figure 15 : Répartition des enquêtés selon le genre	47
Figure 16 : Profil des enquêtés en fonction de la tranche d'âge	48
Figure 17 : Répartition de la population selon la situation familiale.....	49
Figure 18 : Répartition de la population selon le niveau de scolarisation	49
Figure 19 : Répartition de la population selon la situation sociale	50
Figure 20 : Répartition des enquêtés utilisant les plantes seules ou en associations	53
Figure 21 : Doses utilisées des espèces végétales.....	58
Figure 22 : nombre de prise par jour.....	60
Figure 23 : Résultat de traitement par les plantes étudiées.....	61
Figure 24 : Fréquences des effets toxiques des espèces végétales.....	63
Figure 25: Schéma de l'extracteur Soxhlet.....	72
Figure 26 : Protocole d'extraction des feuilles de <i>D. gnidium</i> par Soxhlet.	73
Figure 27: Sonde immergée dans l'échantillon Figure 28:l'appareil de sonication	74
Figure 29: Structure de l'acide gallique.....	76
Figure 30: structure de quercétine.....	77
Figure 31: Teneur en eau dans les Plantes étudiées.....	78
Figure 32 : Rendements d'extraction de la <i>D. gnidium</i> par les deux méthodes d'extraction	80
Figure 33: Rendements de l'extraction par sonication pour les cinq plantes	81
Figure 34 : Courbe d'étalonnage d'Acide galique	84
Figure 35 : Courbe d'étalonnage du Quercétine	84

Figure 36 : Teneurs en polyphénols des extraits <i>O. elongatum</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>T. willdenowii</i> et <i>C. laurifolius</i>	87
Figure 37 : Teneurs en flavonoïdes des extraits <i>O. elongatum</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>T. willdenowii</i> <i>C. laurifolius</i>	88
Figure 38 : Pouvoir antioxydant des extraits de <i>D. gnidium</i> , (n=3).....	93
Figure 39 : IC ₅₀ des extraits de <i>D. gnidium</i> par sonication et par Soxhlet, (n=3).....	94
Figure 40: Pouvoir d'inhibition antioxydant des extraits de quatre plantes	95
Figure 41 : IC ₅₀ des plantes des quatre plantes	96
Figure 42 : Capacité antioxydante totale des différents extraits : a) <i>O. elongatum</i> . b) <i>C. laurifolius</i> . c) <i>T. willdenowii</i> . d) <i>D. gnidium</i> . e) <i>C. salviifolius</i> à différentes concentrations (p<0.05 ; n=3).....	99
Figure 43 : Pourcentages d'inhibition des différents extraits méthanolique d' <i>O.elongatum</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. laurifolius</i> , <i>D. gnidium</i> et de la (BHT) à différentes concentrations pour le test de blanchissement de β-carotène	102
Figure 44 : Les valeurs d'IC ₅₀ des différents extraits méthanoliques pour le test de blanchissement de β-carotène (p<0.05) (n=3).	103
Figure 45 : Photo du rat Wistar anesthésie est placé en décubitus b) Ouverture de la cavité abdominale et perfusion du (LVM) [170].	106
Figure 46 : Lit mésentérique mis en évidence par une perfusion colorée par du bleu de méthylène.....	106
Figure 47 : Ensemble du montage utilisé lors de la perfusion du lit mésentérique	107
Figure 48 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>D. gnidium</i>	108
Figure 49 : Effet vasodilatateur de l'extrait méthanolique d' <i>O elongatum</i>	109
Figure 50 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle d' <i>O elongatum</i>	109
Figure 51 : Effet vasodilatateur de l'extrait de méthanol de <i>C. salviifolius</i>	110
Figure 52 : Effet vasodilatateur des extraits méthanoliques d' <i>O. elongatum</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. laurifolius</i> et Ach sur (LVM)	112
Figure 53 : Protocole de préparation des extraits aqueux bruts	117
Figure 54 : Etapes de macération et de filtration des parties des plantes étudiées	118
Figure 55 : Etapes de Séparation et différentes analyses chromatographiques par colonne des extraits des plantes étudiées	120
Figure 56 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice.	121
Figure 57 : Les 2 bandes caractéristiques d'un squelette flavonique.....	122
Figure 58 : Les fractions des extraits par chromatographie par colonne	126
Figure 59 : Les spectres d'absorption en UV/VIS d'extrait aqueux des feuilles et des tiges d' <i>O. elongatum</i>	127
Figure 60 : Série spectrale d'absorption en UV/VIS d'extrait aqueux de feuilles des deux fractions d'acétone a) <i>D. gnidium</i> et b) <i>O. elongatum</i> . Les extraits sont dilués dans le méthanol (2mg/100ml)	130

- Figure 61 : Série spectrale d'absorption en UV/VIS d'extrait aqueux de feuilles des deux fractions de *C. salvifolius* a) d'acétone et b) n-butanol. Les extraits sont dilués dans le méthanol (2mg/100ml) 131
- Figure 62 : Spectre d'absorption en UV/VIS d'extraits méthanoliques des variétés de teinte solaire ; a : 009 iderm ramadan Esclalol solaire, b : 010 iderm ramadan Esclalol solaire teinte Les extraits sont dilués dans méthanol (2mg/100ml)..... 133

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution des exportations en Kg des de Thym et d'Origan séchées.....	18
Tableau 2 : Evolution des exportations en Dirhams de Thym et d'Origan séchées.....	18
Tableau 3 : Structure des squelettes des polyphénols.....	28
Tableau 4 : répartitions des espèces végétales sur la zone d'étude.....	47
Tableau 5 : Les espèces végétales utilisées.....	51
Tableau 6 : La saison de floraison des espèces végétales.....	51
Tableau 7 : Les parties utilisées des espèces végétales.....	52
Tableau 8 : Types d'usage des espèces végétales.....	53
Tableau 9 : Types d'affections traitées.....	55
Tableau 10 : Modes de préparations des espèces végétales.....	56
Tableau 11 : Formes d'emplois des espèces végétales.....	57
Tableau 12 : Modes d'administrations des espèces végétales.....	59
Tableau 13 : Durée d'utilisation des espèces végétales.....	60
Tableau 14 : Effets secondaires causées par les espèces végétales.....	62
Tableau 15 : Précautions d'emplois des espèces végétales.....	63
Tableau 16 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques des stations d'étude.....	70
Tableau 17 : Rendements des extraits par deux méthodes d'extraction.....	79
Tableau 18 : : Résultats de révélation phytochimique qualitative des plantes étudiées ...	82
Tableau 19: Quantité des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de <i>D. gnidium</i> pour les deux méthodes d'extraction.....	85
Tableau 20 : IC ₅₀ des extraits obtenus par sonication des plantes.....	96
Tableau 21 : Matrice de corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols des extraits méthanoliques d' <i>O. elongatum</i>	104
Tableau 22 : Matériel végétal étudié et saison de récolte.....	116
Tableau 23 : Rendement des plantes selon la saison de récolte.....	123
Tableau 24 : Résultats des rendements des différentes éluions des trois plantes.....	124
Tableau 25 : Résultats d'UV des fractions.....	129

Table des matières

Remerciements	1
Résumé.....	2
Abstract.....	3
ملخص	4
Liste des abréviations	5
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	11
Objectifs	17
Introduction Générale	1
Partie 1 : Etude bibliographique	4
Choix des plantes.....	5
I. Présentation des familles et des plantes étudiées.....	5
1.Présentation des familles étudiées.....	5
1.1 Famille de <i>Thymelaeaceae</i>	5
1.2 Famille des <i>Lamiaceae</i>	6
1.3 Famille de <i>Cistaceae</i>	7
2. Présentation des plantes étudiées	8
2.1 <i>Daphne gnidium</i>	8
1.1 <i>Origanum elongatum</i>	10
1.2 <i>Cistus salviifolius</i>	12
1.3 <i>Thymus willdenowii</i> Boiss	13
1.4 <i>Cistus laurifolius</i>	15
II. Aspect économique du secteur des plantes médicinales et aromatiques.....	16
1. Au niveau international.....	16
2. Au niveau marocain.....	16
2.1 Production nationale des PAM.....	17
2.2 Exportations marocaines en feuilles séchées	17
2.3. Exportations marocaines en huiles essentielles et extraits aromatiques	18
3. Au niveau du Caidat de Beni Ammart.....	19
3.1 Exploitation de Thym et d'Origan séchées au Caidat de Beni Ammart	19

3.2 Stratégie de développement du secteur des PAM.....	19
III. Généralité sur les antioxydants.....	20
1. Définition des radicaux libres	20
2. Origine des radicaux libres	20
3. Effets négatifs des radicaux libres	20
4. Stress oxydant.....	21
5. Définition des antioxydants.....	21
6. Mécanisme d'action des antioxydants.....	22
7. Antioxydants synthétiques	22
8. Antioxydants naturels.....	23
9. Antioxydants enzymatiques	24
10. Antioxydant d'origine végétale.....	24
10.1. La vitamine E ou tocophérol.....	24
10.2. La vitamine C ou acide ascorbique.....	25
10.3. Caroténoïdes ou β -carotène.....	26
10.4. Composés phénoliques.....	27
IV. Techniques d'extraction, de séparation et d'analyse des métabolites secondaires	32
1. Techniques d'extraction	32
2. Techniques de separation	34
3. Techniques d'analyse	35
V. Activités biologiques.....	36
1. Activité antioxydante	36
2. Activité vasodilatatrice	37
VI. Produits de protection solaire.....	39
1. Ecrans solaires.....	40
 Partie 2 : Travaux expérimentaux.....	 42
Chapitre I : Enquête ethnobotanique.....	43
I. Matériel et Méthodes.....	44
1. Présentation de la zone d'étude	44
2. Méthodologie	45

II. Résultats	46
1. Prospection	46
2. Lieu	46
3. Description de la population	47
2.1. Tranches de genre	47
2.2. Tranches d'âges	48
2.3. Situation familiale	48
2.4. Niveau scolaire	49
2.5. Situation sociale.....	50
3. Espèces végétales étudiées	50
3.1. Noms vernaculaires.....	50
3.2. Saison de floraison	51
3.3. Parties utilisées	51
3.4. Plante seule, association possible	52
4. Types d'usage	53
5. Médecine traditionnelle	54
5.1. Types de maladies	54
5.2. Modes de préparation.....	56
5.3. Forme d'emploi	57
5.4. Dose utilisée	58
5.5. Mode d'administration	58
5.6. Posologie : nombre de prise par jour	59
5.7. Durée d'utilisation.....	60
5.8. Résultat du traitement	61
5.9. Effets secondaires.....	62
5.10. Toxicité.....	63
5.11. Précaution d'emploi	63
III. Discussion	64
1. Description des interviewés	64
2. Usages des espèces étudiées	65
Chapitre II : Etude phytochimique	69
I. Matériel et Méthodes	69

1. Matériel végétal.....	70
1.1 Collecte et conservation	70
2. Méthodes d'extraction	71
2.1 Extraction par Soxhlet	71
2.2 Extraction par sonication.....	73
2.3 Calcul de Teneur en eau.....	74
2.4 Calcul du rendement	75
II. Étude phytochimique.....	75
1. Analyse qualitative.....	75
1.1 Révélation des polyphénols	75
2. Analyse quantitative	76
2.1 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux	76
III. Résultats et discussion.....	77
1. Taux d'humidité	77
2. Rendements des extractions	78
1.1 Extraction par Soxhlet et sonication.....	78
1.2 Comparaison du rendement de <i>D. gnidium</i> par deux méthodes d'extraction	79
1.3 Rendement d'extraction des cinq plantes par sonication	80
3. Etude phytochimique.....	82
1.1 Phytochimie qualitative.....	82
1.2 Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes.....	83
Chapitre III :Activités biologiques (Antioxydante et vasodilatatrice)....	91
I. Test de l'activité antioxydante.....	92
1. Piégeage du radical libre <i>DPPH</i>	92
1.1 Matériel et Méthodes.....	92
1.2 Résultats et discussion.....	93
2. Capacité antioxydante totale (<i>CAT</i>)	97
2.1 Matériel et Méthodes.....	97
2.2 Résultats et Discussion	98
3. Test de blanchissement de β -carotène.....	100
3.1 Matériel et Méthodes.....	100
3.2 Résultats et discussion.....	101

II. Activité vasodilatatrice	105
1. Matériel et Méthode.....	105
2.1 Le lit vasculaire mésentérique isolé	105
2.2 Préparation du lit vasculaire mésentérique	105
2. Résultats et Discussion.....	108
2.1 Daphne gnidium	108
2.2 Origanum elongatum	108
2.3 Cistus salviifolius	110
2.4 Thymus willdenowii Boiss.....	110
2.5 Cistus laurifolius.....	110
2.6 Effet vasodilatateur des extraits actifs.....	111
Chapitre IV : Séparation et analyse des extraits étudiés.....	115
I. Matériel et Méthodes.....	116
1. Matériel végétal.....	116
2. Méthode d'extraction.....	117
2.1 Extraction par macération à froid	117
3. Technique de séparation	118
3.1 Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	118
4. Méthode physico-chimique	121
4.1 Spectrophotométrie UV/ Vis.....	121
II. Résultats et Discussion.....	122
1. Rendement d'extraction	122
2. Séparation sur colonne	123
3. Propriétés physico-chimiques	126
4. Données spectroscopiques UV	127
5. Comparaison de l'allure des spectres des fractions étudiés et de références	132
Conclusion générale	135
REFERENCES.....	137
Annexe 1.....	154

Objectifs

Objectif général

Valorisation de cinq plantes médicinales à savoir (*D. gnidium*, *O. elongatum*, *C. salvifolius*, *T. willdenowii* Boiss, *C. laurifolius*) au niveau de la région d'AL Hoceima, par la recherche de différents métabolites secondaires et leurs activités pharmacologiques.

Objectifs spécifiques

C'est dans cette optique que se situe notre étude dont les objectifs spécifiques se résument dans les volets suivants :

- Connaitre les éventuels usages thérapeutiques des cinq espèces chez la population locale.
- Extraire des métabolites secondaires des feuilles des espèces étudiées, afin d'estimer leurs teneurs en composés phénoliques par une étude phytochimique qualitative et quantitative.
- Evaluer le pouvoir antioxydant et la capacité vasodilatatrice des extraits des plantes collectées.
- Isoler et analyser les différents métabolites contenus dans les espèces de (*D. gnidium* *O. elongatum* et *C. salviifolius*) et s'ouvrir sur une éventuelle propriété physique (rempart anti-UV)

Introduction Générale

Depuis des siècles, l'être humain a su développer ses connaissances sur l'utilisation des plantes médicinales sous plusieurs formes à savoir les tisanes, les infusions ou les décoctions afin de soulager les douleurs et de préserver sa santé. Encore il y a environ près de 300 mille espèces de plantes à fleur sur terre, mais moins de 10% de ces espèces auraient été étudiées scientifiquement pour leurs propriétés pharmacologiques [1].

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2008, plus de 80% de la population dans les pays en développement, faisaient appel à la médecine traditionnelle et la phytothérapie pour leurs soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne. Les plantes étaient et sont toujours une source d'inspiration pour de nouveaux médicaments. Déjà 70% de nos médicaments proviennent directement des plantes. L'ethnobotanique s'est avérée une des approches les plus fiables pour la découverte de nouveaux médicaments [2].

Le Maroc, riche par sa biodiversité végétale et son climat constitue un véritable réservoir phytogénétique, ce qui lui confère une place privilégiée parmi les pays méditerranéens de point de vue ressources en plantes médicinales endémiques. Par ailleurs l'analyse de la bibliographie médicinale marocaine montre que plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'inventaire et l'identification des espèces végétales utilisées comme remèdes dans différentes régions [3-14].

En principe les vertus et les effets pharmacologiques des plantes médicinales reviennent à leurs métabolites secondaires. Ce sont généralement des petites molécules (polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, ...), produites en petites quantités, non nécessaires à la vie de la plante mais indispensables à sa survie car elles ont des rôles de défenses et d'adaptation à l'environnement. A titre d'exemple on trouve les antioxydants naturels dont le rôle principal est de protéger contre les réactions des radicaux libres. La valorisation des plantes médicinales implique donc la détermination de leur composition par des techniques d'analyses physico-chimiques dans le but d'identifier les substances responsables de leurs activités biologiques. L'obtention de ces molécules nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction, l'isolement et l'identification. Un des enjeux

majeurs de la chimie analytique consiste donc à l'innovation technologique et le développement des nouvelles méthodologies d'extraction, de séparation rapide, d'identification et d'analyse.

Selon les résultats d'une enquête socio-économique réalisée sur la médecine traditionnelle au Maroc, 71 % des personnes interrogées utilisent les plantes médicinales et aromatiques pour se soigner [15]. Cependant, plusieurs problèmes en relation avec l'utilisation des plantes médicinales d'une façon traditionnelle risquent d'exposer la santé à des maladies et à des accidents graves. Parmi ces problèmes, la diversité et la complexité des noms vernaculaires qui rend difficile l'identification des plantes à utiliser, les posologies et la durée d'utilisation ne sont pas précises et varient d'un herboriste à l'autre, l'utilisation de la même plante pour plusieurs affections désignées comme une seule maladie, les produits utilisés sont généralement mal conservés et de mauvaise qualité ce qui risque de les rendre toxiques. Pour cela, des études phytochimiques et des activités biologiques sont faites dans le but d'une validation scientifique des usages traditionnels de cinq plantes de la région d'AL Hoceima.

Notre travail de recherche s'inscrit dans le cadre de la valorisation chimique et biologique des plantes médicinales. Il s'intéresse principalement à la recherche des antioxydants naturels en étudiant la phytochimie et les propriétés antioxydantes d'origine végétale, ainsi de déterminer les familles de molécules responsables de potentiel pharmacologique. On s'est intéressé à l'exploration de quelques parties aériennes de cinq plantes médicinales (*Daphne gnidium*, *Origanum elongatum*, *Cistus salvifolius*, *Cistus laurifolius*, et *Thymus willdenowii*. Boiss) récoltées au caïdat de Beni Ammart dans la province d'Al Hoceima, connue par la richesse de sa biodiversité végétale. En parallèle, une enquête ethnobotanique a été réalisée pour compléter notre étude. Ce manuscrit sera présenté sous forme de deux grandes parties.

- La première partie relative à l'étude bibliographique, dans laquelle nous avons donné un aperçu général, sur les espèces de plantes étudiées, antioxydants, et les activités biologiques antioxydante et vasodilatatrice, ainsi que les produits de protections contre les radiations UV.

-
- Une deuxième partie, réservée aux travaux expérimentaux, subdivisée en quatre chapitres :
- Le premier chapitre est consacré aux enquêtes ethnobotaniques dans la Caïdat de Beni Ammart, province d'Al-Hoceima, ayant permis de recueillir l'ensemble des informations liées aux applications thérapeutiques traditionnelles des cinq plantes étudiées.
 - Le deuxième chapitre concerne les tests phytochimiques qualitatifs et quantitatifs des différents extraits obtenus à partir des plantes étudiées, en se basant sur des études phytochimiques décrites dans la littérature.
 - Le troisième chapitre est consacré aux activités biologiques à savoir l'activité antioxydante et l'activité vasodilatatrice afin de valoriser les extraits préparés et pouvoir identifier la fraction comportant le principe actif.
 - En fin, le quatrième chapitre de ce travail est dédié à la séparation des fractions mères des extraits de plantes par chromatographie sur colonne et de les analyser par spectrophotométrie UV/VIS dans le but de les comparer avec des fractions de référence utilisées pour la protection contre les radiations ultraviolettes.

Partie 1 : Etude bibliographique

Choix des plantes

Le choix des cinq espèces est bien ciblé, d'une part elles sont fréquemment utilisées en médecine traditionnelle par la population du caïdat de Beni Ammart, d'autre part, ces espèces végétales furent la cible de plusieurs études antérieures documentées dans la littérature.

I. Présentation des familles et des plantes étudiées

1. Présentation des familles étudiées

1.1 Famille de *Thymelaeaceae*

La famille de *Thymelaeaceae* est composée d'environ 1200 espèces réparties en 67 genres. Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées, des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques particulièrement en Afrique du nord, tandis qu'ils sont absents dans les régions aux climats les plus froids [16].

Les *Thymelaeaceae* sont connus parmi les familles toxiques par leur teneur en esters diterpéniques de type tigliane ou daphnane [17].

➤ Chimie des *Thymelaeaceae*

Les métabolites secondaires isolés de *Thymelaeaceae*, sont généralement des composés polyphénoliques appartenant précisément aux flavonoïdes et aux acides phénoliques. On y retrouve également quelques composés de la famille des stérols, des lignanes et des coumarines. La plupart de ces produits sont des diterpènes de nature chimique toxiques non connue depuis une trentaine d'années et, bien que d'une grande variété structurale, ils dérivent tous des squelettes de base tigliane et daphnane.

➤ Toxicité des *Thymelaeaceae*

La toxicité des *Thymelaeaceae* est bien établie pour les êtres humains, aussi bien que pour de nombreuses espèces animales. En effet, les diterpènes de type tigliane et daphnane sont des purgatifs violents qui déclenchent, par contact avec la peau ou les muqueuses, une réaction inflammatoire intense [18]. Les manifestations toxiques peuvent être séparées en

deux catégories, selon que le matériel végétal ou les extraits sont pris par voie interne ou qu'il y a contact externe.

➤ **Utilisations des *Thymelaeaceae***

• **Utilisations non-médicinales**

Les espèces riches en diterpènes sont principalement utilisées comme poisons (chasse, pêche, usage criminel). Certains genres de la famille sont utilisés pour la production de matériaux de construction et d'objets ornementaux. De plus, de nombreuses espèces possèdent une écorce fibreuse qui sert à la fabrication de papier et de corde. En Inde, en Chine et en Indonésie, le bois de certaines espèces infecté par un champignon est vendu comme bois odorant et on en tire également de l'encens.

• **Utilisations médicinales**

Les médecines traditionnelles d'un grand nombre de cultures utilisent des *Thymelaeaceae* pour la préparation de traitements d'une gamme très étendue de troubles pour le traitement de maladies de la peau et de traitement cosmétiques. Les bases de l'utilisation de ces plantes dans le traitement d'autres maux, tels que morsures de serpents, piqûres de scorpions [16].

1.2 Famille des *Lamiaceae*

La famille des *Lamiacées* (*Lamiaceae*) est une importante famille de plantes qui comprend près de 7200 espèces regroupées dans environ 250 genres répartis dans le monde entier et surtout dans la région méditerranéenne. Elles sont réparties en sept sous-familles (*Ajugoideae*, *Lamioideae*, *Nepetoideae*, *Prostantheroideae*, *Scutellarioideae*, *Symphorematoideae*) [19]. Les *Lamiacées* constituent une famille très importante dans la flore marocaine, les genres d'origan et thymus y sont les plus fréquents.

➤ **Chimie des *Lamiaceae***

Un très grand nombre de genres de la famille des *Lamiaceae* sont des sources riches en terpénoïdes (hydrocarbures monoterpéniques, monoterpènes oxygénés, hydrocarbures

sesquiterpéniques sesquiterpènes oxygénés), irridoides glycosylés, flavonoïdes et composés phénoliques (carvacrol et thymol) [20-22].

➤ **Utilisations des *Lamiaceae***

C'est la famille des plantes aromatiques utilisées tant en cuisine qu'en parfumerie et en pharmacie également. Elle est une importante source d'huiles essentielles et de miel. La famille des *Lamiacées* possède une distribution mondiale, mais elle est très répandue dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes.

Certaines espèces de cette famille sont cultivées comme des plantes condimentaires, appartenant principalement aux genres *Mentha* (la menthe), *Lavandula* (la vande), *Marrubium*, *Ocimum* (le basilic), *Origanum* (l'origan), *Satureja* (la sarriette) et *Thymus* (le thym). Les tubercules de quelques espèces sont comestibles. *Tecana* (le teck) fournit un bois d'œuvre important. De nombreux genres contiennent des espèces ornementales [23].

1.3 Famille de *Cistaceae*

Les plantes de la famille *Cistaceae* sont en général des arbustes, sous-arbrisseaux et plus rarement des plantes herbacées. Elles peuvent être vivaces ou annuelles et sont caractéristiques des milieux secs et ensoleillés [24]. Selon *Beatriz Guzman*, cette famille compte environ 200 espèces réparties en 8 genres : *Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*, *Crocantemum*, *Hudsonia* et *Lechea* [25].

➤ **Chimie des *Cistaceae***

Les principaux métabolites secondaires isolés des plantes *Cistaceae* sont constitués essentiellement de polyphénols (flavonoïdes), flavonols O-méthoxylés et/ou O-glycosylés, flavanols et flavones qui s'ajoutent aux génines de type myricétine, apigénine, lutéoline, gossypétine, herbacétine et isorhamnétine ainsi qu'aux composés diterpéniques à squelette labdane, halimane, valparane et tormésane. La composition générale des huiles essentielles extraites de quelques plantes *Cistaceae* est un mélange de terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes labdaniques) et leurs dérivés esters [26].

➤ **Utilisations des *Cistaceae***

• **Propriétés non médicinales**

Les plantes *Cistaceae*, particulièrement celles appartenant au genre *Cistus* sont constituées de petits arbustes poussant à l'état sauvage en méditerranée occidentale (Portugal, Espagne, Sud de la France, Italie, Algérie, Maroc), sont fréquemment employées en médecine traditionnelle pour leurs divers effets : analgésique, antimicrobien, antitumoral, antiviral, antiinflammatoire, antifongique, gastroprotecteur et antioxydant [27-29].

• **Propriétés non médicinales**

Les plantes *Cistaceae* sont également cultivées et utilisées comme plantes ornementales. Les graines pilées de la plupart des Cistes sont consommées dans les campagnes marocaines, comme amuse-gueule et en cuisine comme chapelure pour les gâteaux [30].

2. Présentation des plantes étudiées

2.1 *Daphne gnidium*

Le daphné garou ou garou (*Daphne gnidium*) est un arbuste de la famille des *Thymeleacées*. Elle est connue pour ses applications thérapeutiques et cosmétiques [31-32].

➤ **Position systématique**


<p>Règne : <i>Plantae</i></p> <p>Embranchement : <i>Phanérogames</i></p> <p>Ordre : <i>Myrtales</i></p> <p>Sous-embranchement : <i>Angiospermes</i></p> <p>Famille : <i>Thymelaeaceae</i></p> <p>Classe : <i>Magnoliopsida</i></p> <p>Sous-classe : <i>Eudicots</i></p> <p>Genre : <i>Daphne</i></p> <p>Espèce : <i>Gnidium</i></p> <p>Non arabe : <i>Lazzaz</i></p> <p>Non local : <i>Arazzaz</i></p>	
---	--

Figure 1 : *Daphne gnidium* de Beni Ammart.

➤ **Description botanique**

Le Daphne gnidium c'est un arbrisseau, 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, cuspidées, très denses. Portant aussi des baies rouges (mais réparties le long des tiges), est également très toxique et avec des symptômes identiques. L'inflorescence terminale en panicule rameuse longue de (5-10) cm, entièrement blanche tomenteuse, fleurs blanches caduques. Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé. La floraison va d'octobre à mars [33].

➤ **Composition chimique**

La plus part des composés présents dans le *Daphne gnidium* : des coumarines (daphnétine, daphnine, acétylimbelliférone, daphnorétine) des flavonoïdes (lutéolin-3',7-di-*O*-glucoside lutéoline, orientine, isoorientine, quercétine, lutéoline 7-*O*-glucoside, apigénine-7-*O*-glucoside, genkwanine, 5-*O*-β-D-primeverosyl genkwanine, 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavanol) et α-tocophérol.

Les graines et les écorces des différentes espèces de *Daphne* renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines).

➤ **Utilisation**

Depuis longtemps, l'écorce des plantes du genre *Daphne* et plus particulièrement du *Daphne gnidium* était utilisée sous forme de pommade aux propriétés épispastiques. En phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides et la sclérose en plaque [34].

Dans la pharmacopée traditionnelle, la plante était utilisée pour ses propriétés antiseptique, insecticide, dépurative, cicatrisante, sudorifique et abortive. Le garou possède des effets cytotoxique, antioxydant et antimicrobien. L'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Daphne gnidium* agit comme un facteur anti-inflammatoire in vitro par l'inhibition des macrophages et des activités lymphocytaires.

1.1 *Origanum elongatum*

L'*Origanum elongatum* est une plante de la famille des *Lamiaceae*. Le genre d'*Origanum* vient de 2 mots grecs, "oros" qui veut dire montagne et "ganos" qui signifie éclat ; ce mot signifierait "ornement des montagnes" [35].

➤ **Position systématique**


<p>Règne : <i>Plantae</i></p> <p>Embranchement : <i>Spermaphytes</i></p> <p>Ordre : <i>Lamiales</i></p> <p>Sous-embranchement : <i>Angiospermes</i></p> <p>Famille : <i>Lamiaceae</i></p> <p>Sous-famille : <i>Népétoïdées</i></p> <p>Sous-classe : <i>Gamopétales</i></p> <p>Genre : <i>Origanum</i></p> <p>Série : <i>Superovariées tétracycliques</i></p> <p>Espèce : <i>Elongatum</i></p> <p>Non arabe : <i>Zaâtar</i></p> <p>Non local : <i>Zuy</i></p>	
--	--

Figure 2: *Origanum elongatum* de Beni Ammart

➤ **Description botanique**

Cette plante endémique du Rif et du nord du Moyen Atlas, elle croît dans les sols schisteux entre 400 et 1500 mètres d'altitude. Elle fleurit de juin à septembre [36].

Ce sont des plantes herbacées ou des sous arbrisseaux vivaces et aromatiques de la famille des *Lamiacées*. Ces espèces sont appelées localement « *Zaâtre* ». Ce sont des plantes vivaces chaméphytes, ligneuses à tiges dressées et plus ou moins ramifiées, les feuilles sont toujours simples, opposées, pétiolées ou sessiles à subsessiles. Les fleurs sont plus ou moins pourprés à inflorescence composées d'épis réunis de fleurs sessiles ou subsessiles. Les fleurs blanches ou rosées, dont les androcées sont à quatre étamines et les fruits sont constitués de quatre nucules ovoïdes et lisses [37].

➤ **Composition chimique**

L'Origanum elongatum est composée principalement de monoterpènes cycliques et quelques monoterpènes acycliques et sesquiterpènes, ainsi que d'autres molécules non terpéniques comme les alcools et les oxydes, phénols, carvacrol, thymol, linalol, méthyl-éthers :(carvacrol), cétones.

➤ Utilisation

Cette plante est une plante endémique originaire du nord du Maroc qui est largement utilisée pour ses vertus thérapeutiques contre diverses maladies telles que la diarrhée, les infections des voies respiratoires et les infections des voies urinaires, et comme plante aromatique à son goût ou comme conservateur alimentaire [38].

Leurs propriétés biologiques ne cessent de se confirmer (activité antioxydante, vasodilatateur, bactéricide), ainsi contre des pathogènes foliaires, les origans se sont avérés très efficaces. De même, l'origan permettrait d'accroître la durée de stockage des pommes de terre en réduisant le risque d'attaques microbiennes. Dans la pharmacopée traditionnelle, les origans sont employés sous formes d'infusions comme calmant, somnifère et stimulant.

1.2 *Cistus salviifolius*

Le Cistus salviifolius appartient à la famille des *Cistaceae*. C'est une famille de plantes dicotylédones, ce genre de *Cistes* présentent une grande plasticité et sont capables de pousser à la fois dans des sols contaminés et non contaminés [39-40].

➤ Position systématique


<p>Règne : <i>Plantae</i></p> <p>Embranchement : <i>Spermatophyta</i></p> <p>Ordre : <i>Malvales</i></p> <p>Super ordre : <i>Eurosidées II</i></p> <p>Classe : <i>Tricolpées évoluées</i></p> <p>Sous-classe : <i>Rosidae</i></p> <p>Famille : <i>Cistaceae</i></p> <p>Espèce : <i>salviifolius</i></p> <p>Genre : <i>Cistus</i></p> <p>Non arabe : <i>Rbibi</i></p> <p>Non local : <i>Thanarghochte</i></p>	
---	--

Figure 3: *Cistus salviifolius* de Beni Ammart.

➤ **Description botanique**

C'est un arbrisseau très ramifié, compact, érigé, parfois prostré. Cette plante peut atteindre 20 à 60 cm de haut, parfois 100 cm. La racine n'a pas de poils absorbants en général. Les feuilles sont simples, persistantes, opposées et pourvues d'un court pétiole pouvant atteindre plusieurs centimètres. Les fleurs sont grandes, 4 à 5 cm de diamètre, blanches à cœur jaune [41].

➤ **Composition chimique**

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des *Cistaceae* montre la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques constituant principalement les flavonoïdes (comme aglycones et glycosides), les pro-anthocyanidines, les terpenoïdes et les tannins [42].

➤ **Utilisation**

Toutes les espèces de la famille *Cistaceae* sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale anti-inflammatoire, antifongique, anti oxydante, et activités spasmolytique et hypotensive. Au Maroc, les feuilles de *Cistus* sont utilisées en décoction contre les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant, et en infusion dans le thé comme digestif [43-44].

1.3 *Thymus willdenowii* Boiss

Le Thymus willdenowii Boiss est un arbuste de la famille des *Lamiaceae*. Le genre *Thymus* comporte plus de 300 espèces. Au Maroc, il est représenté par 21 espèces dont 12 sont endémiques.

➤ Position systématique


<p>Embranchement : <i>Spermaphytae</i></p> <p>Sous-embranchement : <i>Angiospermes</i></p> <p>Ordre : <i>Labiales</i></p> <p>Classe : <i>Dicotylédonae</i></p> <p>Sous-classe : <i>Dialypétales</i></p> <p>Famille : <i>Lamiaceae</i></p> <p>Sous-Famille : <i>Nepetoideae</i></p> <p>Espèce : <i>Thymus willdenowii Boiss</i></p> <p>Genre : <i>Thymus</i></p> <p>Nom arabe : <i>Zaaitera</i></p> <p>Non local : <i>Dzukend</i></p>	
---	--

Figure 4: *T. willdenowii Boiss* de Beni Ammart

➤ Présentation et description botanique

Le *Thymus*, communément appelé « *Zaaitera* » au Maroc appartient à la famille des *Lamiaceae*. Ce genre est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des *Lamiaceae*, il comprend environ 350 espèces autour du monde. C'est une plante très répandue dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Lybie) [45].

Le *Thymus willdenowii Boiss* est un arbrisseau érigé, odorant, inflorescence qui ressemble à des tourbillons, calice à forme de cloche, avec deux lèvres, lèvre supérieure à 3 dents, l'inférieure à 2 lobes. La corolle a deux lèvres. 4 étamines saillantes plus au moins divergentes. Au Maroc la plante rencontrée au Haut-Atlas, Moyen-Atlas, Anti-Atlas, Atlas Saharien, plaines et plateaux du Maroc Oriental et du Rif.

➤ Composition et propriétés biologiques

Les composés phénoliques constituent principalement les flavonoïdes, flavones glycosidique (lutéolin-7-O-D-glucoside, lutéolin-3'-O-D-glucoside) [46].

Le décocté de ce thym est utilisé pour traiter les infections gastro-intestinales, les maladies hépatiques, les colites, les néphrites, les toux, les bronchites, les infections de la

gorge et de la bouche, les gripes et les rhumes. C'est aussi un tonique et un antiseptique général. Le décocté de la plante fleurie est consommé pour traiter les vers intestinaux. La tisane des sommités fleuries est utilisée pour traiter fièvre, diarrhée, fatigue, refroidissement, infection microbienne, bronchite, asthme, rhume et insuffisance biliaire.

Les principaux composés responsables de l'activité anti-inflammatoire de *Thymus willdenowii* étaient l'acide ursolique et l'acide oléanolique [46].

1.4 *Cistus laurifolius*

Le ciste à feuilles de lauriers (*Cistus laurifolius*) est un arbuste de la famille des *Cistaceae*.

➤ **Position systématique**


<p>Embranchement : <i>Spermatophyta</i></p> <p>Ordre : <i>Malvales</i></p> <p>Classe : <i>Tricolpées évoluées</i></p> <p>Sous-classe : <i>Rosidae</i></p> <p>Famille : <i>Cistaceae</i></p> <p>Espèce : <i>Laurifolius</i></p> <p>Genre : <i>Cistus</i></p> <p>Non arabe : <i>Irguel</i></p> <p>Non local : <i>Bokoren</i></p>	
---	---

Figure 5 : *Cistus laurifolius* de Beni Ammart.

➤ **Présentation et description botanique**

Le *Ciste* à feuilles de laurier fleurit au printemps. Ses fleurs sont de couleur blanche. Chacune d'elles ne dure qu'un jour mais elles sont très nombreuses et se renouvellent pendant près de 6 semaines [47]. Feuilles persistantes épaisses et coriaces, vertes sombres. Jeunes pousses rouges, collantes et aromatiques, surtout par temps chaud. Les vieilles feuilles se couvrent souvent d'une pruine grise ou argentée. Fleurs blanches en mai-juin,

précédées par des boutons rouges. Hauteur : 2 m et plus. Largeur : 1 m à 1,25 m. Il est spontané en montagne jusqu'à des altitudes de l'ordre de 2000 m [48].

➤ **Composition et propriétés biologiques**

Toutes les espèces de la famille *Cistaceae* sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire, antifongique, antiulcéreuse, antioxydante, et activités spasmolytique et hypotensive.

Les investigations pharmacologiques réalisées sur les extraits de feuilles de *Cistus* ont prouvé des propriétés antimicrobiennes, contre beaucoup de bactéries et mycètes responsables des infections humaines. Le genre *Cistus* est le plus étudié sur le plan phytochimique, et les diverses études montrent la présence de terpenoïdes et de flavonoïdes [49].

II. Aspect économique du secteur des plantes médicinales et aromatiques

1. Au niveau international

Parmi les principaux pays importateurs des plantes aromatiques et médicinales sont les U.S.A, U.K, France, l'Allemagne, la Suisse et le Japon qui importent plus de 1 million de dollars avec un total de 1400 millions de dollars importé par l'OCDE. Par les PAM on a recensé à travers le monde plus de 20 000 plantes utilisées dans les différents pays [50].

Les pays industrialisés ont opté principalement pour la domestication et l'exploitation moderne des plantes ayant un potentiel économique important. C'est le cas des U.S.A, France, Espagne, Chine, Inde, Brésil, Egypte, Hongrie ou encore Roumanie.

2. Au niveau marocain

Par sa diversité géographique, climatique et des raisons historiques, les possibilités de développement au Maroc du secteur des PAM sont très importantes.

Il y a une trentaine d'années, 50 entreprises spécialisées dans les PAM coexistaient, contre actuellement 30 entreprises qui exercent aussi dans d'autres activités. A noter que des multinationales étrangères investissent massivement dans ce domaine au Maroc.

L'organisation actuelle de cette industrie ne permet pas l'exploitation optimale des ressources nationales marocaines.

2.1 Production nationale des PAM

Les productions aussi bien des espèces spontanées que cultivées sont très difficiles à cerner en raison de l'absence de statistiques nationales et/ou régionales fiables et de l'irrégularité des productions relatives aux peuplements spontanés.

Sur le plan socio-économique, la collecte des PAM constitue un moyen pour diversifier la production agricole et demeure une activité génératrice de revenus pour les populations rurales locales. Cette activité procure à la population locale environ 500 000 journées de travail pour un revenu de 25 millions de DH et génère des recettes d'appoint pour les communes rurales [51].

Le Maroc est certes un petit producteur sur le marché international mais il est loin d'être négligeable, avec un volume de plus de 15000 T/an de PAM [52]. La valeur moyenne des exportations (sans huiles essentielles) est de l'ordre de 335 millions de DH. Les principales destinations des exportations sont l'Europe (65%), suivie par l'Asie (18%) et l'Amérique (12%) et viennent en fin l'Afrique (4%) et l'Australie (1%) [53].

La production des plantes spontanées au Maroc est destinée principalement à la production d'huiles essentielles. Une faible quantité est réservée à la production des plantes séchées [54].

2.2 Exportations marocaines en feuilles séchées

Le Maroc exporte plusieurs épices et plantes aromatiques et médicinales notamment la caroube, le romarin, le thym, l'origan, la sauge, le laurier, l'armoise etc. L'évolution des exportations en poids et en valeurs de thym et d'origan sur la période allant de 2000 à 2007 est illustrée aux tableaux 1 et 2 [55-56].

Tableau 1: Evolution des exportations en Kg des de Thym et d'Origan séchées.

Produit	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Thym	1 296 260	1 038 060	1 067 840	1 067 840	1 366 360	1 539 870	1 332 050	1 874 396
Origan	176 990	135 600	53 590	4 590	54 510	28 900	77 200	26 912

Tableau 2: Evolution des exportations en Dirhams de Thym et d'Origan séchées.

Produit	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Thym	13 125 599	1 0616 312	13 444 565	14 186 680	14931,124	18193,836	17 823 625	5 798 328
Origan	2 982 160	2 698 805	1 187 632	88 338	674,301	359,720	1 125 844	613 401

L'analyse de ces tableaux montre une nette variation des quantités exportées d'une espèce à l'autre, et d'une année à l'autre en valeur et en quantité.

L'exportation des Thym est importante. En effet le volume moyenne exporté est de 1342 T/an avec une valeur moyenne de 9,38 millions de DH. Les USA, la France, le Japon et l'Espagne sont les principaux marchés du thym du Maroc.

L'origan est constitué un excellent aromate alimentaire. Le volume des exportations n'est limité que par la disponibilité de la matière première

2.3 Exportations marocaines en huiles essentielles et extraits aromatiques

Le Maroc est l'un des principaux pays producteurs d'huiles essentielles (H.E) et extraits aromatiques (E.A). En moyenne, les exportations de ces produits dépassent 1000 T/an pour une valeur de l'ordre de 160 Millions de DH [52].

3. Au niveau du Caidat de Beni Ammart

3.1 Exploitation de Thym et d'Origan séchées au Caidat de Beni Ammart

L'exploitation des plantes aromatiques et médicinales en général au Maroc crée des emplois à la population et constitue de temps à autre une source de revenu importante à certaine personne surtout dans les milieux ruraux.

La Caidat de Beni Ammart à l'image du Maroc regorge de plantes aromatiques et médicinales. Les différentes utilisations traditionnelles de ces plantes dans la région sont peu nombreuses et seulement pratiquées par peu de gens. Aussi la valorisation et la commercialisation de ces deux genres de Thym et d'Origan dans la Caidat sont archaïques et nécessitent beaucoup d'efforts. Néanmoins certaines personnes, pour survivre, tirent leurs revenus journaliers de l'exploitation de ces plantes aromatiques et médicinales. On note, entre autres, la surexploitation des ressources naturelles, l'absence de techniques de récolte rationnelle et de techniques appropriées d'extraction des plantes, le manque de valorisation au niveau local (le produit est commercialisé en vrac) et l'absence de moyens modernes de transformation. Ainsi la question qui se pose dans la Caidat de Beni Ammart est comment peut-on exploiter de façon rationnelle et durable les ressources naturelles en occurrence de Thym présenté par « *Thymus. wilddenowii Boiss* » et d'Origan présenté par « *Origanum elongatum* » tout en assurant un revenu économique à la population locale ?

3.2 Stratégie de développement du secteur des PAM

Cette stratégie assure l'accompagnement des agriculteurs et des coopératives pour la promotion, la conservation, la valorisation, l'utilisation et l'intégration des produits naturels à travers la création de pépinières et de zones pilotes expérimentales, dans le cadre d'exploitations moyennes.

Au niveau du Caidat de Beni Ammart, on apprend aux agriculteurs comment cultiver, collecter, transformer et vendre des produits référencés et avec les meilleures techniques. Ainsi la création de projets de domestication des PAM et de sociétés de distribution et de commercialisation de ces plantes et de leurs dérivés.

Il s'agit aussi de la réglementation du secteur et de la mise en place d'un appui financier et d'un cadre incitatif pour les professionnels de cette filière. Ainsi la nécessité de développer et d'améliorer le savoir-faire des acteurs du secteur notamment les coopératives et promouvoir les PAM en ce sens qu'ils profitent à l'expansion du commerce équitable dans la région.

III. Généralité sur les antioxydants

1. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) contenant un ou plusieurs électrons libres (électron non apparié) sur leurs couches externes [57]. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules. Puisque les radicaux libres sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, en captant un électron pour devenir plus stables. Lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant un électron, la molécule attaquée devient alors elle-même un radical libre [58].

2. Origine des radicaux libres

Les sources métaboliques produisant des radicaux libres. En effet, l'organisme a besoin d'oxygène pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés [59].

3. Effets négatifs des radicaux libres

Les radicaux libres sont la cause d'importants dégâts oxydant dans tous les systèmes vivants, leur danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec les composants cellulaires importants. Suite à une exposition aux radicaux libres, il peut se produire une prolifération (multiplication anormale) des cellules, entraînant un cancer, un dysfonctionnement cellulaire ou la mort des cellules [60].

4. Stress oxydant

Le stress oxydant réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire entre la production des espèces réactives d'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer le dommage oxydatif. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) [61]. Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique [62].

5. Définition des antioxydants

Comme les réactions d'oxydation peuvent aussi être destructrices en produisant des radicaux libres, les plantes et les animaux utilisent et produisent de nombreux antioxydants pour se protéger. Les antioxydants sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (super-Oxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique séquestrant des métaux ainsi que des petites molécules liposolubles (vitamine E, β -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique). Selon *Halliwel et al.* [63], un antioxydant est toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de substrat.

En général un antioxydant est une substance capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir, au niveau de la cellule et de l'organisme, des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres [64].

Les antioxydants ralentissent également la croissance de tumeurs cancéreuses, ralentissent le vieillissement des cellules cérébrales et nerveuses et réduisent les risques et la gravité des maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington [65].

6. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers. Ils peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément à cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire [66].

Les antioxydants préventifs ont une action stabilisatrice en décomposant par exemple les peroxydes en des produits stables de terminaison ce qui empêche directement la formation des radicaux libres. Ils peuvent aussi chélater les catalyseurs des réactions d'oxydation tels que les ions métalliques ou bien réagir avec l'oxygène.

Les piègeurs des radicaux libres rentrent en compétition avec des radicaux déjà existants et contribuent à bloquer la phase de propagation. On différencie deux types de piégeage [66-67].

- Le premier par libération d'un atome d'hydrogène, souvent par une structure aromatique (cas des dérivés du phénol : tocophérols, polyphénols, flavonoïdes...).
- Le deuxième par libération d'un électron.

La combinaison de ces antioxydants préventifs et piègeurs peut générer des effets synergiques.

7. Antioxydants synthétiques

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), le tertiarybutylhydroquinon (TBHQ), le 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), le di-tertbutyl-4-hydroxyméthylphénol (*IONOX*-100), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG), l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) et le 4-hexylresorcinol (4HR), sont faciles à fabriquer, efficaces et peu onéreux. Ils sont généralement préparés au laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques. En raison de leur efficacité accrue, ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire lors de la conservation des aliments [68].

Les antioxydants synthétiques ont été testés quant à leurs effets carcinogènes ou mutagènes : ils sont soupçonnés, à grande quantité, avoir des effets néfastes sur la santé humaine. Par ailleurs, ils sont facilement volatiles et se décomposent rapidement à haute

température. L'ampleur de ce problème a fait que des antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés pour remplacer les antioxydants synthétiques.

Depuis les années quatre-vingt du siècle dernier, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. En cas d'exemple, *Aeschbach* et ses collaborateurs [69], ont indiqué que le thymol, le carvacrol et le 6-gingérol (Figure 6) possédaient des propriétés anti-oxydantes intéressantes et pourraient constituer une alternative naturelle intéressante des additifs synthétiques.

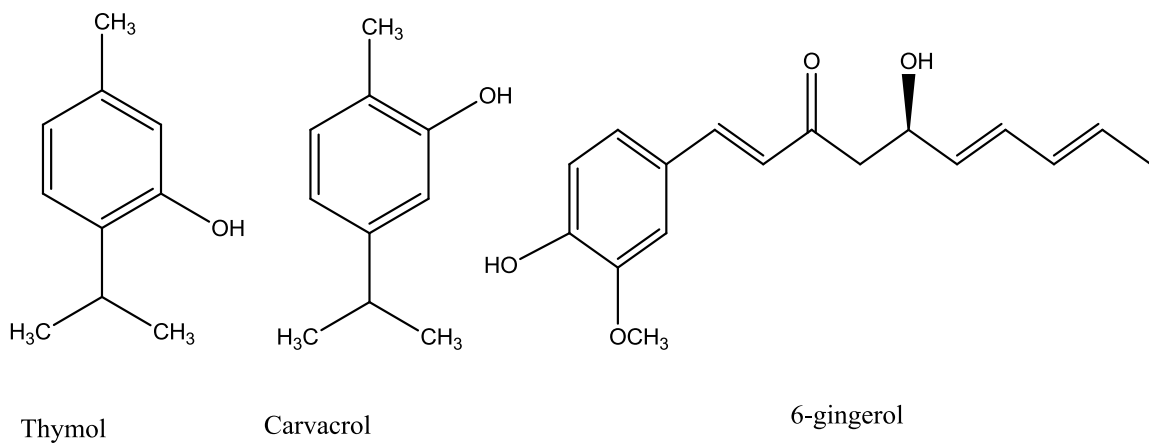


Figure 6 : Quelques composés naturels à activités antioxydantes

8. Antioxydants naturels

Deux catégories différentes d'antioxydants peuvent être distinguées. Premièrement, un certain nombre d'enzymes issues de protéines telles que, le super-oxyde dismutase (*SOD*), le glutathion peroxydase (*GPx*), et d'autres nutriments et constituants de l'organisme. Le second groupe est obtenu à partir de l'alimentation :

Les antioxydants naturels apportés de l'alimentation comprennent, généralement, de l'ascorbate, des tocophérols, des caroténoïdes qui sont les antioxydants les plus répandus et les plus efficaces dans les plantes médicinales, et des phénols végétaux bioactifs qui n'ont pas été complètement étudiés en raison de la complexité de leur nature chimique et leur énorme diversité dans plusieurs matières végétales.

9. Antioxydants enzymatiques

Concernant les antioxydants enzymatiques, c'est une ligne de défense constituée principalement de trois enzymes : il s'agit de la super- Oxyde dismutase (*SOD*), la catalase (*CAT*) et de la glutathion peroxydase (*GPx*). Ces substances auront comme fonction d'empêcher l'initiation ou la propagation des réactions radicalaires. Ils ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du super- oxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire [70].

10. Antioxydant d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont principalement : la vitamine C, la vitamine E, le sélénium et le β -carotène.

10.1 La vitamine E ou tocophérol

La vitamine E est l'ensemble des différents tocophérols (la molécule de tocol constituant la structure de base) (figure 7). Elle est constituée d'un noyau 6-chromanol sur lequel est fixée une chaîne phytyle entièrement saturée. Les différents tocophérols (α , β , δ et γ) se distinguent par le nombre et la position des groupes méthyles fixés sur le cycle phénolique. La chaîne aliphatique confère à la vitamine E son caractère lipophile et permet son incorporation dans les membranes cellulaires. La vitamine E est le principal agent antioxydant des membranes cellulaires [71].

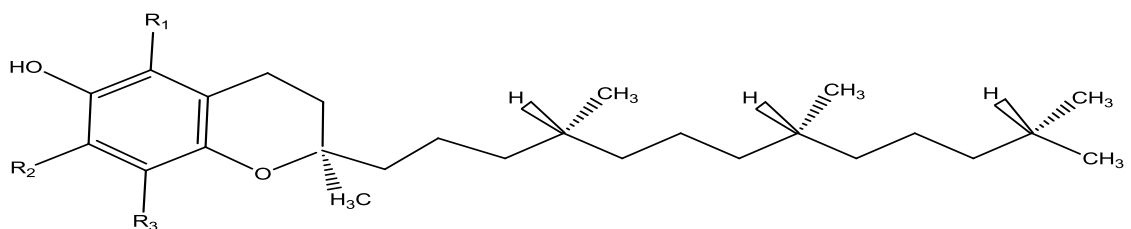
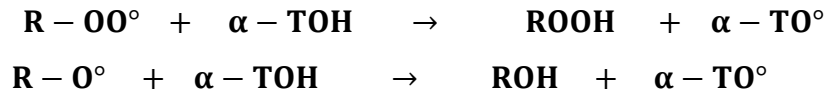


Figure 7: Structure de la vitamine E

Les tocophérols α , β , δ et γ détruisent les radicaux peroxydes (ROO) grâce à leur hydroxyle phénolique, en formant des hydroperoxydes lipidiques et le radical tocophéryle. Les réactions peuvent être résumées de la façon suivante :



Le γ -tocophérol (qui est relativement abondant dans la peau) a des propriétés biologiques spécifiques qui sont distinctes de celles de α -tocophérol, l'ordre d'efficacité des tocophérols est le suivant : $\alpha > \beta > \delta = \gamma$ [72].

10.2 La vitamine C ou acide ascorbique

Il s'agit d'une molécule extraordinaire et capable de contrer l'action néfaste d'oxydants comme les radicaux libres [73].

C'est un antioxydant prédominant de la peau, protégeant des dommages causés par les UV. Elle joue également un rôle dans la synthèse du cholestérol, dans la biodisponibilité du sélénium et dans le maintien des capacités antioxydantes de la peau [74].

Cet antioxydant protège de nombreux tissus contre la détérioration. Elle est présente dans de nombreux fruits et légumes (les choux, le poivron, le persil, les agrumes et le kiwi...) et s'oxyde très facilement. C'est un puissant réducteur qui joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E [75]. Il est soluble dans l'eau et l'éthanol.

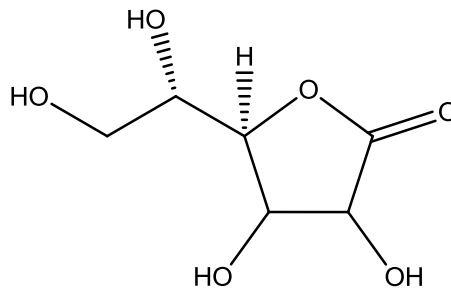


Figure 8 : Structure de la vitamine C

10.3 Caroténoïdes ou β -carotène

Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. On compte plus de 700 structures différentes [76], mais les majoritaires sont : le β -carotène, la β -cryptoxanthine, l' α -carotène et la zéaxanthine.

Les caroténoïdes sont des molécules constituées de 40 atomes de carbones, formés de 8 unités isoprènes à des extrémités pouvant être cycliques, leur précurseur est le phytoène (molécule linéaire à 40 carbones) qui est synthétisé par condensation de deux molécules de gèranmyl – phyrophosphate (molécules à 20 carbones), elles-mêmes synthétisées par condensation de 4 molécules isoprènes. Le phytoène subit ensuite des saturations, des cyclisations à ses extrémités pour former les carotènes. Le plus connu et le plus important est le β -carotène (Figure 9) [77] qui a été isolé pour la première fois par *Euler* en 1928.

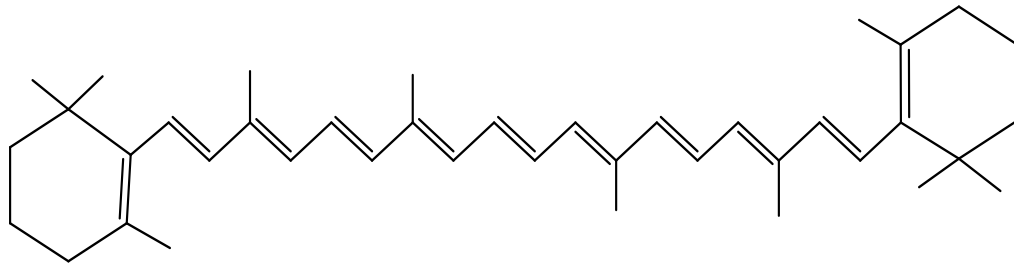


Figure 9 : Structure du β -carotène

Les molécules caroténoïdes sont d'excellents piègeurs de radicaux peroxydes et d'oxygène singulet qui possèdent une longue chaîne carbonée riche en doubles liaisons conjuguées responsables de leur activité anti-oxydante. Indépendamment de cette activité, d'autres caroténoïdes peuvent augmenter la réponse immunitaire chez l'homme. Dans différentes lignées cellulaires, certains caroténoïdes (lycopène, lutéine, zéaxanthine, cryptoxanthine) agissent de manière spécifique et très efficace dans la suppression de tumeurs cellulaires et dans la protection de la stabilité génomique [78]. Il faut signaler aussi que les caroténoïdes ont des mécanismes différents pour inactiver l'oxygène singulet [79].

Chez les plantes, les caroténoïdes sont clairement observables par la couleur qu'ils donnent aux fruits (tomate), fleurs et racines (carotte). Ils sont également présents dans les tissus verts mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle, il faut attendre la dégradation de celle-ci, à l'automne, pour observer ces pigments.

10.4 Composés phénoliques

- **Les phénols**

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, précurseur de 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 [79].

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol (Figure 10), c'est le composé le plus étudié de cette famille. En effet, cette molécule, isolée du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes.

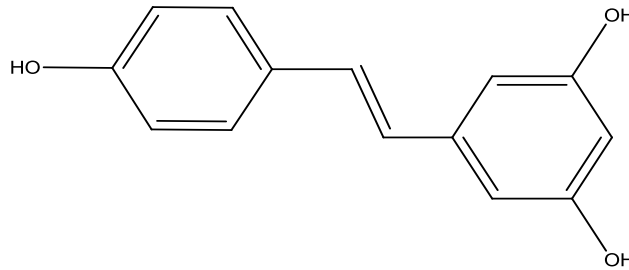
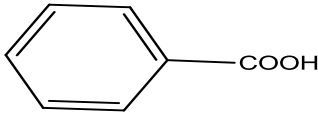
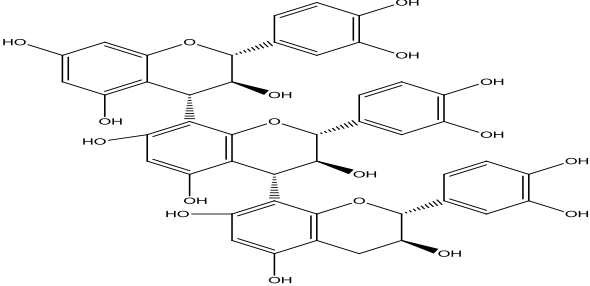
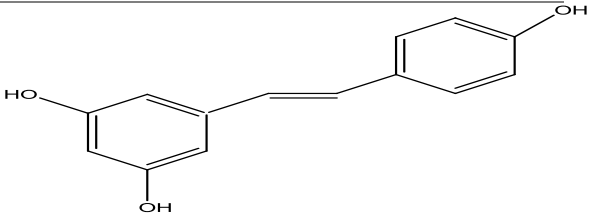
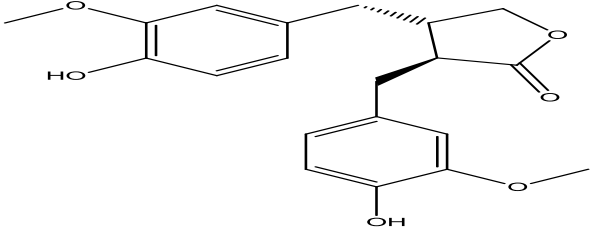
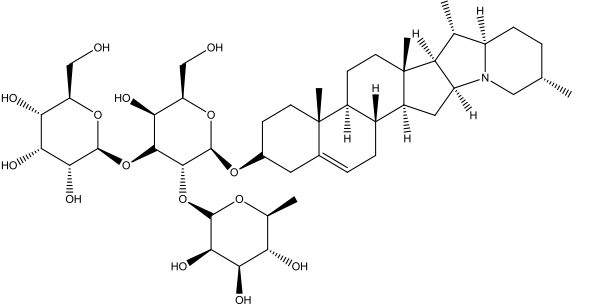
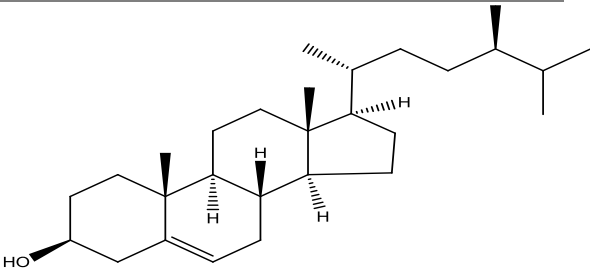


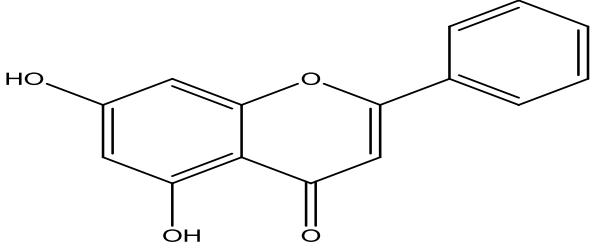
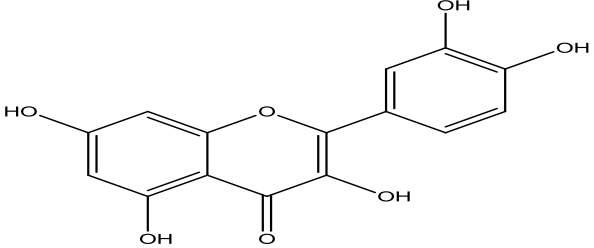
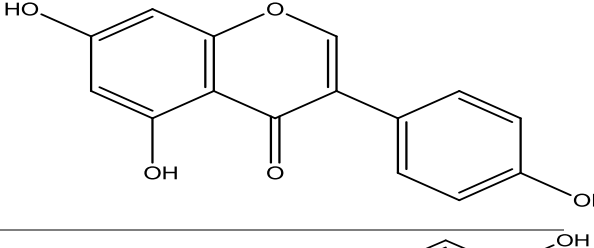
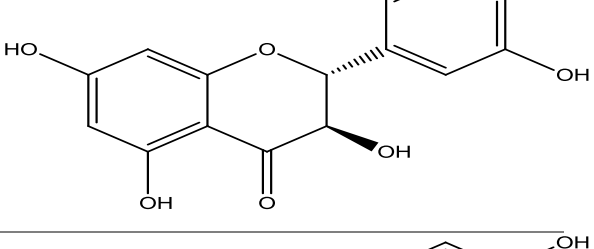
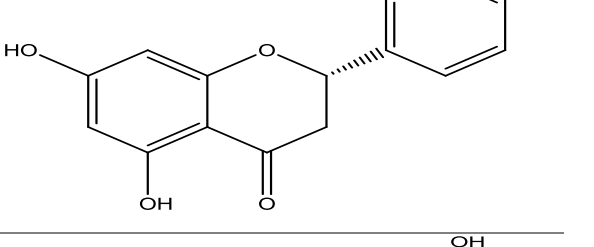
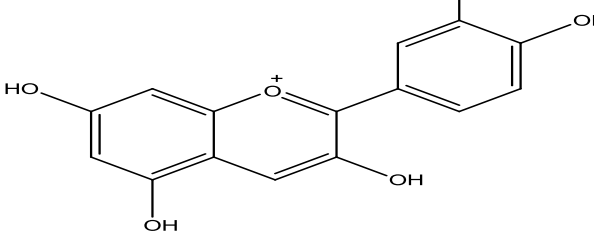
Figure 10 : Structure du resvératrol

- **Les polyphénols**

Le polyphénol se dit pour tout composé possédant un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituants hydroxyles et incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides, etc....) (Tableau 3). Ils sont très répandus dans les fruits et les légumes et sont donc régulièrement consommés par les personnes bénéficiant d'une alimentation "normale". Parmi ces composés, les flavonoïdes représentent la classe de substances la plus étudiée.

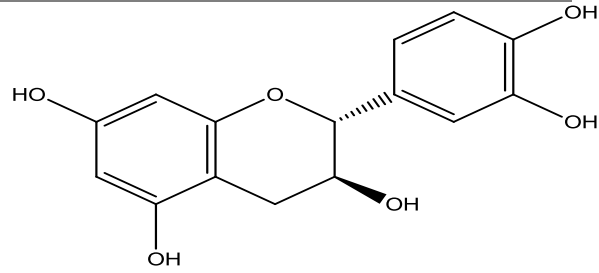
Tableau 3 : Structure des squelettes des polyphénols

<i>Classification</i>	<i>Exemples</i>	<i>Structure de base</i>
Acide phénoliques	<i>Acide gallique</i>	
Tanins	<i>Tanins condensé</i>	
Stibènes	<i>Trans – resveratrol</i>	
Lignanes	<i>Matairésinol</i>	
Saponines	<i>α – Solanine</i>	
Phytostéroles	<i>Campestérol</i>	

Flavonoides :	<i>Chrysrine</i>	
-Flavons		
-Flavonols	<i>Quercétine</i>	
-Isoflavonons	<i>Génistéine</i>	
-Dihydro flavonols	<i>Dihydroquercétinee</i>	
-Flavanons	<i>Naringénine</i>	
	<i>cyanidine</i>	
-Anthocyanidie.		

Catéchine

–Flavanols



- **Les acides phénoliques**

Ce sont les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phyto-chimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique. Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxy benzoïques et les acides hydroxy-cinnamiques [80].

- **Les flavonoïdes**

Ils se répartissent en plusieurs classes, dont les plus importantes sont : les flavones, les flavonols, les flavonones, les dihydroflavonols, les isoflavones, et les anthocyanidines. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires (thé, vin et jus de fruits...).

Les flavonoïdes sont connus par leurs propriétés anti-oxydantes efficaces. Des recherches intensives ont été menées sur les effets des flavonoïdes sur la santé ont suggérés qu'ils ont un rôle protecteur contre les dommages causés par le cholestérol dans les vaisseaux sanguins [76]. De plus ils possèdent un large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris les propriétés anti-radicalaires [77]. Ainsi le rôle de ces composés dans les mécanismes de défense contre le stress oxydatif des agents oxydants et des radicaux libres.

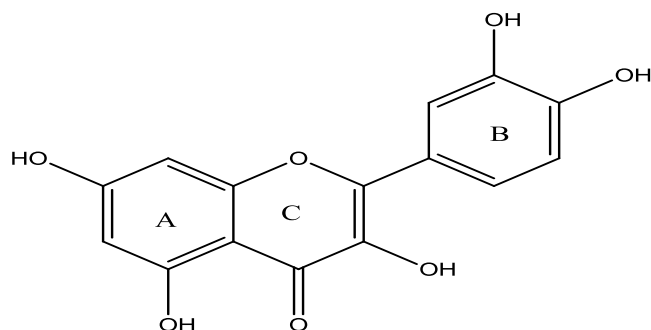


Figure 11 : Structure générale du noyau des flavonoïdes

- **Les tanins**

Les tanins sont des polyphénols polaires de haut poids moléculaire d'origine végétale existant dans presque toutes les parties de la plante. Ces composés permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Ils sont utilisés 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 [81]. Les tanins sont divisés en 2 groupes : tanins hydrolysables (qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique) et tanins condensés ou catéchiques (constitués de la condensation des dérivés flavane).

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 [80].

- **Les coumarines**

Les coumarines (figure 12) 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 [82]. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles des flavonoïdes [83].

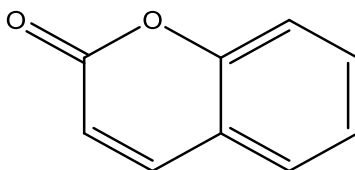


Figure 12 : Noyau de base des coumarines

IV. Techniques d'extraction, de séparation et d'analyse des métabolites secondaires

1. Techniques d'extraction

L'extraction est une technique de séparation de produits chimiques de leur matrice. Cette technique, qu'elle soit traditionnelle, conventionnelle ou encore nouvelle, utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques. On distingue l'extraction liquide-liquide et l'extraction solide-liquide.

➤ Techniques traditionnelles

Plusieurs méthodes, dites traditionnelles, sont utilisées :

- **Décoction**

La décoction consiste à faire bouillir dans l'eau une substance en vue d'extraire certains métabolites secondaires. C'est une méthode d'extraction de principes actifs et/ou d'arômes d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante, ce qui suppose que ces substances ne soient pas thermolabiles [84].

- **Macération**

La macération est utilisée pour les principes actifs très solubles à froid ou altérables à la chaleur. Le matériel dont on veut extraire le principe actif est mis en contact avec un solvant (huile, alcool, eau ...), pendant un temps donné (plusieurs heures à plusieurs jours) à température ambiante [85].

- **Infusion**

L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs et/ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes, le thé par exemple [84].

➤ Techniques conventionnelles

Les méthodes conventionnelles d'extraction des métabolites se basent le plus souvent sur l'affinité des molécules pour différents solvants et sur l'utilisation de chauffage et/ou d'agitation [86]. Elles regroupent les méthodes suivantes :

- **L'entraînement à la vapeur**

L'hydrodistillation est la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée dans l'extraction des huiles essentielles (HE). La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensés dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité. L'HE étant, souvent, plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate [86].

- **Extraction par Soxhlet**

L'extraction en Soxhlet date de 1879 [87] et représente la méthode de référence pour les extractions de métabolites des plantes, permet de faire l'extraction discontinue par solvant d'une espèce chimique contenue dans une poudre ou dans une matrice végétale. Il s'agit d'une méthode classique pour l'extraction solide-liquide.

- **Extraction par sonication**

L'extraction par sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. On soumet les cellules à une source d'ultrasons, générés par un transducteur, organe qui transforme l'énergie électrique domestique (50 à 60 Hz) en énergie ultrasonique (20 kHz) [88].

- **Techniques Nouvelles**

- **Extraction assistée par micro-ondes**

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle [86].

- **Le dioxyde de carbone (CO_2) supercritique**

Le terme supercritique signifie que le dioxyde de carbone CO_2 , sous pression et à une température de 31°C, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. Sous ces conditions, il est capable de dissoudre les huiles essentielles aussi bien qu'un solvant organique [89].

2. Techniques de separation

La séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Les buts de ce type de procédé peuvent être divers [90-91].

- Purification : des impuretés doivent être extraites du composé d'intérêt.
- Concentration : élimination d'une partie du solvant.
- Fractionnement : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

➤ Techniques chromatographiques

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile.

• Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

• Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne peut être une méthode préparative ; elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

➤ Techniques de distillation

La distillation est un moyen de séparer deux liquides parfaitement miscibles par la différence de leurs points d'ébullition, c'est l'un des procédés d'extraction les plus anciens, apporté par les arabes au IX^{ème} siècle [92]. Plusieurs types de distillation peuvent être cités à savoir : la distillation simple, distillation fractionnée, distillation par entraînement avec la vapeur d'eau.

➤ Techniques de filtration

Le but de la filtration est de séparer les constituants d'un mélange liquide-solide par passage à travers un milieu filtrant. Cette opération est beaucoup plus rapide que la sédimentation, elle est donc plus utilisée. On récupère après filtration soit un solide (après

une cristallisation), soit un liquide (récupération d'eaux usées avant traitement et après sédimentation), soit un liquide et un solide à la fois (opération de recristallisation). On distingue : filtration par gravité, filtration par surpression et filtration sous pression réduite.

3. Techniques d'analyse

➤ Analyse par les couplages conventionnels

• Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition [93]. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit [94].

• Chromatographie d'HPLC

HPLC signifie chromatographie liquide haute pression est l'une des techniques les plus employées dans les laboratoires d'analyse chimiques. Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange. Sa grande précision permet la recherche de traces et il est possible de la coupler à un spectromètre de masse.

➤ Analyse par spectroscopie

La spectroscopie se base sur l'analyse des rayonnements électromagnétiques se traduisant par un spectre d'absorption du gaz dans des longueurs d'onde spécifiques. Ces méthodes utilisent l'absorption dans le visible, l'ultraviolet et l'infrarouge, mesurée grâce au spectromètre [95].

Les méthodes spectroscopiques les plus couramment rencontrées en chimie portent les noms de spectroscopies suivantes :

- **Infrarouge (IR)** : est une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes.
- **Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV/VIS)** : est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible.

-
- **Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)** : est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques.
 - **Spectroscopie de masse (SM)** : C'est une technique de mesure des rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées, grâce à la perte ou au gain d'une charge électrique, et de leurs produits de fragmentations.
 - **Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)** : est une technique spectroscopique permettant de détecter les espèces possédant des électrons non-appariés.

V. Activités biologiques

1. Activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques.

Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes :

Soit par le transfert d'atome d'hydrogène ; employées pour évaluer la peroxydation et la quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du pourcentage d'inhibition de l'oxydation [96].

Soit par le transfert d'un simple électron, utilisées pour la mesure de la capacité du piégeage des radicaux libres [97] parmi celles-ci, on cite :

- Le test du 2,2-diphényl picrylhydrazyl (*DPPH*).
- La capacité antioxydante totale (*CAT*)
- Le test de blanchissement de β -carotène

➤ **Capacité antioxydante totale (*CAT*)**

La capacité antioxydante totale (*CAT*) ou l'activité réductrice du molybdate des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène proposée par *Prieto et al* [98].

Le principe de cette méthode est basé sur la réduction de molybdène présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène MoO_2^+ en présence de l'antioxydant pour former un complexe vert de phosphate dans un milieu acide.

➤ Test du DPPH

L'activité scavenger du DPPH. (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)) des extraits des plantes étudiées est déterminée par la méthode de Mighri [99].

Cette méthode est basée sur le fait qu'un antioxydant a la capacité de donner un hydrogène au radical DPPH de couleur pourpre sous sa forme oxydée et donc le réduire en DPPH-H (2,2 Diphényl-1- picryl hydrazine) de couleur jaune-verte [100].

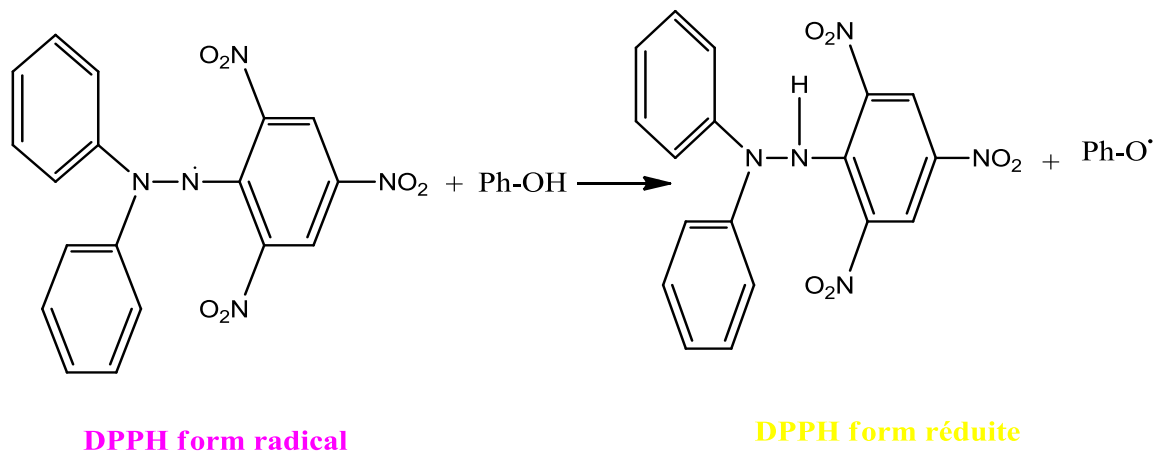


Figure 13 : Réaction du DPPH avec un polyphénol.

➤ Test de blanchissement de β -carotène

Le test de blanchissement de β -carotène est réalisé par la méthode de (*Sun et Ho*) [101]. L'acide linoléique qui est dans un système d'émulsion aqueuse génère des radicaux peroxydes qui vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. La présence des antioxydants réduit l'intensité de la destruction du β -carotène en neutralisant les radicaux libres dérivés et permet donc de prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène [102].

2. Activité vasodilatatrice

La vasodilatation est l'anévrisme, c'est-à-dire une augmentation de la taille (diamètre) des vaisseaux, est rendue possible par un relâchement des muscles qui composent la paroi des vaisseaux sanguins (artères et veines). Il s'agit d'un processus naturel qui se produit en réponse à de faibles niveaux d'oxygène ou à une augmentation de

la température corporelle. Il augmente le flux sanguin et l'apport d'oxygène dans les zones du corps qui en ont le plus besoin. Elle peut être provoquée par adaptation du corps [103]. Cependant une réduction du flux sanguin peut provoquer des symptômes désagréables tels que des douleurs, des crampes musculaires, des engourdissements, des problèmes digestifs et une sensation de froid dans les mains ou dans les pieds.

➤ **Les vasodilatateurs**

Les vasodilatateurs sont des substances qui augmentent le diamètre des vaisseaux sanguins en relâchant les muscles de leurs parois. La conséquence principale est la diminution de la pression artérielle suite à une augmentation de l'espace pour la circulation sanguine. Par ailleurs, les vasodilatateurs augmentent le débit sanguin dans la région où ils provoquent une vasodilatation.

✓ **Utilisation des vasodilatateurs**

Il existe deux types de vasodilatateurs : les médicaments qui agissent directement sur le muscle lisse, tels que ceux des vaisseaux sanguins et du cœur. Ils sont utilisés pour :

- Baisser la pression artérielle dans le traitement de l'hypertension artérielle.
- Améliorer les conditions du fonctionnement du cœur, notamment dans l'insuffisance cardiaque.
- Améliorer la perfusion de certains tissus.
- Lever ou prévenir un spasme sur un vaisseau

➤ **Rôle des antioxydants dans la prévention des AVC et l'hypertension artérielle**

Les antioxydants ont le pouvoir d'excéder la capacité des radicaux libres à détruire les tissus de l'organisme et prévenir, en particulier, les maladies cardiovasculaires, il paraît évident de corrélér ce pouvoir à une activité vasodilatatrice.

En effet, (*Burn et al*), ont démontré une étroite relation entre l'activité antioxydante et la capacité vasodilatatrice d'un groupe de composés phénoliques [104]. De même d'autres études ont abouti à conclure que les antioxydants agissent comme vasodilatateurs et par la suite aident à baisser la pression artérielle et prévenir les attaques vasculo-

cérébrales (AVC) [105-106]. A cet effet, nous avons étudié l'effet de nos plantes sur le lit vasculaire méésentérique de la souris (LVM).

➤ **Effet des flavonoïdes sur le système cardiovasculaire**

Les flavonoïdes sont connus par leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire par la modification des processus pathologiques impliqués dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Des flavonoïdes ont un effet positif sur l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardiovasculaires en diminuant l'oxydation des LDL par inhibition de LOX, en réduisant le stress oxydatif et une diminution de l'inflammation [107]. Certains flavonoïdes seraient également bénéfiques dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, notamment en réduisant le stress oxydatif. Dans la prévention de l'infarctus du myocarde, les flavonoïdes agissent en inhibant l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS [108]. Les flavonoïdes empêcheraient l'agrégation plaquettaire en interagissant avec les récepteurs du thromboxane et ont un effet vasodilatateur, cependant, les mécanismes d'action pertinents restent encore non élucidés [109]. Des pyranoisoflavones possèdent une activité vasorelaxante [110].

VI. Produits de protection solaire

Les produits de protection solaire comptent aujourd'hui parmi les produits couramment utilisés pour protéger de la nocivité des rayonnements UV pouvant causer coups de soleil, vieillissements prématurés de la peau ou encore cancers de la peau. Les filtres anti-UV utilisés dans les protections solaires sont classés en deux catégories : les filtres chimiques (des molécules absorbantes) d'une part, et les filtres minéraux (des particules diffusantes) d'autre part [111]. Les premiers ont l'avantage de bien s'étaler et d'être moins visibles mais leur utilisation dans le cadre d'une production industrielle induit des problématiques de pollution [112]. Les deuxièmes sont plus propres pour l'environnement. Cependant, ils sont plus difficiles à étaler, ils sont moins filtrants, et peuvent laisser des traces blanches sur la peau. Afin de lutter contre ces effets, les extraits des plantes sont parfois utilisés, mais celles-ci possèdent un risque de toxicité.

1. Ecrans solaires

➤ Différents types de produits

Les produits de protection solaire contiennent des filtres UV ayant pour rôle d'absorber et/ou réfléchir certaines longueurs d'ondes en vue de réduire l'exposition cutanée à ces radiations.

Il existe trois types de filtres UV : les filtres chimiques, les filtres minéraux et les filtres naturels.

✓ Filtres chimiques organiques

Les filtres chimiques vont avoir pour mécanisme d'action d'absorber l'énergie des rayonnements UV et la rendre inoffensive. Les filtres chimiques ont une structure particulière qui permet d'absorber cette énergie : le chromophore. En effet, le chromophore va présenter des doubles liaisons conjuguées capables d'absorber l'énergie correspondant à une radiation UV et permettant à la molécule de passer de l'état fondamental à l'état excité.

Les produits de protection solaire (PPS) constitués de molécules organiques protègent, dans une gamme de longueur d'onde donnée, les supports qu'ils recouvrent. Pour une protection efficace contre les UVA et les UVB, il est nécessaire d'associer plusieurs filtres solaires les plus efficaces sur le marché : [113-117].

❖ Filtres UVB à spectre étroit

Les filtres UVB absorbent principalement le rayonnement de longueurs d'onde comprises entre 290 et 320 nm. Parmi ces filtres solaires on distingue :

- L'acide para-aminobenzoïque (PABA) et ses dérivés.
- Les cinnamates : l'octylméthoxycinnamate et l'isoamyl-paraméthoxycinnamate.
- Les esters salicyliques : 2-éthylhexyl salicylate
- Les dérivés du benzylidène-camphre : 4-méthylbenzylidène camphre
- Les dérivés du benzimidazole : l'acide phénylbenzimidazole

Sulfonique.

-
- Les dérivés de l'acide acrylique ou l'octocrylène : acide octyl 2-cyano-3, 3-diphenylacrylique.

❖ **Filtres UVB à spectre large**

Ils sont un intérêt double puisqu'ils filtrent dans une certaine mesure à la fois les UVB et les UVA. Ils rentrent dans la composition de la nouvelle génération de produits de haute protection. Ils sont représentés par la classe des benzophénones. Ce sont des molécules présentant 2 maximums d'absorption, l'un vers 290 nm, l'autre vers 330 nm, ce qui traduit une bonne absorption dans l'UVB et dans l'UVA. Elles sont très photostables, actives à faible concentration et capable de s'incorporer facilement à d'autres composants. Cependant, certaines d'entre elles, et particulièrement la benzophénone-3, peuvent provoquer des allergies.

❖ **Filtres spécifiques de l'UVA**

Dans cette catégorie, on trouve les substances suivantes :

- Le butylmethoxydibenzoylméthane (BMDM) ou avobenzone.
- Le diethylamino hydroxybenzoyl hexylbenzoate (DHBB).

✓ **Filtres naturels**

Les filtres d'origine naturelle ne sont pas des photoprotecteurs performants. Quelques extraits végétaux ont été recommandés en complément de filtres solaires plus efficaces : extrait d'aloès, extraits de reine des prés, de camomille, de millepertuis. Leur capacité d'absorption étant faible, la présence de flavonoïdes leur permet d'agir en tant qu'agents anti-radicalaires. Ces pièges à radicaux libres protègent les molécules biologiques des effets des UVA. Ils complètent ainsi l'action des produits ne contenant qu'un filtre UVB.

✓ **Filtres minéraux**

Les filtres minéraux ont pour mécanisme d'action de réfléchir les rayonnements UV [118]. Ils correspondent à des pigments blancs détournés de leur utilisation première, à savoir des matériaux qui n'absorbent pas mais diffusent la lumière du visible. Les filtres minéraux utilisés sont : (le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, l'oxyde de fer...).

Partie 2 : Travaux expérimentaux

Introduction

Un grand nombre de gens résolvent leurs problèmes de santé en ayant recours à la médecine traditionnelle [119], car elle constitue une part importante du patrimoine culturel, ainsi que pour la raison des moyens pécuniaires limités. L'enquête ethnobotanique est essentielle à la connaissance des plantes médicinales et de leur usage. Une vaste connaissance de la façon d'utiliser les plantes contre de différentes maladies nécessite une étude de manière approfondie. Elle est transmise d'une génération à l'autre par contact oral, ce qui peut entraîner un risque de perte de certaines connaissances [120].

Plusieurs études ont prouvé des activités biologiques chez les cinq plantes (*Daphne gnidium*, *Origanum elongatum*, *Cistus salvifolius*, *Cistus laurifolius*, et *Thymus willdenowii*. Boiss). Pour cette raison, et pour corroborer ces résultats tout en cherchant à prouver d'éventuelles spécificités phytochimiques, nous avons mené une étude ethnobotanique dans la Caïdat de Beni Ammart, province d'Al-Hoceima, brigant connaître les éventuels usages thérapeutiques chez la population locale.

I. Matériel et Méthodes

1. Présentation de la zone d'étude

La province d'AL H Hoceima couvre la partie centrale de la chaîne du Rif. Selon le découpage régional du Maroc, la province d'AL Hoceima est rattachée à la région Tanger-Tétouan-AL Hoceima (Annuaire statistique régional 2014). Elle est bordée par la Mère Méditerranée au nord, la province de Driouch à l'est, les provinces de Taza et de Taounate au sud et la province de Chefchaouen à l'ouest. La province d'Al Hoceima couvre une superficie d'environ 3 350 km², soit 22.2% de la superficie régionale. Elle est constituée de cinq municipalités et de quatre cercles englobent 17 caïdats contenant 31 communes rurales. Le cercle Targuist constitué de trois caïdats, Beni Ammart, Beni Bousar et Sidi Boutmim (selon le découpage administratif de la province d'AL Hoceima 2015).

Beni Ammart (34°48'40"N 4°9'28"W) est située au sud de Zaouit Sidi Abdelkader, à l'ouest de Igzennayen et à l'Est du Tribu Beni Bchir. Elle est, à environ 35 km au Sud-est de Targuist. Le caïdat de Beni Ammart est composé de deux communs, Beni Ammart de 13 douars avec une population de 6654 habitants et Sidi Bouzineb de 13 douars avec une population 3711 habitants, d'après (Recensement Général de la population et de l'habitat 2014).

La zone d'étude reste très mal connue ou impénétrable du Maroc, elle s'étend sur un territoire relativement varié, les altitudes varient de 800 à 1400 mètres. Les sols rocheux schisteux et gréseux sont couverts de forêts de chêne vert, de chêne liège, de thuya (la forêt de Tizi Ifri).

La population locale de la commune rurale de Beni Ammart, essentiellement amazigh a pour activité économique basée sur une agriculture pratiquée dans des conditions difficiles et d'une activité d'élevage très influencée par les conditions du milieu. La faiblesse des revenus tirés de cette activité a toujours été compensée par les revenus de l'immigration essentiellement vers l'Europe.

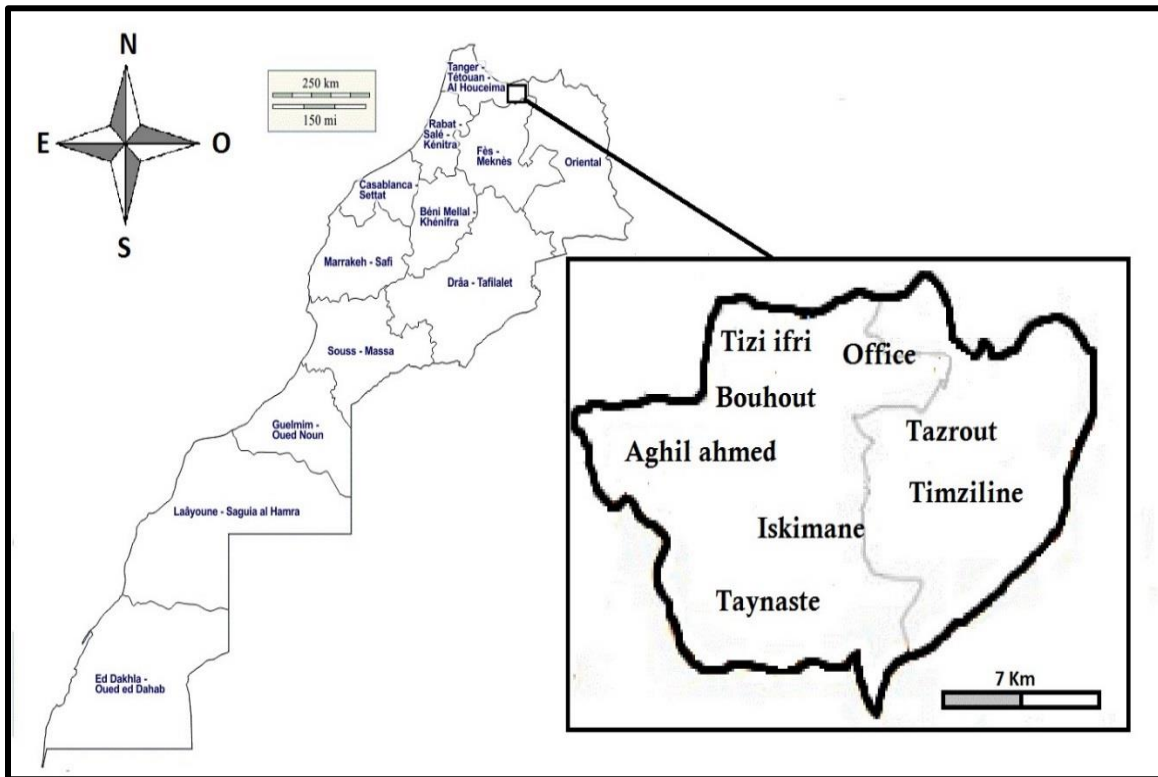


Figure 14 : Localisation du lieu ethnobotanique de la Caïdat Beni Ammart.

2. Méthodologie

Pendant la première phase, nous avons commencé par des entretiens directs avec les habitants nés dans la Caïdat de Beni Ammart pour obtenir des informations générales sur les plantes médicinales locales. Ensuite nous avons invité des gens de la population locale à rassembler des échantillons des plantes. Nous avons ramassé aussi des échantillons des espèces végétales médicinales de la zone d'étude afin de valider et vérifier leurs noms locaux avec plusieurs enquêtés.

La deuxième phase s'est basée sur une étude ethnobotanique des cinq plantes médicinales, cette étape a été effectuée à l'aide des fiches questionnaires (Annexe1) [121]. Les enquêtes étaient basées sur la méthode d'Interview Semi-Structurée [122,123]. Ce travail a été réalisé entre le mois de septembre et le mois de décembre 2015 pendant lesquels nous avons réalisé 100 entretiens avec autant des personnes différentes. Le temps

consacré avec chaque interviewé est une heure. Chaque fiche a été remplie par interrogation orale en langue locale de Tarifite.

Nous avons mené plusieurs entretiens, dans le but de rassembler toutes les informations sur le répondant et les plantes médicinales qu'il utilise, afin que le profil de chaque interviewé inclue son âge, son niveau d'études, sa situation familiale. Les données recueillies pour chaque plante comprennent le nom local commun, les usages, la partie utilisée, le mode de préparation, les recettes, le mode d'administration et leurs effets secondaires [121]. L'identification a été réalisée par monsieur A. ENNABILI, professeur de botanique à l'Ecole Supérieure de Technologies, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Fès.

II. Résultats

1. Prospection

La période de l'enquête a duré 4 mois, entre septembre et décembre 2015.

Nombre de fiche-questionnaires validées est composé de 500 fiches, avec une moyenne de 100 fiches par espèce. Ceci pour traiter cinq plantes médicinales : *Cistus laurifolius*, *Cistus salvifolius*, *Daphne gnidium*, *Origanum elongatum*, *Thymus wilddenowii*, appartenant à trois familles, *Cistaceae*, *Thymeleaceae* et *Lamiaceae*.

2. Lieu

C'est une étude faite dans la ville d'Al-Hoceima, précisément dans le caïdat de Beni Ammart, qui est composé de deux communs, Beni Ammart de 13 douars et Sidi Bouzineb de 13 douars d'une population de 10365 habitants (Recensement Général de la Population et de l'Habitat : RGPH 2014). Notre étude s'est effectuée sur 9 douars comme indique le Tableau 4.

Tableau 4 : répartitions des espèces végétales sur la zone d'étude

Douars	Fiche-questionnaires		Nombre d'habitants
	Nombre	%	
Douar aghil Ahmed	70	14.00	300
Douar Bouhout	30	6.00	320
Douar Ijouawen	50	10.00	370
Douar isakimen	30	6.00	290
Douar oufisse	95	19.00	315
Douar Taynast	30	6.00	360
Douar Timlizen	35	7.00	231
Sidi Bouzineb (Tazroute)	80	16.00	613
Tizi ifri (Assamar)	80	16.00	320
Total	500	100.00	3119

3. Description de la population

2.1 Tranches de genre

Le nombre d'individus de l'échantillon enquêté est de l'ordre de 100 personnes dont 60 % sont de sexe féminin (Figure 15).

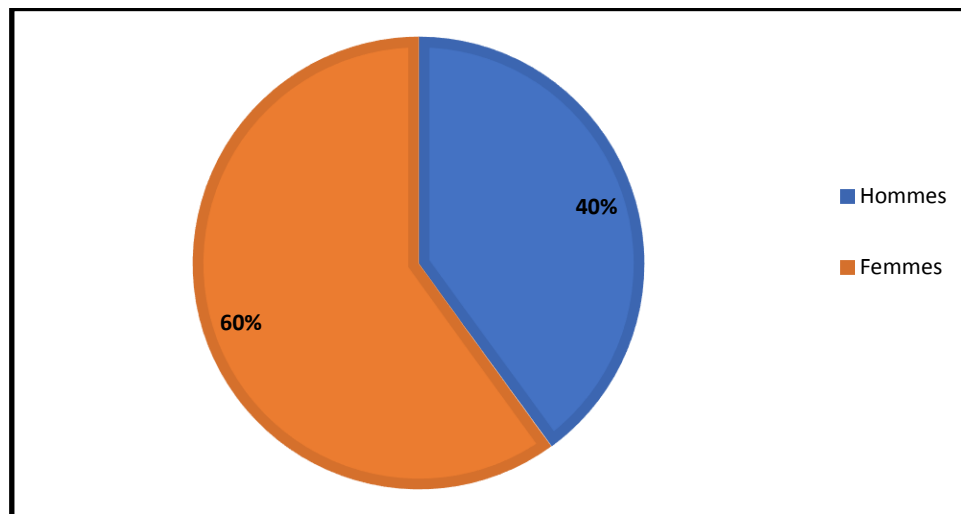


Figure 15 : Répartition des enquêtés selon le genre

2.2 Tranches d'âges

Les extrêmes d'âges des enquêtés variaient entre 21 et 90 avec une moyenne d'âge de (54 ± 18) ans et la majorité d'entre eux (53%) appartenait à la tranche d'âge (41-70 ans).

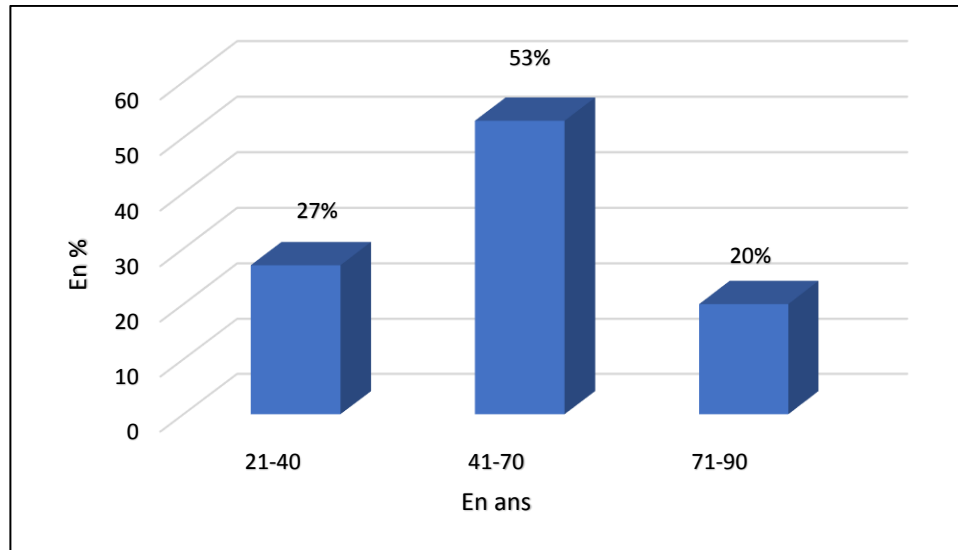


Figure 16 : Profil des enquêtés en fonction de la tranche d'âge

2.3 Situation familiale

Dans la zone d'étude, la proportion des individus mariés, au moment de l'enquête, parmi ceux âgés de 21 ans et plus s'élève à 70 %. Les célibataires représentent 30% dont 48% des hommes et 52% des femmes.

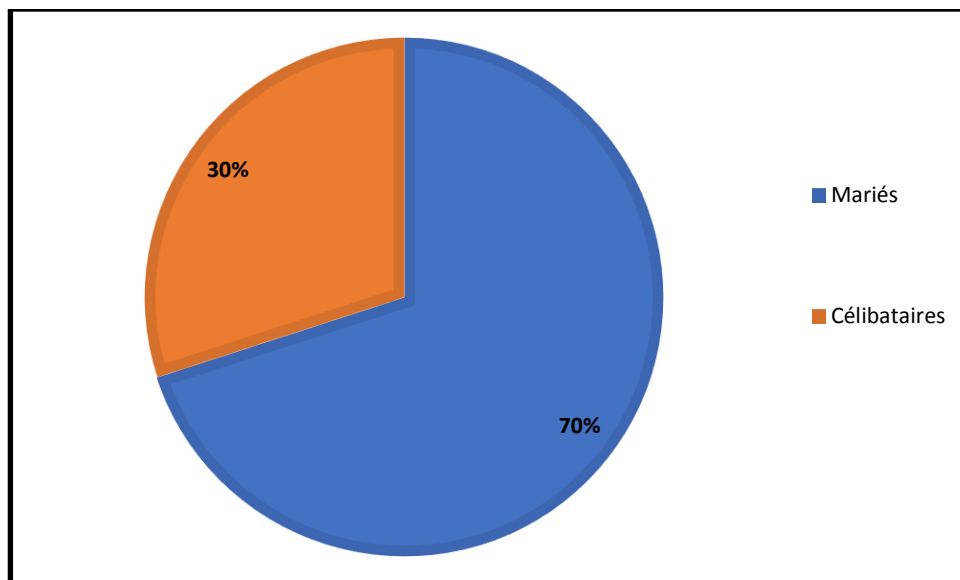


Figure 17 : Répartition de la population selon la situation familiale

2.4 Niveau scolaire

Les résultats relatifs au niveau d’instruction de la population âgée montrent que 51% n’ont aucun niveau d’instruction (population n’ayant jamais fréquenté l’école mais qui peut avoir suivi des cours de lutte contre l’analphabétisme), et 56,9% ont atteint le niveau de l’enseignement fondamental (primaire et secondaire) alors que la proportion de ceux ayant atteint le niveau supérieur ne dépasse pas 9 %.

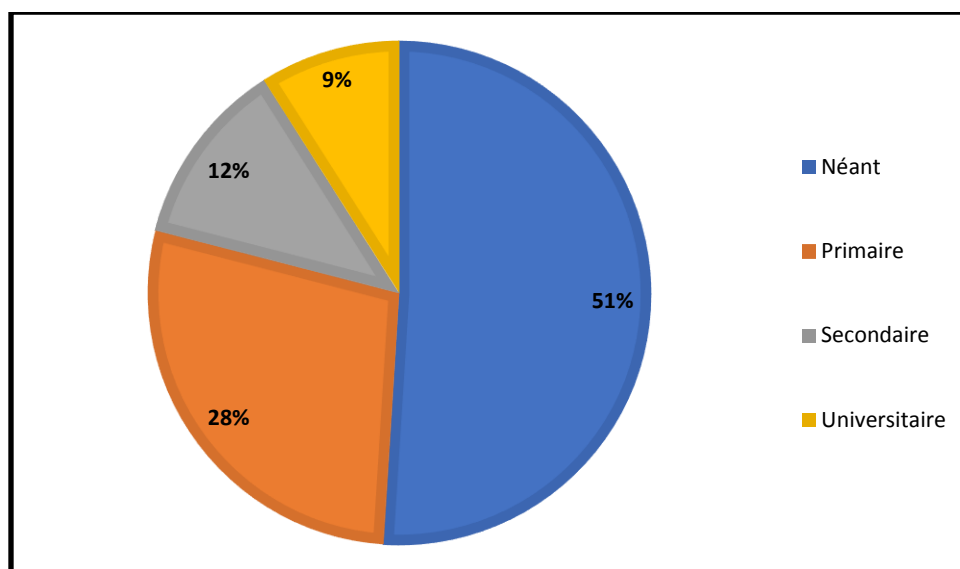


Figure 18 : Répartition de la population selon le niveau de scolarisation

2.5 Situation sociale

Les enquêtés se répartissaient entre femmes et hommes de la manière suivante :

(54%) des enquêtés sont des consommatrices alors 36% des personnes interrogées représente les agriculteurs. Les 10% restant sont des guérisseuses, apiculteurs, commerçants et tradipraticiens.

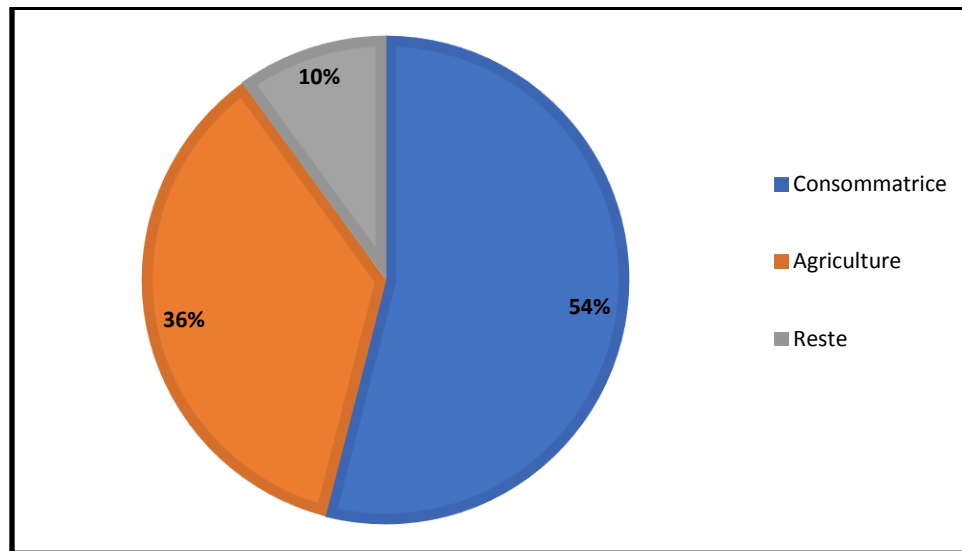


Figure 19 : Répartition de la population selon la situation sociale

3. Espèces végétales étudiées

3.1 Noms vernaculaires

Le tableau 5 expose les cinq plantes utilisées par les enquêtés à Beni Ammart. Pour chaque plante recensée, nous donnons le nom scientifique, la famille et le nom local.

Tableau 5 : Les espèces végétales utilisées

Nom scientifique	Famille	Nom local
<i>Cistus laurifolius</i>	<i>Cistaceae</i>	Boukoren, irguel
<i>Cistus salvifolius</i>	<i>Cistaceae</i>	Rbibi, Thanarghocht
<i>Daphne gnidium</i>	<i>Thymelaceae</i>	Arzzaz, Alzzaz
<i>Origanum elongatum</i>	<i>Lamiaceae</i>	Zaâtar, Zuy
<i>Thymus willdenowii.</i> <i>Boiss</i>	<i>Lamiaceae</i>	Dzukend, Zaaitera

3.2 Saison de floraison

Les cinq espèces se floraient dans la saison du printemps et d'été entre le mois de février et septembre. Comme résumé le tableau 6 :

Tableau 6 : La saison de floraison des espèces végétales

Espèce	Mois	Saison
<i>Cistus laurifolius</i>	Avril-juillet	Printemps-été
<i>Cistus salvifolius</i>	Mars-juin	Printemps
<i>Daphne gnidium</i>	Mars-Mai	Printemps
<i>Origanum elongatum</i>	Juin- septembre	Été
<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	Avril – Juin	Été

3.3 Parties utilisées

Dans la zone d'étude, les parties végétales les plus utilisées par les enquêtés sont les feuilles avec un pourcentage de 51.2% et le reste se répartit sur les autres parties de la plante. Nous exposons sur le tableau 7 les pourcentages des parties utilisées de la plante.

Tableau 7 : Les parties utilisées des espèces végétales

Parties utilisées	%	"poids" spécifique / partie utilisée	
Écorces	0.4	<i>Daphne gnidium</i>	100
Feuille, fleurs, Tiges	2.2	<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	100
Feuilles	58.4	<i>Cistus salvifolius</i>	39.5
		<i>Daphne gnidium</i>	37.1
		<i>Origanum elongatum</i>	8.98
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	14.1
		<i>Cistus laurifolius</i>	0.39
Feuilles, tiges	5.2	<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	100
Fleurs, Feuille	6.8	<i>Origanum elongatum</i>	50
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	50
Fruits	5.2	<i>Cistus laurifolius</i>	92.3
		<i>Daphne gnidium</i>	7.69
Fruits, grains	10	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Graines	5	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Plante entire	4.2	<i>Origanum elongatum</i>	52.4
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	47.6
Tige, Feuille	2.6	<i>Origanum elongatum</i>	100
Total	100		

3.4 Plante seule, association possible

Selon la population enquêtée, on distingue plusieurs modes d'utilisation : (30%) de la population prend les plantes seules, alors que 70 % utilisaient les plantes en association avec l'huile d'olive, le miel et le lait dans le cas d'*Origanum elongatum* et une combinaison avec le henné était préparée pour le *Daphne gnidium*.

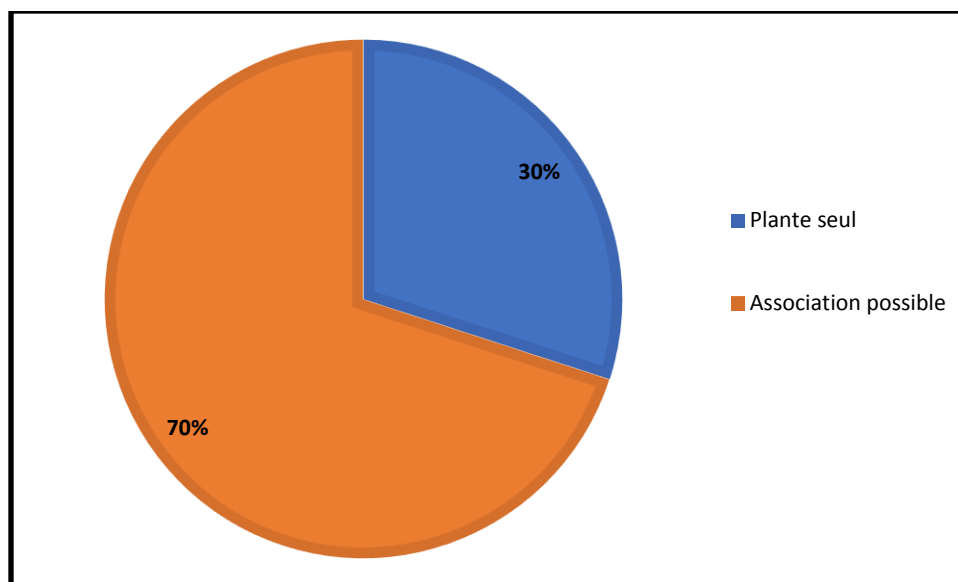


Figure 20 : Répartition des enquêtés utilisant les plantes seules ou en associations

4. Types d'usage

Les cinq espèces étudiées sont plus utilisées par les enquêtés à des fins thérapeutiques (55.8%) et (31.6%) sous forme des recettes en cuisine, (11.4%) pour la cosmétique et le reste comme usage pour la conservation des pommes de terre (*Origanum elongatum*). Les écorces de *Daphne gnidium* sont utilisées pour pêcher les poissons (Tableau 8).

Tableau 8 : Types d'usage des espèces végétales

Type d'usage	%	"poids" spécifique / type d'usage	
Alimentaire (saupoudré sur des salades)	0.20	<i>Origanum elongatum</i>	100
Conservation des pommes de Terre	0.80	<i>Origanum elongatum</i>	75.0
Conserver et parfume le beurre		<i>Thymus wilddenowii</i>	25.0
Cosmétique	11.4	<i>Daphne gnidium</i>	91.2
		<i>Origanum elongatum</i>	1.75
		<i>Thymus wilddenowii</i>	7.02
Pêche des poisson	0.20	<i>Daphne gnidium</i>	100
Recettes cuisine	31.6	<i>Origanum elongatum</i>	0.63
		<i>Cistus laurifolius</i>	44.3

		<i>Origanum elongatum</i>	0.63
		<i>Cistus salvifolius</i>	54.4
Thérapeutique	55.8	<i>Cistus laurifolius</i>	11.5
		<i>Cistus salvifolius</i>	4.30
		<i>Daphne gnidium</i>	16.8
		<i>Origanum elongatum</i>	33.3
		<i>Tymus willdenowii</i>	34.1
Total	100		

5. Médecine traditionnelle

5.1 Types de maladies

L'enquête ethnobotanique des cinq plantes étudiées a révélé que la plupart des maladies sont traitées par *Origanum elongatum*, ce dernier est l'un des espèces les plus utilisées dans les traitements des maladies respiratoires (27%). On trouve aussi *Thymus willdenowii. Boiss*, utilisé pour le traitement des mêmes maladies avec un pourcentage de (21%). Concernant *Cistus salvifolius et Cistus laurifolius*, sont des plantes largement employées par les habitants locaux dans les affections douloureuses (douleur d'estomac, douleur de vésicule...).

Daphne gnidium est une plante utilisée pour les traitements de cheveux et les soins du visage, elle est réputée pour ses propriétés cicatrisantes. Nous exposons dans (le tableau 9) les plantes utilisées par les enquêtés pour traiter différents types d'affections.

Tableau 9 : Types d'affections traitées

Affections	%	"poids" spécifique /Types de maladies	%
A, bactériens	1.88	<i>Origanum elongatum</i>	25
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	75
A, dermatologiques	3.13	<i>Daphne gnidium</i>	40
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	30
		<i>Origanum elongatum</i>	30
A, douloureuses	5.38	<i>Origanum elongatum</i>	42.1
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	50.5
		<i>Cistus salvifolius</i>	7.4
A, du tube digestif	4.38	<i>Origanum elongatum</i>	85.7
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	14.3
A, hépatiques	0.63	<i>Origanum elongatum</i>	100
A, Métaboliques	0.94	<i>Origanum elongatum</i>	100
A, neurologiques	1.88	<i>Origanum elongatum</i>	50
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	50
A, pulmonaires	4.02	<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	100
A, Refroidissement	2.82	<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	100
A, respiratoires	23.36	<i>Origanum elongatum</i>	70
	18.96	<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	30
A, rhumatismale	0.31	<i>Origanum elongatum</i>	100
A, troubles gastriques	3.76	<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	100
A, Microbiennes	0.31	<i>Origanum elongatum</i>	100
Alimentation	0.62	<i>Cistus salvifolius</i>	100
Amélioration des cheveux	16.33	<i>Daphne gnidium</i>	100
Cicatrisation	0.31	<i>Daphne gnidium</i>	100
Dermatologie	2.51	<i>Daphne gnidium</i>	100
Douleur de vésicule	0.63	<i>Cistus laurifolius</i>	100

Embouche	1.88	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Engraissement	2.82	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Mal estomac	0.31	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Parfum odeur	0.94	<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	100
Peche des poisson	0.31	<i>Daphne gnidium</i>	100
Refroidissement du corps	0.33	<i>Origanum elongatum</i>	58.8
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	41.2
Rhumatismale	0.94	<i>Origanum elongatum</i>	33.3
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	66.7
Saveurs les vases	0.31	<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	100
Total	100		

5.2 Modes de préparation

Les modes de préparation utilisés par la population de la Caïdat de Beni Ammart sont : la décoction est le plus fréquent (39%), suivie par la préparation en poudre (35%), puis la préparation par infusion (15%). Les autres modes (la macération, cataplasme et tisane) représentent (10%), comme l'indique le tableau 10.

Tableau 10 : Modes de préparations des espèces végétales

Modes	%	"poids" spécifique / Modes de préparation	%
Cataplasme	0.41	<i>Origanum elongatum</i>	100
Décoction	38.7	<i>Cistus laurifolius</i>	3.66
		<i>Cistus salvifolius</i>	52.4
		<i>Origanum elongatum</i>	24.6
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	18.3
Infusion	15.2	<i>Cistus laurifolius</i>	45.3
		<i>Daphne gnidium</i>	2.67
		<i>Origanum elongatum</i>	30.7
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	21.3

Macération	4.26	<i>Origanum elongatum</i>	28.6
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	71.4
Poudre	34.9	<i>Cistus laurifolius</i>	28.5
		<i>Daphne gnidium</i>	55.8
		<i>Origanum elongatum</i>	5.81
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	9.30
Tisane	6.49	<i>Cistus laurifolius</i>	6.25
		<i>Origanum elongatum</i>	37.5
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	56.3
Total	100		

5.3 Forme d'emploi

Le tableau 11 indique les formes d'emplois des cinq espèces. Les deux formes d'extrait aqueux et poudre représentent (55%), suivie par des formes de tisane et de recette (30%) pour les plantes *Origanum elongatum* et *Thymus willdenowii* et le reste comme aliment pour *cistus salvifolius* et *laurifolius*.

Tableau 11 : Formes d'emplois des espèces végétales

Forme d'emploi	%	"poids" spécifique / Forme d'emploi	%
Aliment apéritif	8.4	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Extrait aqueux	27.4	<i>Cistus salvifolius</i>	8.76
		<i>Daphne gnidium</i>	11.7
		<i>Origanum elongatum</i>	34.3
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	45.3
feuilles séchées	0.4	<i>Origanum elongatum</i>	100
Infusion	0.2	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Plante séchées	0.2	<i>Origanum elongatum</i>	100
Poudre	26.6	<i>Cistus laurifolius</i>	16.5
		<i>Cistus salvifolius</i>	1.50

		<i>Daphne gnidium</i>	63.2
		<i>Origanum elongatum</i>	6.77
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	12.0
recettes forme bakoula	17.2	<i>Cistus salvifolius</i>	100
Servent à fabriquer de zembo	6.6	<i>Cistus laurifolius</i>	100
Tisane	13	<i>Origanum elongatum</i>	63.1
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	33.8
Total	100		

5.4 Dose utilisée

Dans le caïdat de Beni Ammart la dose utilisée est habituellement donnée en g/verre. La dose de 10g/verre et 100g/verre utilisée représentent (92%). La quantité du reste varie selon le besoin et la maladie.

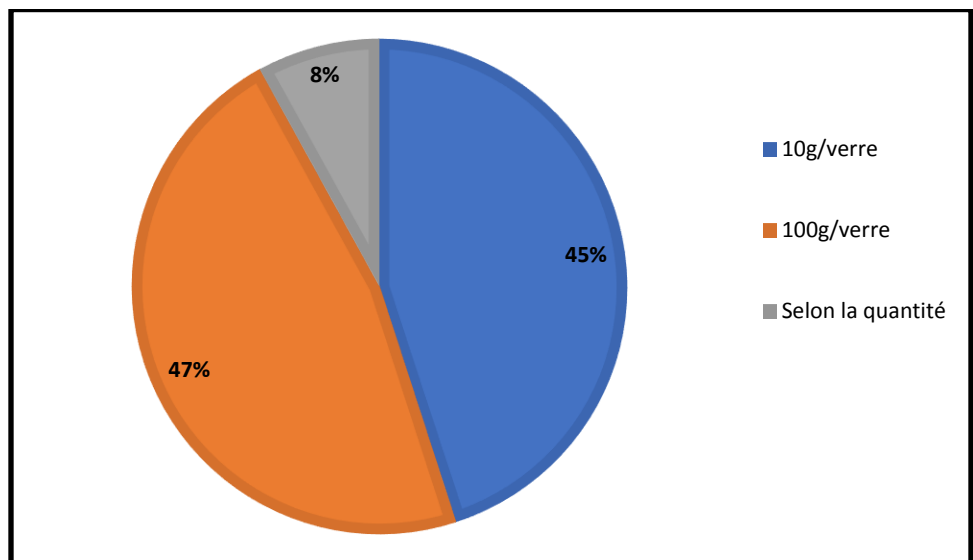


Figure 21 : Doses utilisées des espèces végétales

5.5 Mode d'administration

La plupart des traitements sont administrés par application locale (62%), suivi par voie orale (37%), le reste est utilisé comme des vapeurs chaudes, fumées en cigarettes et en pommade comme l'indique le tableau 12.

Tableau 12 : Modes d'administrations des espèces végétales

Mode	%	"poids" spécifique / Mode d'administration	%
Application locale Topique	61.5	<i>Cistus laurifolius</i>	32.9
		<i>Cistus salvifolius</i>	28.9
		<i>Daphne gnidium</i>	29.3
		<i>Origanum elongatum</i>	2.63
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	6.25
fumées en cigarettes	0.20	<i>Origanum elongatum</i>	100
Oralement	35.6	<i>Cistus salvifolius</i>	6.82
		<i>Origanum elongatum</i>	49.4
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	43.8
Pomade	1.01	<i>Daphne gnidium</i>	100
Rinçage	1.01	<i>Origanum elongatum</i>	20
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	80
Vapeur	0.61	<i>Origanum elongatum</i>	100
Total	100		

5.6 Posologie : nombre de prise par jour

La posologie proposée dans le traitement des maladies par les enquêtés est appliquée une fois par jour avec une fréquence de (68%), suivie de deux applications par jour (28%), trois prises par jour (2%) et le reste est limité à une application pendant la maladie.

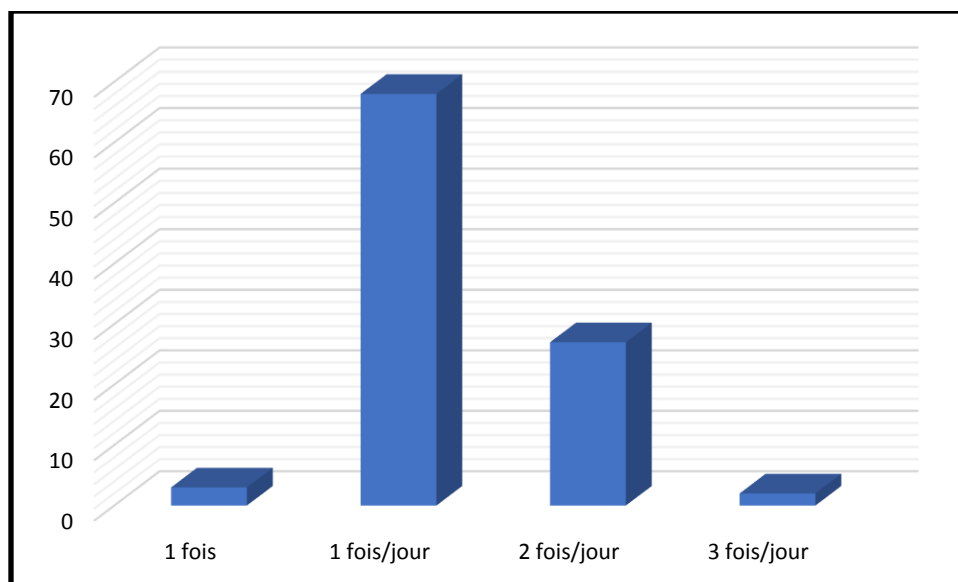


Figure 22 : nombre de prise par jour

5.7 Durée d'utilisation

Les enquêtés estiment que la durée du traitement dépend de la gravité de la maladie, (25%) d'entre eux ont évalué cette durée à chaque utilisation, la même fréquence marquée pour un traitement d'une durée d'un jour (25%), suivie par (19 %) des enquêtés utilisent des traitements durant une semaine, des enquêtés utilisent les spécifiques *Cistus salvifolius* et *C. laurifolius* en dehors des repas (25%). D'autres pensent que la durée du traitement peut atteindre un mois ou plus parfois peut aller jusqu'à la guérison.

Tableau 13 : Durée d'utilisation des espèces végétales

Durée d'utilisation	%	"poids" spécifique / Durée d'utilisation	%
12mois	0.20	<i>Origanum elongatum</i>	100
6 mois	0.20	<i>Origanum elongatum</i>	100
chaque repas	3.47	<i>Cistus laurifolius</i>	88.24
		<i>Origanum elongatum</i>	11.8
chaque utilisation	23.9	<i>Cistus laurifolius</i>	39.3
		<i>Cistus salvifolius</i>	1.71
		<i>Daphne gnidium</i>	55.6
		<i>Origanum elongatum</i>	0.85

		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	2.56
Dehors des repas	24.7	<i>Cistus laurifolius</i>	28.9
		<i>Cistus salvifolius</i>	71.1
Jusqu'à la guérison	4.08	<i>Origanum elongatum</i>	15
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	85
Un jour	24.7	<i>Daphne gnidium</i>	11.6
		<i>Origanum elongatum</i>	47.9
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	40.5
une semaine	18.8	<i>Cistus laurifolius</i>	4.35
		<i>Cistus salvifolius</i>	13.0
		<i>Daphne gnidium</i>	13.0
		<i>Origanum elongatum</i>	35.9
		<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	33.7
Total	100		

5.8 Résultat du traitement

Suite au traitement, (62.2%) des enquêtés observent une amélioration dans l'état de la personne traitée tandis que (37.8%) des enquêtés croient en un entière guérison de leur maladie après un traitement adéquat.

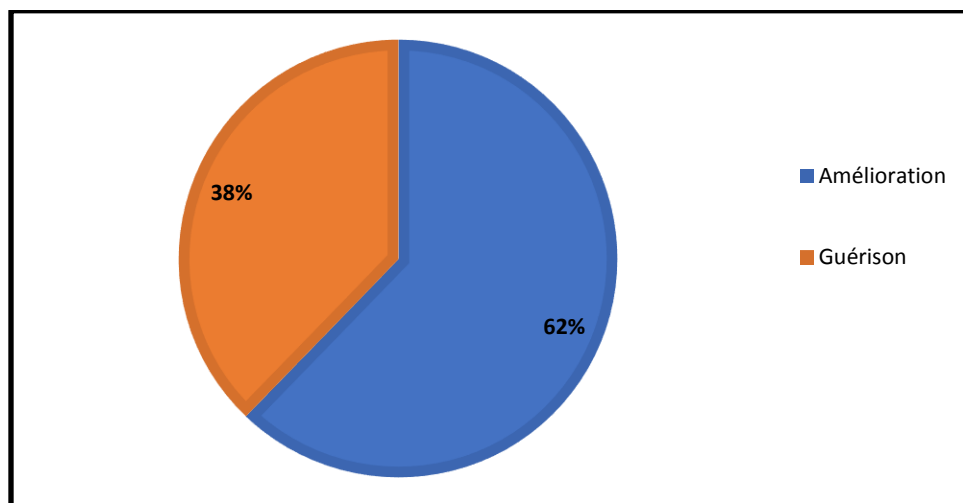


Figure 23 : Résultat de traitement par les plantes étudiées

5.9 Effets secondaires

Concernant le traitement par ces plantes, quelques effets indésirables ont été signalés. Parmi eux on trouve les effets cités dans le tableau 14.

Tableau 14 : Effets secondaires causées par les espèces végétales

Effets	%	"poids" spécifique / Effets secondaires	%
Allergie, vertige	8.82	<i>Origanum elongatum</i>	66.7
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	33.3
Avortement, tremblement	13.2	<i>Origanum elongatum</i>	44.4
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	55.6
créé des symptômes	2.94	<i>Daphne gnidium</i>	100
Douleur de vésicule	1.47	<i>Origanum elongatum</i>	100
Étourdissement	2.94	<i>Origanum elongatum</i>	100
formation des ampoules	1.47	<i>Daphne gnidium</i>	100
formation des plaies	1.47	<i>Daphne gnidium</i>	100
infection des yeux	1.47	<i>Daphne gnidium</i>	100
inflammation	10.3	<i>Daphne gnidium</i>	14.3
		<i>Origanum elongatum</i>	14.3
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	71.4
La Nausée	7.35	<i>Origanum elongatum</i>	100
Mal d'estomac	18.11	<i>Origanum elongatum</i>	50
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	50
Nocifs	2.94	<i>Daphne gnidium</i>	100
Nocifs Pour les bébés	20.6	<i>Origanum elongatum</i>	64.3
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	35.7
Vomissement	5.88	<i>Origanum elongatum</i>	100
Total	100		

5.10 Toxicité

Suite au traitement des espèces végétales étudiées, quelques espèces peuvent contenir des contaminants toxiques, ce qui engendre l'apparition de taches rouges au niveau de la peau, des douleurs digestives à l'estomac et des désordres au niveau du système nerveux. Parfois cela peut causer la mort dans le cas de la consommation de l'écorce de *Daphne gnidium*.

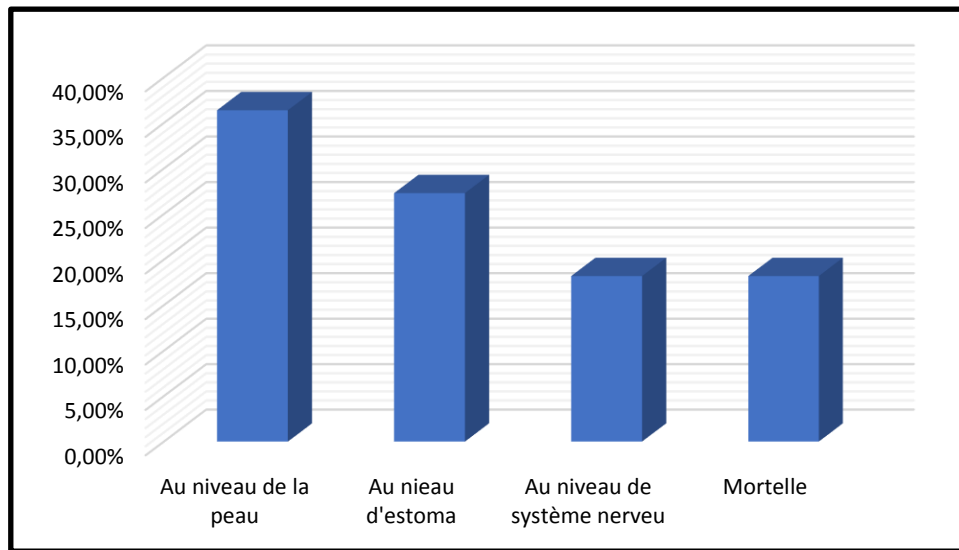


Figure 24 : Fréquences des effets toxiques des espèces végétales.

5.11 Précaution d'emploi

L'utilisation des espèces végétales peut être dangereuse, suivant : la dose (29.3%), la période de lactation (19%), les méthodes de conservation et de stockage (31%) ; qui peuvent altérer les propriétés des plantes comme indique le tableau 15.

Tableau 15 : Précautions d'emplois des espèces végétales

Précaution d'emploi	%	"poids" spécifique / Précaution d'emploi	%
Allergie de la peau	6.90	<i>Origanum elongatum</i>	100
Écorces de daphne	3.45	<i>Daphne gnidium</i>	100
Fort dose	29.3	<i>Daphne gnidium</i>	35.3
		<i>Origanum elongatum</i>	47.1

		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	29.4
Combinaison avec d'autres herbes	15.5	<i>Origanum elongatum</i>	100
Femmes enceintes	6.90	<i>Origanum elongatum</i>	100
Mal conservation	15.5	<i>Origanum elongatum</i>	44.4
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	55.6
Période de lactation	19.0	<i>Origanum elongatum</i>	63.6
		<i>Thymus wilddenowii. Boiss</i>	36.4
Vapeur d'extraction de plante	3.45	<i>Origanum elongatum</i>	100
Total	100		

III. Discussion

1. Description des interviewés

Dans notre étude, les résultats obtenus concernant le genre des enquêtés montre que les femmes utilisent les plantes traditionnelles plus que les hommes, ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'elles les utilisent dans d'autres usages que la médication, par exemple l'usage cosmétique, et aussi par la responsabilité de la femme envers les membres de la famille. Les femmes effectuent la préparation des recettes pour les soins aux enfants en premier lieu. Ce résultat est conforme à des enquêtes antérieures [124-125].

Les plantes étudiées sont utilisées par les informateurs les plus âgés. D'une part, ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les gens âgés ont une longue expérience concernant la médecine traditionnelle, par rapport aux autres tranches d'âges. D'autre part, ils sont une source majeure d'informations au niveau local sur l'utilisation des plantes en médecine traditionnelle et les acquièrent avec l'expérience cumulée en vieillissant [123]. On note aussi que les jeunes ont tendance à recourir à la médecine moderne, et n'ont pas de confiance en la médecine traditionnelle. La transmission de connaissances sur les usages et les propriétés des plantes médicinales d'une génération à l'autre reste à risque car elle n'est pas toujours sûre [121, 126, 128, 129].

Les résultats de la (Figure 17) montrent que les plantes étudiées sont plus utilisées par les personnes mariées. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'elles sont responsables en tant que parents à donner les premiers soins en particulier pour leurs enfants et aussi par la réduction des charges d'achat des médicaments. Ce résultat concorde avec ceux obtenue par *Benkhnigue et al (2011) et Hafian et al (2014)* [126,127].

Selon le recensement général réalisé en 2014 par le Haut-commissariat du plan, le caïdat de Beni Ammart présente un niveau de scolarisation très faible, avec un pourcentage de 47.7%. L'analphabétisme atteint des niveaux notamment élevés chez les femmes avec un pourcentage de 60.5% contre 30.8% chez les hommes (HCP, 2014). Dans la zone d'étude, 51% des usagers des plantes sont des analphabètes, cette proportion relativement élevée est en corrélation directe avec le niveau d'étude de la population locale. Néanmoins, les personnes ayant un niveau primaire présentent un pourcentage de 28 %, alors ces plantes sont rarement utilisées par les personnes ayant un niveau secondaire et universitaire, Ceci s'explique par le fait que les universitaires ayant un niveau de scolarité plus important qui leurs permettent de lire et assimiler les manuscrits qui traitent de la phytothérapie.

Au niveau de la répartition de la population selon la situation sociale, les enquêtés sont généralement des consommatrices, des agriculteurs, des guérisseuses, des apiculteurs, des commerçants et des tradipraticiens, sachant que les commerçants sont souvent des femmes vendant des beignets, des arachides ou de la bouillie traditionnelle de riz, manioc ou maïs.

2. Usages des espèces étudiées

Au cours de notre enquête dans la zone d'étude, nous avons recensées que les feuilles sont les plus utilisées, constituant environ 51.2% des préparations suivies des grains. Ces résultats seraient en accord avec ceux de *Maregesi et al (2007)* [130]. La forte utilisation des feuilles et des grains est due à la rapidité de leur récolte [131], et parce qu'elles sont considérées comme le lieu de stockage des métabolites secondaires responsables des propriétés biologiques de la plante [132]. En effet, il existe une relation claire entre la partie de la plante utilisée et les effets de cette exploitation sur son existence. Cependant, l'utilisation des feuilles ne pose aucun risque pour la régénération des plantes

et assurera la préservation de leur continuité [133]. Tandis que les années dernières, les gens exercent une pression de collecte intensive sur les plantes de *O. elongatum* et de *T. willdenowii*. *Boiss* ce qui risque de provoquer leur disparition du caïdat de Beni Ammart si aucune mesure de protection n'est prise par les services concernés.

De toutes les zones d'enquêtes, nous avons compris que la plupart des plantes interviennent dans le traitement des affections respiratoires, suivi par des affections digestives, ensuite des affections de soins de la peau et des cheveux, et des affections de système circulatoire et dermatologique. Les feuilles et les tiges de *O. elongatum* et de *T. willdenowii*. *Boiss* sont utilisées dans le traitement des diarrhées simples ou sanguinolentes, en association avec le miel. Leurs feuilles pilées sont appliquées en cataplasme que l'on change deux fois par jour servent à soigner les dermatoses. L'infusion de *O. elongatum* et du *T. willdenowii* est recommandée pour le soin des troubles digestifs. Ces plantes sont utilisées aussi dans le cas de l'allergie de la peau. Cependant la décoction ou l'infusion des feuilles de *T. willdenowii*. *Boiss* est utilisée pour le soin des douleurs musculaires et rhumatismales, ainsi que les troubles intestinales et les nausées.

Concernant l'usage externe des espèces d'*O. elongatum* et *T. willdenowii*. *Boiss*, les enquêtés préconisent, la décoction et les macérations chaudes des feuilles qui servent en bains de vapeur pour le soin des fièvres et des symptômes grippaux.

Ces modes de préparations peuvent être pris oralement et parfois d'une façon topique. De même certaines préparations de ces plantes sont employées pour le traitement des affections respiratoires, la décoction de 100g de feuilles d'*O. elongatum* dans un verre de 0,5 litre d'eau est prise une fois par jour pendant 3 jours, après le dîner pour le soin de la toux sèche. On y ajoute à l'occasion du miel. La décoction d'écorce et des feuilles est, également, utilisée en bain de bouche pour soulager les maux des dents Elle est aussi préconisée pour lutter contre la fatigue, les maux de dos. Pour le soin de la constipation, une décoction de 100 grammes de feuilles par litre d'eau à raison d'un verre au coucher est recommandée pour les adultes uniquement. Ce traitement ne doit pas être prolongé au-delà de trois jours et est contre-indiqué chez les enfants, les femmes enceintes et les personnes âgées.

Les enquêtées ont utilisé la plante entière d'*O. elongatum* pour la conservation des pommes de terre, et les feuilles sont utilisées dans la cuisine comme des épices. A Beni

Ammart, les fruits de *Cistus laurifolius* et *Cistus salvifolius* sont utilisées comme aliment apéritif même pour quelqu'un qui n'est pas malade. Ils préconisent de préparer les feuilles en décoction ou infusion, à raison d'un verre pour les adultes et un demi-verre pour les enfants, à boire une ou deux fois par jour comme digestif. L'extrait par macération ou par infusion sont d'autres voies d'administration pour soulager les règles douloureuses, et pour calmer les vomissements et les diarrhées qui s'accompagnent de manque d'appétit tandis que les feuilles sont consommées pour le soin des maux de ventre. Les doses de traitement sont prises par le soigné en dehors des repas jusqu'à la guérison avec un nombre de prise d'une ou deux fois par jour. Elles varient de 10 g à 100g par verre de 0,5 litre d'eau.

Quelques enquêtés ont évoqué, par ailleurs, des effets secondaires liés à l'usage de certaines préparations obtenues à partir d'*O. elongatum*, *T. willdenowii*. Boiss tels que vomissement, allergie, vertige, diarrhée et peuvent causer l'avortement chez les femmes enceintes. En fait, il est rapporté que les plantes ont généralement un goût amer. En raison de l'absence d'information sur la toxicité, ils conseillent de respecter les doses, de limiter le temps du traitement, de veiller à une bonne conservation et surtout d'éviter de mélanger la plante avec d'autres herbes.

Par ailleurs, d'autres enquêtées ont utilisés les feuilles de *Daphne gnidium* en association au henné contre la chute des cheveux et pour les rendre brillants, les graines comme poisons pour pêcher des poissons. Ils ont aussi signalé une forte toxicité des graines. Cette conclusion vient de l'effet mortel de cette plante observé sur les animaux après la consommation de quelques baies par le bétail de la région. Vu la toxicité rapportée chez l'animal, l'usage interne de la plante est à proscrire. Son usage traditionnel externe doit être fait avec précautions. Les effets énumérés peuvent être associés à un surdosage mais en réalité, il est difficile de conclure sur les effets secondaires et les effets toxiques de ces plantes car le concept de dose ne peut pas être maîtrisé par la population de la région [134-137].

Finalement ces résultats confirment bien que les plantes étudiées sont traditionnellement utilisées pour des fins médicinales très diverses et devraient constituer un important réservoir de composés bioactifs qui mérite une exploration scientifique intensive.

Conclusion

Les plantes médicinales dans leur environnement et par leurs métabolites secondaires, constituent une source de guérison de maladies. Cette enquête ethnobotanique a permis de préciser les diverses utilisations médicinales traditionnelles de cinq plantes récoltées du caïdat de Beni Ammart, et de recueillir les informations sur la nature leurs usages.

Parmi les espèces les plus utilisées par la population figurent l'*Origanum elongatum*, et le *Thymus willdenowii*. Boiss, appartenant aux familles de *Lamiaceae*, qui sont considérées comme des plantes très efficaces, surtout contre les affections respiratoires.

Malheureusement, ces deux plantes sont déjà en voie de disparition, en raison de la récolte aléatoire et de la forte demande de l'extérieur. Tandis que le *Cistus laurifolius* et le *Cistus salvifolius* sont moins utilisées. Vu la toxicité signalée chez le *Daphne gnidium*, les enquêtés préconisent un usage traditionnel externe de la plante. A cet effet, ces plantes pourraient être considérées comme une source de produit bioactifs.

À l'issue de cette enquête, des études phytochimiques et des activités biologiques sur ces plantes seront faites dans le but d'une validation scientifique des usages traditionnels de ces plantes.

Introduction

Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. Ils se classent en de nombreux groupes de molécules différentes classées en familles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes, etc.

Daphne gnidium, *Origanum elongatum*, *Cistus salvifolius*, *Cistus laurifolius*, et *Thymus willdenowii*. Boiss, récoltés du caïdat de Beni Ammart, sont parmi les plantes médicinales employée dans la médecine traditionnelle par la population, pour le traitement de plusieurs maladies.

L'objectif de cette étude est d'extraire les métabolites secondaires par deux méthodes d'extraction afin d'estimer la teneur en composés phénoliques des plantes médicinales, par une étude phytochimique qualitative et quantitative.

I. Matériel et Méthodes

➤ Principe des expériences

Le principe d'extraction par Soxhlet est basé sur épuisement successif du matériel végétal et l'extraction par sonication est une technique basée sur l'utilisation des ultrasons pour extraire des principes actifs, selon deux méthodes : en gardant le matériel végétal et en le renouvelant à chaque extraction.

Des tests en tube sont réalisés sur les poudres végétales afin de déterminer de manière préliminaire la nature des différents constituants contenus dans les feuilles des plantes étudiées. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration.

Le principe des analyses quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents extraits est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude, entraînant ainsi la formation d'un complexe rose, ainsi l'oxydation des phénols par le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et

d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) qui est réduit en un mélange d'oxydes bleus du tungstène et de molybdène, la coloration produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques totaux.

1. Matériel végétal

1.1 Collecte et conservation

Les plantes ont été récoltées en février et en septembre 2014, dans le caïdat de Beni Ammart d'Al-Hoceima.

L'identification des espèces végétales a été effectuée au niveau de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate (ex INPMA devenu ANPMA : Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques) par Monsieur A. ENNABILI professeur de botanique. Le tableau 16 présente les caractéristiques géographiques des stations de récolte, les familles botaniques et les noms scientifiques des différentes plantes étudiées, ainsi que les parties utilisées.

Tableau 16 : Lieu de récolte des plantes et caractéristiques géographiques des stations d'étude

Espèce	Période de la récolte	Famille	Stations	Partie utilisée	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)
<i>Daphne gnidium L.</i>	Février 2014	<i>Thymelaeaceae</i>	Beni Ammart	Feuilles	4°9'0" W	34°48'36" N	1276
<i>Origanum elongatum</i>	Février 2014	<i>Lamiaceae</i>	Beni Ammart	Feuilles	4°9'0" W	34°48'36" N	1276
<i>Cistus salviifolius</i>	Février 2014	<i>Cistaceae</i>	Beni Ammart	Feuilles	4°9'0" W	34°48'36" N	1276
<i>Cistus laurifolius</i>	Février 2014	<i>Cistaceae</i>	Beni Ammart	Feuilles	4°9'0" W	34°48'36" N	1276
<i>Thymus willdenowii. Boiss</i>	Février 2014	<i>Lamiaceae</i>	Beni Ammart	Feuilles	4°9'0" W	34°48'36" N	1276

Les espèces ont été nettoyées des impuretés, découpées, séchées à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours. Ensuite les parties aériennes ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui a été conservée jusqu'à son utilisation.

2. Méthodes d'extraction

La préparation des extraits a été réalisée par deux méthodes d'extraction, Soxhlet et sonication. En utilisant des solvants à polarité croissante : Hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane et méthanol. En outre, l'échantillon de *D. gnidium* a été extrait à la fois par soxhlet et par sonication afin de faire de comparer les deux méthodes. Les autres plantes (*O. elongatum*, *C. salviifolius*, *C. laurifolius* et *T. willdenowii*. Boiss) ont été extraites uniquement par sonication. Ces extraits ont fait l'objet de deux dosages : polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux puis leurs capacités antioxydante et vasodilatatrice ont été évaluée.

2.1 Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet a été réalisée par épuisement successif du matériel végétal, en utilisant trois solvants de polarité croissante : l'hexane, l'acétate d'éthyle (A. E) et le méthanol (*MeOH*).

➤ Protocol d'extraction

L'extraction au Soxhlet a été réalisée en suivant le protocole de Vongsak et al, (2013) avec quelque modification [138].

160 g du matériel végétal en poudre sont introduits dans une cartouche en cellulose fixée sur un ballon, et surmonté d'un réfrigérant. 2 L d'hexane sont placés dans le ballon du dispositif. L'extraction est complète lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair (environ une semaine d'extraction). Le contenu du ballon est évaporé, par la suite, sous pression réduite à 40°C, jusqu'à élimination du solvant, dans un ballon pré-pesé. Une pesée à ce stade permet le calcul du rendement en extrait.

Le résidu, ainsi obtenu, a été extrait de nouveau par 2 L d'acétate d'éthyle jusqu'à ce que le solvant d'extraction devienne clair (environ 6 jours d'extraction). Enfin, l'extraction

par 2 L de méthanol a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (environ 4 jours d'extraction).

Après chaque extraction, le solvant est éliminé et le ballon est pesé pour calculer le rendement. Le protocole de cette extraction est résumé dans le schéma ci-après.

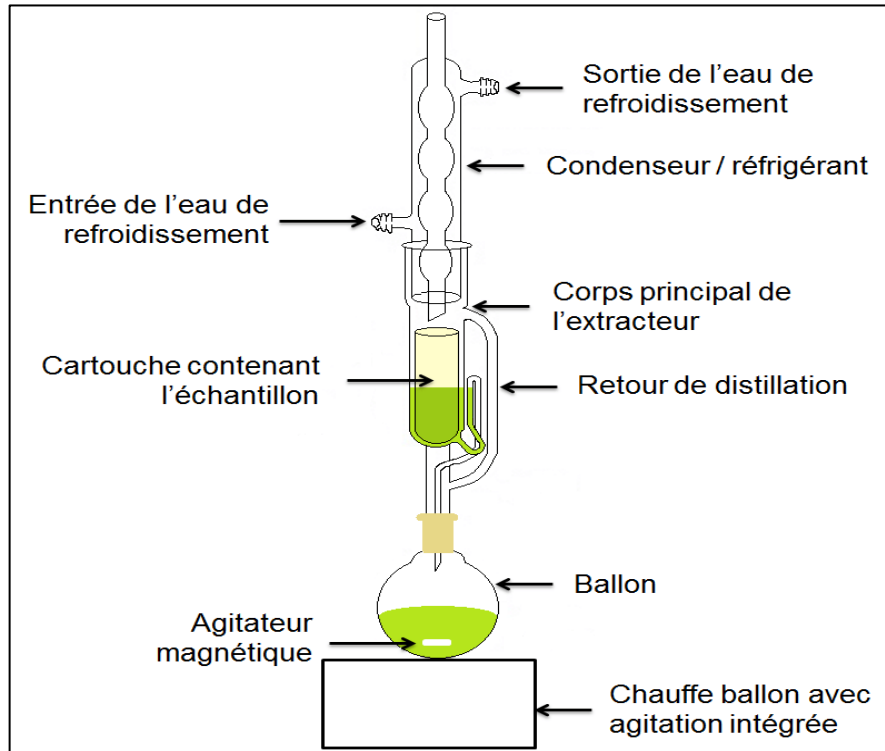


Figure 25: Schéma de l'extracteur Soxhlet

La série d'extraction permet d'obtenir trois extraits organiques : un extrait hexanique, un extrait d'acétate d'éthyle et un extrait méthanolique (MeOH). Les extraits secs sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation [139].

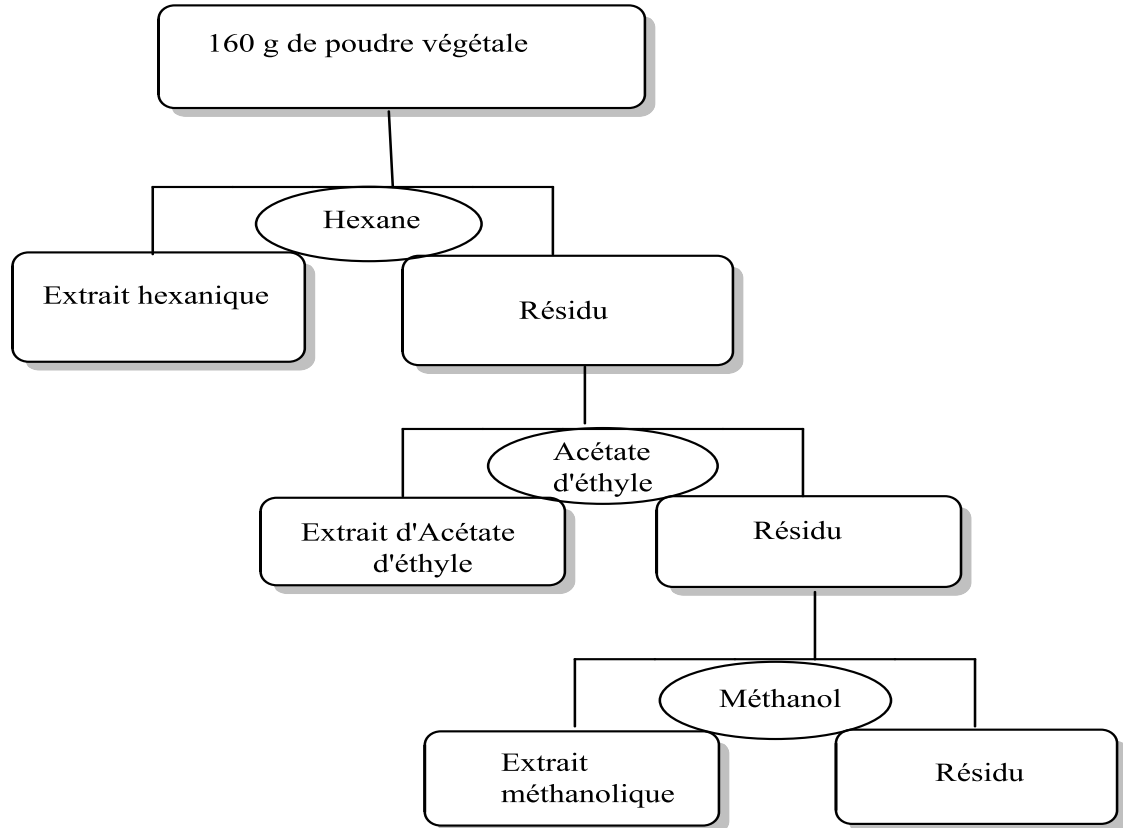


Figure 26 : Protocole d'extraction des feuilles de *D. gnidium* par Soxhlet.

2.2 Extraction par sonication

L'extraction par sonication est une technique basée sur l'utilisation des ultrasons pour extraire des principes actifs. Nous avons utilisé deux méthodes : en gardant le matériel végétal et en le renouvelant à chaque extraction.

➤ *Daphne gnidium*

Pour extraire les principes actifs de *D. gnidium* par sonication, en utilisant trois solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle, et le méthanol).

➤ Protocole d'extraction

25g de matériel végétal sont mis en contact avec 250 ml du solvant dans un ballon de sonicateur, la sonde est immergée d'environ 4cm dans l'échantillon pour générer les ultrasons pendant 45 min en alternance de 3 secondes en mode actif et 1 seconde en mode inactif (60 min de temps total).



a



b

Figure 27: Sonde immergée dans l'échantillon

Figure 28: l'appareil de sonication

Après filtration sur papier filtre, le résidu de l'extraction précédente a été repris dans 250 ml d'acétate d'éthyle, la sonde est introduite dans la suspension afin de pulvériser la matière végétale. Enfin, le résidu est extrait à nouveau par 250 ml de méthanol dans les mêmes conditions. Les extraits ont par la suite été évaporés à l'évaporateur sous pression réduite, l'extrait sec pesé et conservé à 4°C.

➤ **Extraction par sonication des cinq plantes étudiées**

Les extractions par sonication des cinq plantes ont été effectuées dans quatre solvants différents (l'hexane, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le méthanol), et le matériel végétal a été renouvelé à chaque extraction.

Les extraits ont été conservés à une température de 4°C jusqu'à utilisation.

2.3 Calcul de Teneur en eau

Nous avons introduit 2g de la poudre dans un verre de montre préalablement taré. Le verre et son contenu est placé dans l'étuve à 100°C pendant 24h. Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), le verre de montre est pesé.

Le taux d'humidité est calculé selon la formule suivante :

$$X(\%) = \frac{(M - M')}{2} * 100$$

X (%) : Taux d'humidité exprimé en %.

M : Masse de l'échantillon avant le séchage.

M' : Masse de l'échantillon après le séchage.

2.4 Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante :

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

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec obtenu

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

II. Étude phytochimique

Plusieurs analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées sur les extraits obtenus afin de faire une étude phytochimique des plantes choisies.

1. Analyse qualitative

Les tests de caractérisation qualitative sont basés soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration [140].

1.1 Révélation des polyphénols

➤ Révélation des flavonoïdes

Cette méthode consiste à traiter 5ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'*HCL* concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe au bout de 3 minutes [141].

➤ Révélation des tanins

Pour mettre en évidence les polyphénols, la réaction au chlorure ferrique (*FeCl₃*) a été utilisée. Ainsi, à 2ml de chaque solution, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés

polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée. Le témoin est effectué avec la solution alcoolique d'acide gallique [142].

2. Analyse quantitative

2.1 Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux

➤ Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols pour les différents extraits de plantes a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu [143].

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'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. La coloration produite, dont l'absorption maximum est à 750 nm, étant proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

0,2 ml de l'extrait est introduit dans un tube qui contient initialement 1,8 ml d'eau distillée, puis 0,2 ml de réactif Folin-Ciocalteu est ajouté. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex. Après 5 min, puis on ajout 2 ml d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7%).

Le mélange réactionnel est finalement laissé à incuber durant 90 min à l'obscurité. L'absorbance est lue à 750 nm contre le témoin [144].

Une droite d'étalonnage est préalablement réalisée avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. La quantité des composés phénoliques totaux est exprimée en $\mu\text{g EAG} / 100\text{mg}$ d'extrait. Chaque échantillon est répété trois fois.

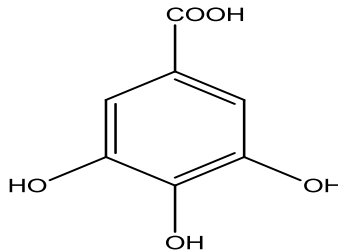


Figure 29: Structure de l'acide gallique

➤ Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits de la plante a été réalisé par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium $AlCl_3$. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Arvouet-Grand [145].

Pour cela, 0,5 ml de l'extrait est introduit dans un tube contenant 2 ml d'eau distillée. A $t=0$, on ajout 0,15 ml de nitrite de sodium $NaNO_2$ à 5%. On agite pendant 6 minutes puis on rajoute 0,15 ml d' $AlCl_3$ à 10%. Après 5 minutes on rajoute 1 ml de $NaOH$ (1M) puis on ajuste le volume à 5 ml avec de l'eau distillée.

Une droite d'étalonnage est réalisée avec la quercétine (flavonoïde de référence) dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. La quantité des flavonoïdes totaux est exprimée en μg quercétine /100mg d'extrait. Chaque échantillon est répété trois fois.

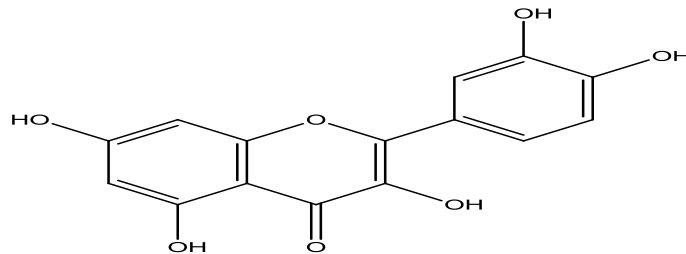


Figure 30: structure de quercétine

La quantité de flavonoïdes totaux de l'extrait testé est calculée à l'aide de l'équation de la droite d'étalonnage.

III. Résultats et discussion

1. Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches en renferment de 60 à 80 %. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10% [146]. Nous avons donc utilisé la méthode pondérale pour en déterminer la teneur dans la poudre des feuilles sèches de notre plantes. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Masse de l'échantillon avant le séchage $m = 2$ g

Masse de l'échantillon après le séchage $m' = 1,85$ g

$$X(\%) = \frac{(2 - 1.85)}{2} * 100 = 7.5\%$$

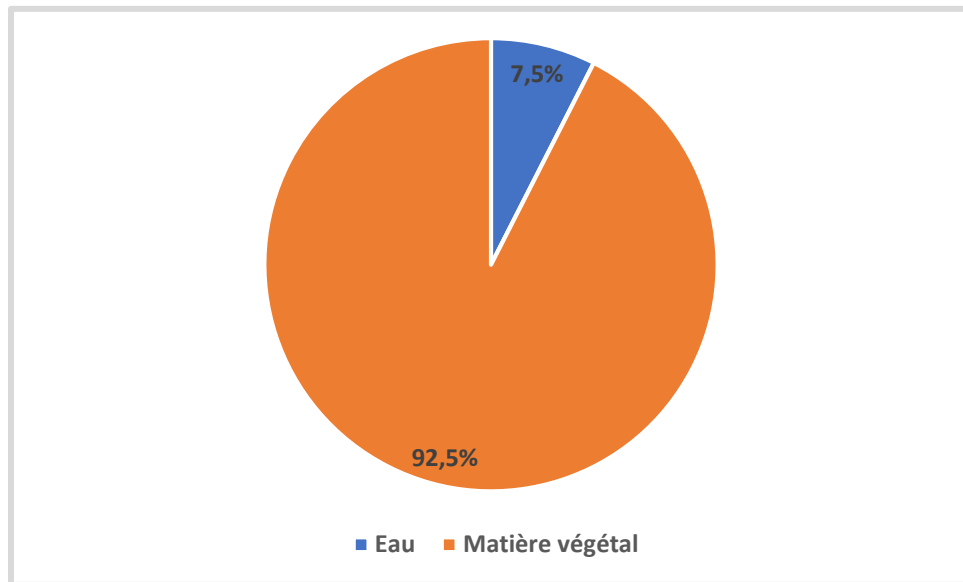


Figure 31: Teneur en eau dans les plantes étudiées.

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10%, dans les plantes des espèces, avec une valeur égale à 7,5%. La teneur en eau, inférieure à 10% confère à notre poudre une meilleure conservation à long terme.

2. Rendements des extractions

1.1 Extraction par Soxhlet et sonication

Les résultats des rendements d'extraction par Soxhlet et sonication (en gardant le même matériel végétal) de *D. gnidium* par les trois solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol), sont mentionnés dans le tableau ci-après.

Tableau 17 : Rendements des extraits par deux méthodes d'extraction

Matériel végétale	Méthodes	Extrait	Rendement %
<i>Daphne gniduum</i>	Soxhlet	-Hexane	5,04
		-Acetate d'éthyle	6,94
		-Methanol	29,76
	Sonication	-Hexane	4,32
		-Acetate d'éthyle	15,2
		-Methanol	10,52

Nous constatons que, parmi les trois extraits obtenus par l'extraction au Soxhlet, l'extrait méthanolique présente le rendement le plus élevé (29,76 %), suivi de l'extrait dans l'acétate d'éthyle avec un rendement de (6,94 %). Le rendement faible est celui de l'extrait hexanique de l'ordre de (5,04%).

Donc, on peut conclure que la nature du solvant est l'un des facteurs qui influencent les performances de l'extraction et que le rendement augmente avec la polarité du solvant utilisé dans le soxhlet.

Les pourcentages obtenus avec l'extraction par sonication sont compris entre (04,32%) et (10,52 %). L'espèce *D. gniduum* extraite par l'acétate d'éthyle donne le meilleur rendement (15,20%), suivi par le rendement dans le méthanol (10,52%), tandis que le plus faible rendement est celui de l'hexane, soit (4,32 %).

Le rendement d'extraction est tributaire de la nature du solvant et plus précisément de sa polarité.

1.2 Comparaison du rendement de *D. gnidium* par deux méthodes d'extraction

Nous avons extrait le *D. gnidium* utilisant deux méthodes, par Soxhlet et par sonication afin de comparer les rendements de ceux deux méthodes. Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure suivante.

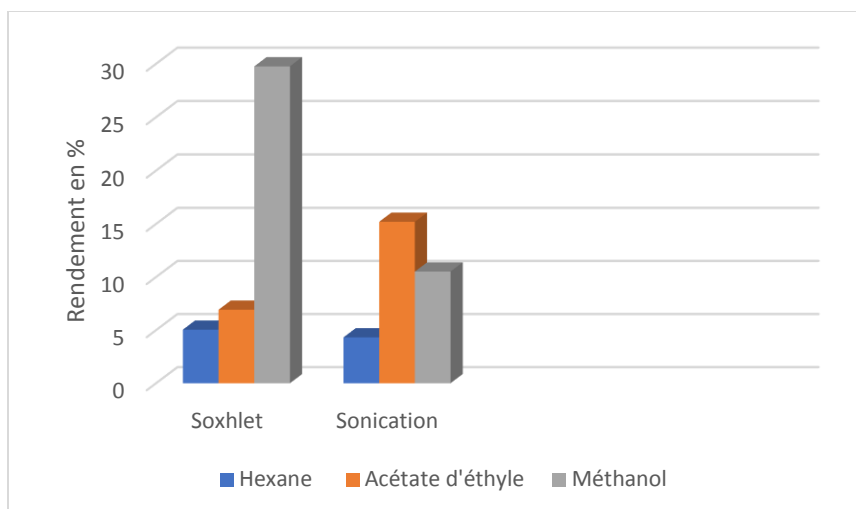


Figure 32 : Rendements d'extraction de la *D. gnidium* par les deux méthodes d'extraction

Le meilleur rendement a été obtenu dans le méthanol par le Soxhlet (29.75%), et le rendement le plus élevé pour l'extraction par sonication était avec l'acétate d'éthyle (15,2%).

Comme cité précédemment, le rendement augmente avec la polarité du solvant dans le cas de l'extraction par Soxhlet.

Quant à l'extraction par sonication, c'est l'extrait dans acétate d'éthyle qui a donné le meilleur rendement. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les ultrasons font éclater la cellule végétale et les principes actifs sont, ainsi, libérés. Lorsque le matériel végétal subit des extractions successives dans plusieurs solvants, le rendement diminue avec le nombre d'extractions.

1.3 Rendement d'extraction des cinq plantes par sonication

L'extraction par sonication des cinq plantes *D. gnidium*, *O. elongatum*, *C. salviifolius*, *T. willdenowii* et *C. laurifolius*, a été effectuée dans quatre solvants (l'hexane, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le méthanol) en renouvelant à chaque extraction le matériel végétal. Les résultats sont regroupés dans la figure suivante.

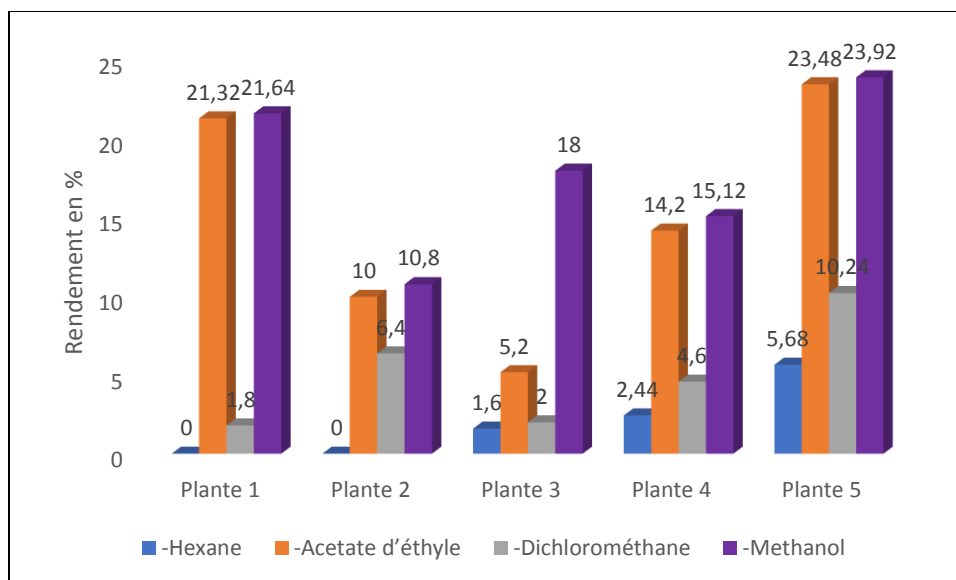


Figure 33: Rendements de l'extraction par sonication pour les cinq plantes

➤ **Résultats :**

Nous constatons que les rendements de l'extraction par sonication pour les cinq plantes varient d'une espèce à l'autre :

D. gnidium : le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'acétate d'éthyle (21,32%) et le méthanol (21,64 %), tandis que le plus faible est celui du dichlorométhane (1,8 %).

O. elongatum : le rendement le plus élevé a été obtenu avec le méthanol (10,8 %) et l'acétate d'éthyle (10 %) tandis que le plus faible est celui de l'hexane (3,2 %).

C. salviifolius : le rendement le plus élevé est obtenu avec l'extrait du méthanol (18 %), suivi par le l'acétate d'éthyle (5,2 %), dichlorométhane (2%) puis l'hexane (1,6%).

T. willdenowii : le rendement le plus élevé est obtenu avec l'extrait du méthanol (15,12%) suivi par le l'acétate d'éthyle (14,20 %), dichlorométhane (4,60%) puis l'hexane (2,44%).

C. laurifolius : le rendement le plus élevé est obtenu avec l'extrait du méthanol (23,92 %), suivi par le l'acétate d'éthyle (23,48%), dichlorométhane (10,24%) puis l'hexane (5,68%).

Pour toutes les plantes, le meilleur rendement a été obtenu dans le méthanol, sauf *D. gnidium* pour laquelle l'acétate d'éthyle a donné l'extraction maximale. Ce résultat est en concordance avec l'étude réalisée par Mahmoudi et son équipe [147] : le méthanol est très recommandé et fréquemment utilisé pour l'extraction des composés phénoliques. En conséquence, la variation des rendements des extraits des plantes peut s'expliquer par la différence de polarité des substances antioxydantes. Le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des polyphénols et l'interaction de ces composés avec d'autres constituants, sont des facteurs influençant la solubilité des composés phénoliques par la formation des complexes insolubles [148].

3. Etude phytochimique

1.1 Phytochimie qualitative

La phytochimie qualitative est basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques, réalisé sur chaque extrait, génère pour une première estimation des données préliminaires sur leurs constituants. Le résultat de notre criblage phytochimique, effectué sur les cinq plantes, est résumé dans le tableau suivant.

Tableau 18 : : Résultats de révélation phytochimique qualitative des plantes étudiées

Résultats	Flavonoïdes	Tanins
<i>D. Gnidium</i>	+	++
<i>O. Elongatum</i>	++	+++
<i>C. Salvifolius</i>	++	+++
<i>T. willdenowii</i>	+	++
<i>C. laurifolius</i>	+	++

(+) faible ; (++) moyen ; (+++) important

Cette étude révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolites secondaires pour chaque extrait. D'après les résultats notés dans le tableau ci-dessus, nous constatons

que les cinq plantes sont riches en flavonoïdes et en tanins et possèdent des teneurs élevées en tannins par rapport aux flavonoïdes. Les deux groupes de molécules sont des polyphénols qui sont des métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes [149]. Ceci peut être expliqué par une différence au niveau de plusieurs paramètres soient géographiques, physicochimiques ou biologiques tels que : la différence du site de récolte y compris l'environnement de la plante, la lumière, les précipitations, la topographie, la saison, type de sols, période de récolte, le patrimoine génétique, la procédure d'extraction utilisée, la partie de la plante étudiée ou leurs produits phytochimiques [150-152].

1.2 Analyse quantitative des polyphénols et flavonoïdes

Les propriétés biologiques (en particulier l'activité antioxydante) de la plupart des extraits des plantes médicinales ont été attribuées à leurs teneurs en composés phénoliques. Pour cette raison, on a choisi dans le présent travail d'extraire au préalable ces composants actifs à partir de la plante et de déterminer leurs teneurs. La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (figure 34). La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des polyphénols correspondantes à chaque extrait ont été exprimées en équivalent microgramme d'acide gallique (AG) par 100 milligrammes d'extrait et déterminées par l'équation suivante :

$$y = 0,0148 x + 0,0198 \text{ avec } R^2 = 0,9901$$

Où x : Teneur en polyphénols, y : Absorbance et R^2 : coefficient de détermination.

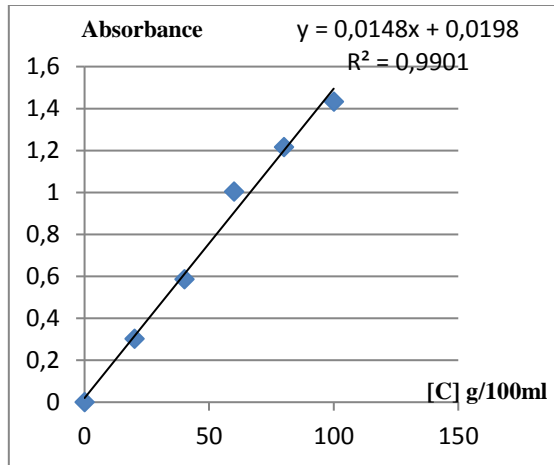


Figure 34 : Courbe d'étalonnage d'Acide galique

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon le protocole colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et l'étalon était la quercétine (figure 35). La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par 100 milligrammes de l'extrait ($\mu\text{g EQ}/100\text{mg}$ d'extrait). Les taux des flavonoïdes des extraits ont été obtenus à partir de la courbe d'étalonnage qui suit l'équation :

$$y = 0,0345 x + 0,0108 \text{ avec } R^2 = 0,9983.$$

Où x : Teneur en flavonoïdes, y : Absorbance et R^2 : coefficient de corrélation.

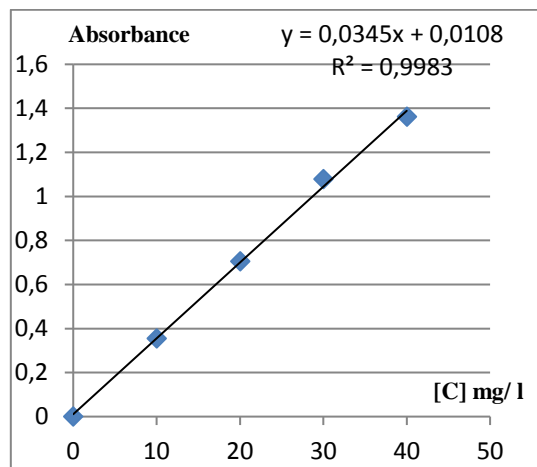


Figure 35 : Courbe d'étalonnage du Quercétine

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (17), et les figures (36 et 37) :

❖ *Daphne gnidium*

Tableau 19: Quantité des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits de *D. gnidium* pour les deux méthodes d'extraction

Méthode d'extraction	Extrait	Phénols totaux µgEAG/100mg d'extrait	Flavonoïdes totaux µg EQ/100mg d'extrait
Soxhlet	Acétate d'éthyle	87,11 ± 0,01	4,72 ± 0,02
	Méthanol	68,53 ± 0,04	4,14 ± 0,06
Sonication	Acétate d'éthyle	70,12 ± 0,02	4,69 ± 0,08
	Méthanol	67,57 ± 0,01	3,63 ± 0,09

Les valeurs sont la moyenne de trois mesures ± Ecart type.

µg EAG/100mg : microgramme d'équivalents de l'acide gallique par 100 milligrammes d'extrait.
µg EQ/100mg : microgramme d'équivalents de quercétine par 100 milligramme d'extrait.

Selon les résultats mentionnés dans le (tableau 19), les teneurs en phénols totaux des extrais méthanoliques de *D.gnidium* pour l'extraction par Soxhlet ($68,53 \pm 0,04$ µg EAG/100mg d'extrait) et l'extraction par sonication ($67,57 \pm 0,01$ µg EAG/100mg d'extrait), sont relativement faibles en comparaison avec les extraits d'acétate d'éthyle par Soxhlet ($87,11 \pm 0,01$ µg EAG/100mg d'extrait) et par sonication ($70,12 \pm 0,02$ µg EAG/100mg d'extrait). D'une part il parait clairement que les extraits de *D. gnidium* sont riches en polyphénols et d'autre part l'extrait d'acétate d'éthyle contient plus de polyphénols totaux que l'extrait méthanolique pour les deux méthodes d'extraction.

La teneur en polyphénols de l'extrait de *D. gnidium* obtenue par *D. amini* et *col* (2015) [153], est ($10,52 \pm 0,87$ mg EAG/g d'extrait). Cette valeur n'est pas cohérente avec nos résultats qui montrent que ces mêmes extraits dans l'espèce de *gnidium* sont pauvres en polyphénols. Ceci est vraisemblablement du aux différences environnementales (à savoir le climat, origine géographique, la température, la fertilité, les maladies et l'exposition aux parasites) et la période de récolte des échantillons.

Les quantités de flavonoïdes dans les extraits méthanoliques de *D.gnidium* par Soxhlet ($4,14 \pm 0,06 \mu\text{g EQ}/100\text{mg}$ d'extrait) et par sonication ($3,63 \pm 0,09 \mu\text{g EQ}/100\text{mg}$ d'extrait), et les extraits d'acétate d'éthyle de la même espèce par Soxhle ($4,72 \pm 0,02 \mu\text{g EQ}/100\text{mg}$ d'extrait) et par sonication ($4,69 \pm 0,08 \mu\text{g EQ}/100\text{mg}$), sont relativement faibles. Tandis que l'extraction par macération d'extrait brute de *D. gnidium*, *Bouyahya et al (2016)* [154], ont relevé des teneurs en flavonoïdes de valeur de ($17,68 \pm 1,23 \text{ mg EQ}/\text{g}$ d'extrait), en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

Toutefois il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie en raison de l'influence de divers facteurs tel que : l'origine géographique de là de l'échantillon, le procédé et le solvant d'extraction, le mode séchage et les conditions de stockage qui réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les études [155].

❖ **Les plantes : *O. elongatum*, *C. salviifolius*, *T. willdenowii* et *C. laurifolius*.**

➤ **Polyphénols totaux**

Les extraits méthanoliques et dans l'acétate d'éthyle de chacune des quatre plantes : *O. elongatum*, *C. salviifolius*, *T. willdenowii* et *C. laurifolius* ont été dosés afin de terminer leurs tenenrs en polyphénols totaux. Les feuilles des espèces étudiées sont riches en composés phénoliques.

Nous avons choisi le méthanol et l'acétate d'éthyle comme solvants d'extraction pour déterminer celui qui permet d'extraire la quasi-totalité des composés phénoliques totaux.

Les quantités des polyphénols dans les extraits des plantes obtenus sont présentées dans la (figure 36).

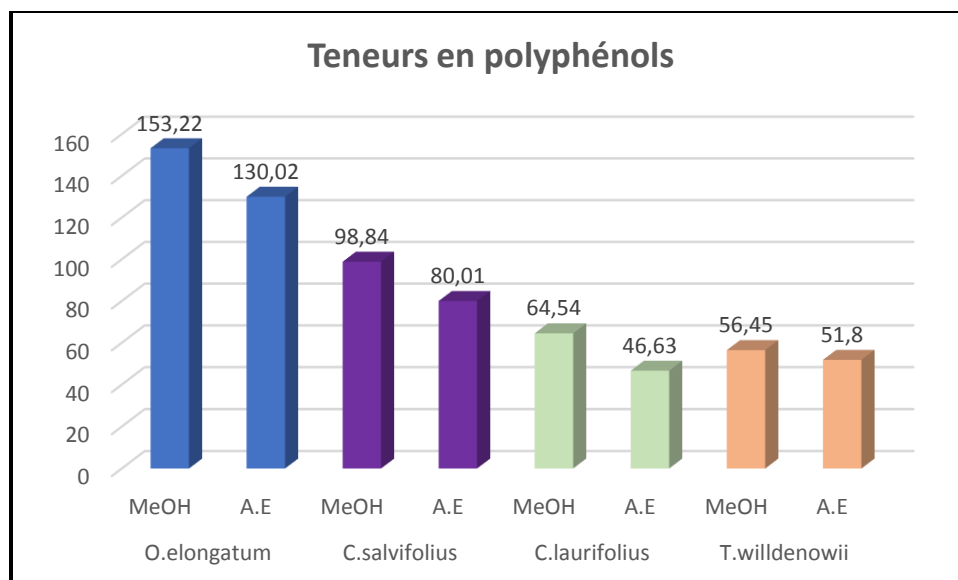


Figure 36 : Teneurs en polyphénols des extraits *O. elongatum*, *C. salvifolius*, *T. willdenowii* et *C. laurifolius*

Les résultats obtenus pour l'extraction par sonication des quatre plantes, présentent une teneur variable en polyphénols. Parmi les quatre espèces étudiées, les extraits méthanolique et acétate d'éthyle d'*O. elongatum* possèdent la meilleure teneur, respectivement ($153,22 \pm 0,04 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait) et ($130,01 \pm 0,02 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait). Tandis que l'extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle de *Thymus willdenowii* donnent respectivement les teneurs suivantes : ($56,45 \pm 0,33 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait) et ($51,80 \pm 0,38 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait).

Des travaux sur une autre espèce d'*Origanum* ont donné des valeurs différentes de nos résultats : la teneur en polyphénols des extraits méthanolique de la partie aérienne d'*Origanum vulgare*, respectivement, de la région d'Espagne est ($175\text{mg EAG}/\text{g}$ d'extrait) [156], de la région de Slovénie est de ($186\text{mg EAG}/\text{g}$ d'extrait) [157], et de la région de Pologne ($22,21\text{mg EAG}/\text{g}$ d'extrait) [158]. Les différences observées peuvent être liées aux différences environnementales (à savoir le climat, origine géographique, la température, la fertilité, les maladies et l'exposition aux parasites) et la période de récolte des échantillons. Ces paramètres sont strictement liés à la biosynthèse des métabolites secondaires et en particulier les composés phénoliques, sachant bien que les espèces sont différentes.

De même, pour *C. salvifolius* les extraits méthanoliques et acétate d'éthyle sont plus riches en polyphénols ($98,84 \pm 0,02 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait) et ($80,01 \pm 0,01 \mu\text{g}$

EAG/100mg d'extrait), respectivement. Cette teneur est largement supérieure à celle de *C. laurifolius*, qui ont des teneurs en composés phénoliques ($64,54 \pm 1,23 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait) et ($46,63 \pm 0,73 \mu\text{g EAG}/100\text{mg}$ d'extrait), respectivement pour des fractions méthanolique et acétate d'éthyle. On remarque bien que les quantités de polyphénols varient d'une espèce à une autre même s'il s'agit de la même région et du même genre de plantes. Ces différences résultent vraisemblablement des différences génotypiques (*C. salvifolius* et *C. laurifolius*).

➤ Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques répartis dans différentes classes, dont certains sont solubles dans les solvants polaires tandis que d'autres sont solubles dans les solvants apolaires [159]. Les teneurs en flavonoïdes des quatre plantes étudiées sont présentées dans la figure ci-dessous.

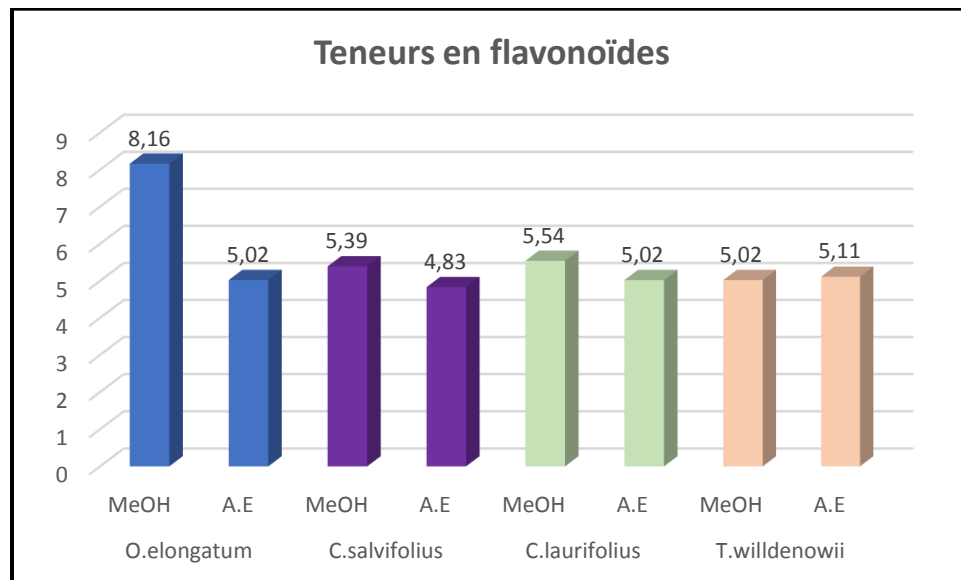


Figure 37 : Teneurs en flavonoïdes des extraits *O. elongatum*, *C. salviifolius*, *T. willdenowii* *C. laurifolius*

Les résultats des dosages représentés dans la figure ci-dessus montrent la présence des flavonoïdes, dans les quatre plantes avec des teneurs faibles et légèrement différentes en fonction des solvants utilisés. On note que la teneur en flavonoïdes totaux est de ($8,16 \pm 0,01 \mu\text{g EQ}/100\text{mg}$ d'extrait) d'extrait méthanolique d'*O. elongatum* est légèrement supérieure à celle de la fraction d'acétate d'éthyle qui est de ($5,02 \pm 0,08 \mu\text{g EQ}/100\text{mg}$

d'extrait) et pour le *T. willdenowii*, l'extrait de A.E ($5,11 \pm 0,15$ mg EQ/100mg d'extrait) et l'extrait MeOH ($5,02 \pm 0,08$ mg EQ/10mg d'extrait). Les différences trouvées avec les teneurs en flavonoïdes en fonction des solvants, sont probablement dues à la polarité de ces derniers et leurs capacités à extraire différents types de flavonoïdes. Des études effectuées sur une espèce de la même famille que l'*Origanum*, ont révélé une teneur en flavonoïdes de ($32.70 \pm 0,3$ mg EQ /g d'extrait) [160].

Les résultats de teneur en flavonoïdes des extraits méthanolique et acétate déthyle de *C.salviifolius* et *C. laurifolius*, sont presque des mêmes valeurs ($5,39 \pm 0,02$ µg EQ/100mg) et ($4,83 \pm 0,01$ µg EQ/100mg d'extrait) ; ($5,54 \pm 1,2$ mg EQ/100mg d'extrait) et ($5,02 \pm 0,26$ mg EQ/100mg d'extrait) respectivement. Ces valeurs faibles pourraient être liées aux conditions climatiques dures des endroits où elles poussent (température, sécheresse et salinité) qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols [161].

Conclusion

Notre étude a été consacrée au criblage phytochimique afin de détecter les classes de composés existants dans les feuilles des plantes étudiées. Les résultats obtenus ont montré que le rendement de l'extraction varie en fonction de la méthode (Soxhlet et sonication) et des solvants (polarité) d'extraction utilisé.

Les résultats d'analyse quantitative de cinq plantes renfermeraient une forte teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux, la plus forte teneur a été révélée par l'extrait acétate d'éthyle pour les composés phénoliques. Alors que l'extrait méthanolique a révélé une plus forte teneur pour les flavonoïdes.

Les résultats d'analyse qualitative ont permis d'évaluer la richesse de notre extrait en polyphénols représentés majoritairement par les flavonoïdes et une faible fraction de tanins et des mucilages, elles affichent donc la forte présomption que ces plantes peuvent servir de sources d'antioxydants naturels.

Chapitre III : Activités biologiques (Antioxydante et vasodilatatrice)

Introduction

Historiquement, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par *Szent Gyorgyi* (*Prix Nobel., 1937*). De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où ils sont connus principalement par leur activité antioxydante [162] et hypotenseur [163].

Selon l'Organisation Mondiale de la santé (*OMS*), Les maladies cardiovasculaires sont considérées comme la principale cause de mortalité dans le monde. Aujourd'hui, l'hypertension artérielle est devenue un facteur de risque cardiovasculaire majeur, qui se caractérise par une augmentation de la pression artérielle, liée à l'effort cardiaque pour propulser le sang et la résistance vasculaire [164].

L'endothélium la couche la plus interne (en contact avec le sang) des vaisseaux, joue un rôle très important dans la régulation de la vasomotricité. Cette régulation s'effectue par la production de facteurs vasoconstricteurs et/ou vasodilatateurs biologiquement actifs dans le but d'augmenter ou de diminuer la résistance vasculaire [165].

A travers notre étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode est insuffisante pour des propensions antioxydantes. Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante de nos extraits a été réalisée par trois techniques chimiques à savoir : le piégeage du radical libre (*DPPH°*), capacité antioxydante totale (*CAT*) et le test de blanchiment de β -carotène, afin de pouvoir donner une prévision complète de l'efficacité antioxydante. Cette étude consiste, aussi, à étudier l'activité vasodilatatrice des cinq espèces étudiées afin de démontrer la relation entre les deux activités antioxydante et vasodilatatrice qui a été confirmé par (*Bruns et al,2000*) [166].

I. Test de l'activité antioxydante

1. Piégeage du radical libre *DPPH*

1.1 Matériel et Méthodes

❖ *Principe*

Le *DPPH* (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), est un radical organique stable réagit avec le polyphénol par transfert d'électrons et d'atome d'hydrogène, présentant en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le (*DPPH*) est réduit par un capteur de radicaux libres en (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazine) de couleur jaune [167].

❖ *Mode opératoire*

Parmi les protocoles adaptés pour le piégeage du radical libre(*DPPH*), il y a celui décrit par (*Mighri et al, 2009*) [168]. On introduit 2.5 ml de chaque extrait (0,2 mg/ml) dans des tubes et 2.5ml de la solution méthanolique du (*DPPH*) (0,04 mg/ml). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre 6800 UV /JENWAY.

Différentes concentrations ont été testées allant de 0,2 mg/ml à 6,25 µg/ml) afin de déterminer la concentration qui réduit 50% du (*DPPH*) (IC_{50}). Les essais ont été effectués trois fois pour chacune des concentrations.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le (*BHT*) qui est préparé de la même manière et pris comme antioxydant standard.

L'activité antiradicalaire de nos échantillons est évaluée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance de contrôle

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon

❖ *Calcul des IC_{50}* :

La valeur (IC_{50}) est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

❖ Analyse statistique

Les résultats expérimentaux ont été exprimés comme moyenne \pm l'écart type. Les valeurs d' IC_{50} sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage. L'analyse statistique des résultats obtenus est effectuée par l'application « Analysis of Variance » ANOVA afin de comparer significativement les données à une probabilité de $p < 0,05$.

1.2 Résultats et discussion

Le radical ($DPPH^\circ$) est largement utilisé comme un système modèle pour déterminer l'effet antiradicalaire de plusieurs produits naturels tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les différents extraits de plantes.

❖ *Daphne gnidium*

L'activité antiradicalaire des différents extraits de *D. gnidium*, ainsi que le standard (*BHT*) à différentes concentrations allant de (200 $\mu\text{g/ml}$ à 6,25 $\mu\text{g/ml}$), sont mesurées en suivant l'apparition de la couleur jaune de (*DPPH*) réduit à 517 nm. Les résultats sont représentés dans la figure suivante.

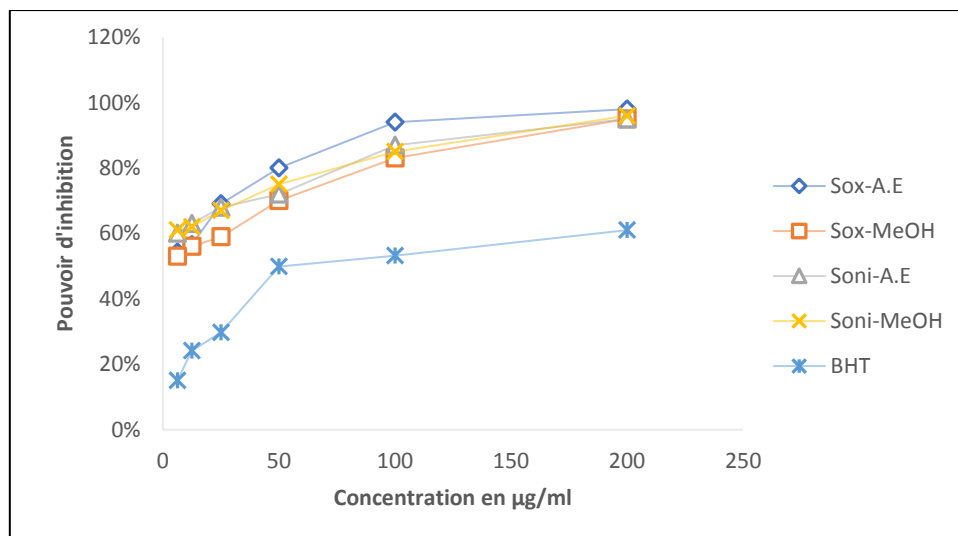


Figure 38 : Pouvoir antioxydant des extraits de *D. gnidium*, (n=3).

Les résultats montrent que tous les extraits présentent une activité antiradicalaire et que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration. On constate que les extraits de *D.gnidium*, par sonication présentent un meilleur pouvoir réducteur que les extraits par soxhlet et que tous les échantillons sont plus actifs que le standard (BHT).

L'activité antiradicalaire de différents extraits de *D. gnidium* est probablement due à la présence de multiples composés phénoliques ; qui sont généralement parmi les principaux constituants des plantes agissant en tant qu'antioxydants primaires ou des piègeurs de radicaux libres [169].

❖ IC₅₀ des extraits de *D. gnidium*

Nous basant sur les résultats des tests précédents, nous avons déterminé la concentration de chaque échantillon, qui a réduit de moitié la concentration du (*DPPH*[•]).

L'IC₅₀ étant inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, plus la valeur de l'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Les IC₅₀ des différents extraits testés sont présentées dans la figure suivante.

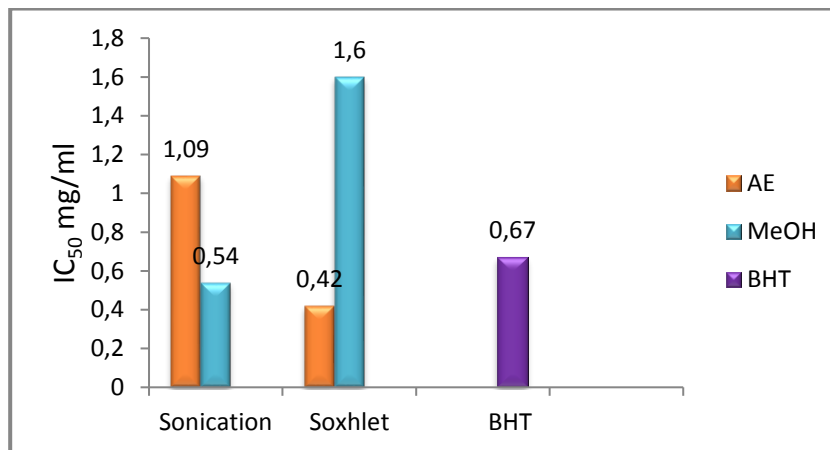


Figure 39 : IC₅₀ des extraits de *D. gnidium* par sonication et par Soxhlet, (n=3).

Parmi les quatre extraits testés, l'extraction par Soxhlet avec (A.E) a donné l'échantillon le plus actif des extraits de *D. gnidium* avec une valeur de IC₅₀ de (0,42 ± 0,01 mg/ml) et l'extrait méthanolique par sonication d'une valeur de IC₅₀ de l'ordre de (0,54 ±

0,04 mg/ml) qui sont plus actives que l'extrait de référence (*BHT*) de valeur IC_{50} de $(0,68 \pm 0,06 \text{ mg/ml})$.

Le classement des échantillons testés et le standard (*BHT*) selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant est comme suit :

$$Ex AE_{Soxhlet} > Ex MeOH_{sonication} > BHT > Ex AE_{sonication} > Ex MeOH_{Soxhlet}$$

On remarque aussi que les résultats changent en changeant la technique d'extraction.

❖ **Les plantes : *O. elongatum*, *C. salviifolius*, *T. willdenowii* et *C. laurifolius*.**

Selon le même protocole que précédemment, l'activité antioxydante des extraits des quatre plantes a été évaluée en mesurant leur pouvoir réducteur du radical (*DPPH*). Les extraits ont été testés à des concentrations allant de 200 $\mu\text{g/ml}$ à 6,25 $\mu\text{g/ml}$. Nous avons utilisé le (*BHT*) comme référence. Les pourcentages d'inhibition sont donnés dans la (figure 40).

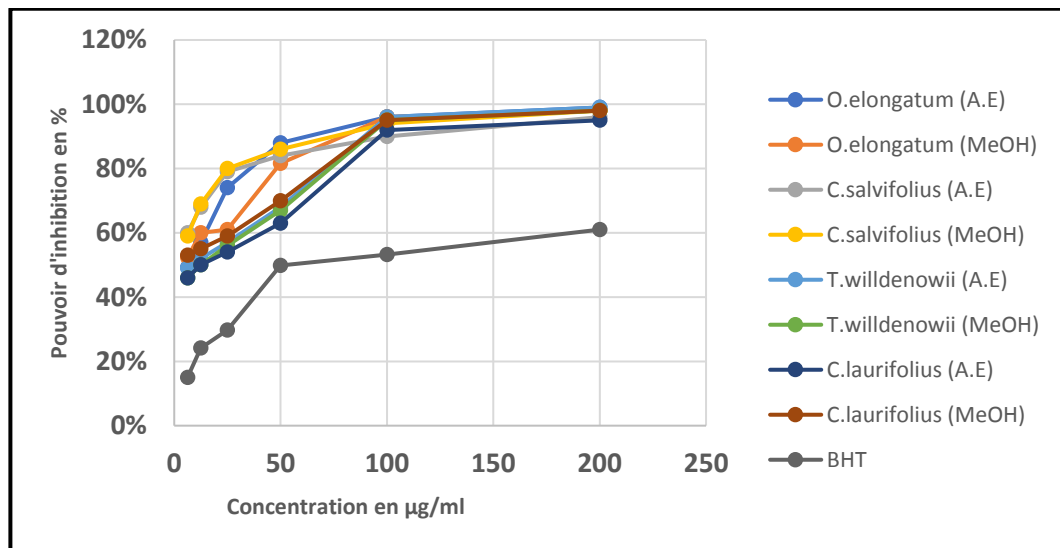


Figure 40: Pouvoir d'inhibition antioxydant des extraits de quatre plantes

Les résultats montrent que les extraits des quatre plantes réduisent la concentration du (*DPPH*), que leur effet est plus marqué que celui du standard, et que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration. Pour l'*O. elongatum* et *C. salviifolius*, les extraits les plus actifs, présentent la teneur la plus élevée en polyphénols avec une teneur faible en flavonoides. Par contre, les extraits de *T. willdenowii* et *C. laurifolius* qui présentent des valeurs moyennes des teneurs en polyphénols, avaient

presque la même activité. Suite à ces résultats, l'activité des extraits serait liée à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes. *Popovici* et son équipe ont pu démontrer que le pouvoir réducteur des extraits est attribué aussi à la nature des flavonoïdes qu'ils contiennent (*Popovici et al, 2009*). Ils ont rapporté également que la structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres [170].

Tableau 20 : IC₅₀ des extraits obtenus par sonication des plantes.

Plante	IC ₅₀ (mg/ml)	
	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait méthanolique
<i>O.elongatum</i>	0,32 mg/ml ± 0,09	0,27 mg/ml ± 0,06
<i>C. Salviifolius</i>	0,52 mg/ml ± 0,01	0,49 mg/ml ± 0,04
<i>T. willdenowii</i> Boiss	1,18 mg/ml ± 0,04	0,32 mg/ml ± 0,02
<i>C. laurifolius</i>	1,26 mg/ml ± 0,04	1,67 mg/ml ± 0,03

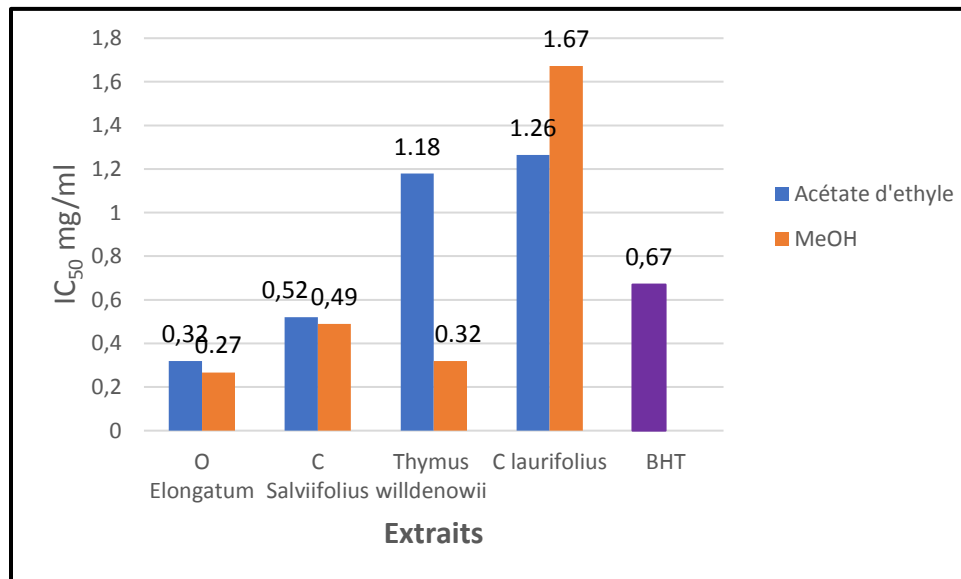


Figure 41 : IC₅₀ des plantes des quatre plantes

D'après ces résultats, les IC_{50} des extraits des plantes (de $0,27 \pm 0,06$ mg/ml) à ($0,52 \pm 0,01$ mg/ml) sont inférieures à celle de la référence ($0,68 \pm 0,06$ mg/ml). Par ailleurs les extraits méthanoliques de *O.elongatum* et de *C. Salviifolius* par sonication, sont plus actifs que ceux dans l'acétate d'éthyle. Ce résultat est cohérent avec les travaux de (Sun et al, 2007) [171], le méthanol reste le meilleur solvant pour extraire les antioxydants d'une plante. Par contre, *C. laurifolius* est moins active que le BHT pour les extraits de méthanol et d'acétate d'éthyle alors que seul l'extrait dans d'acétate d'éthyle de *T. willdenowii* est moins actif que le BHT, tandis que celui dans le méthanol est actif.

Au sein des extraits et le standard (*BHT*) on peut les classer selon l'ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit :

$$Ex_{(O.elongatum)} > Ex_{(C.salviifolius)} > BHT > Ex_{(T.willdenowii)} > Ex_{(C.laurifolius)}$$

Quel que soit le solvant d'extraction (méthanol ou acétate d'éthyle) des quatre plantes extraites par sonication, on conclut que, l'activité antiradicalaire par le test *DPPH* des extraits d'*O. elongatum* et *C. salviifolius*, restent toujours plus actives que les autres plantes. Ce résultat est en parfaite cohérence avec celui de l'étude phytochimique. En effet, *O. elongatum* et *C. salviifolius* sont plus riche en polyphénols et en flavonoïdes, pourraient être considérées comme des sources d'antioxydants naturels.

2. Capacité antioxydante totale (*CAT*)

2.1 Matériel et Méthodes

❖ Principe

La capacité antioxydante totale (*CAT*) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de (Prieto et al, 1999) [172]. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo(VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène *Mo(V)* MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ *Mo(V)* à *pH* acide.

❖ Mode opératoire

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait méthanolique est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM

molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm. Les expériences sont répétées en 3 fois.

2.2 Résultats et Discussion

Les résultats obtenus pour la capacité antioxydante de ces plantes sont présentées dans la figure ci-dessous ;

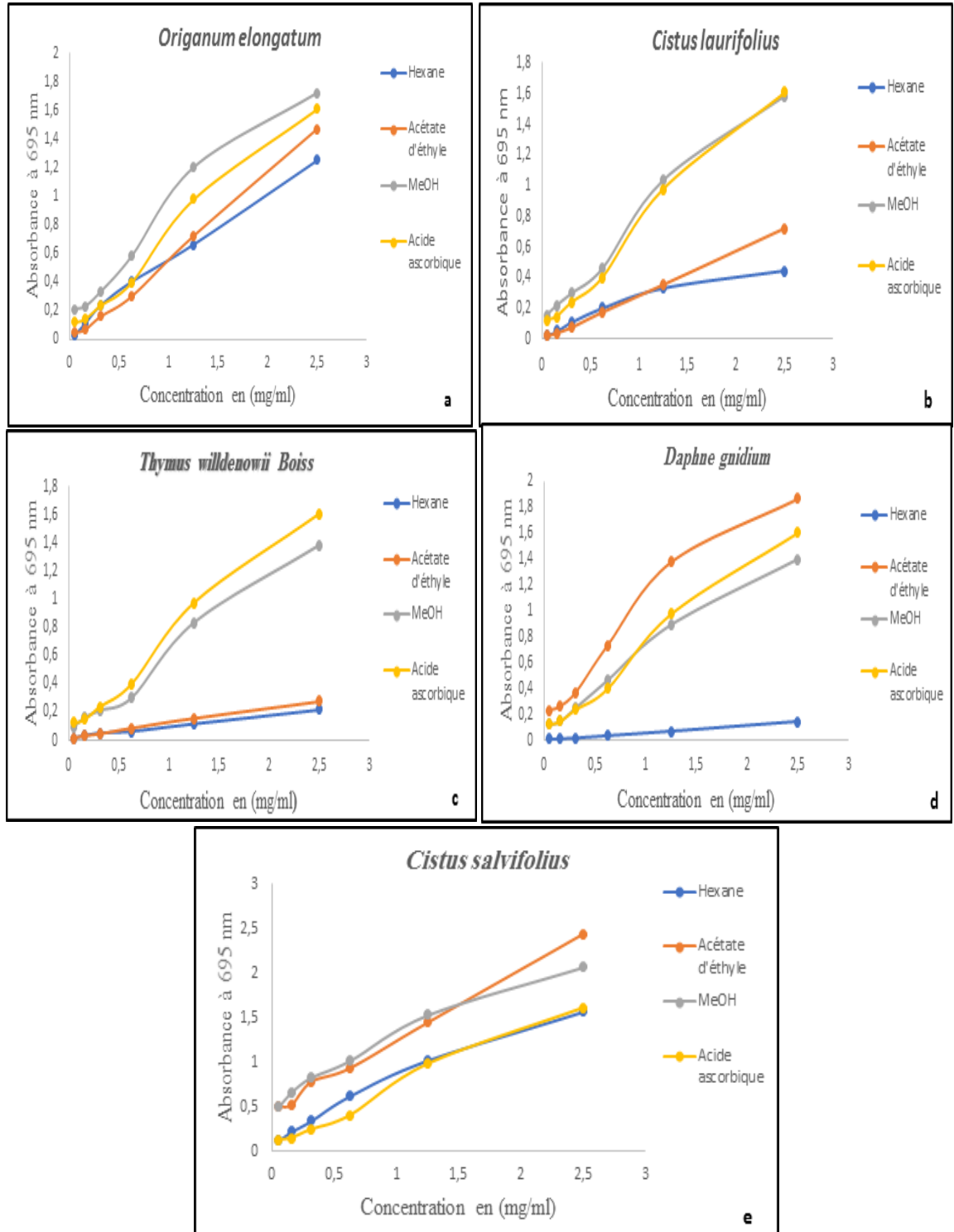


Figure 42 : Capacité antioxydante totale des différents extraits : a) *O. elongatum*. b) *C. laurifolius*. c) *T. wilddenowii*. d) *D. gnidium*. e) *C. salvifolius* à différentes concentrations ($p < 0.05$; $n = 3$)

Cette figure montre que tous les extraits présentent des activités antioxydantes importantes avec des différences significatives ($p < 0.05$). Elles sont proportionnelles aux absorbances qui augmentent en fonction de la concentration.

L'extrait d'acétate d'éthyle pour *Cistus salvifolius* et *Daphne gnidium* possède une meilleure capacité antioxydante ce qui est traduit par ses absorbances maximales, respectivement ($2,439 \pm 0,002$) et ($1,869 \pm 0,001$), obtenue pour une concentration de 2,5mg/ml.

Ainsi, pour une même concentration, l'extrait méthanolique pour *Cistus salvifolius* et *Origanum elongatum* présente des absorbances maximales ($2,072 \pm 0,007$) et ($1,720 \pm 0,001$), ce qui signifie une meilleure capacité antioxydante. En comparant ces résultats avec ceux de l'acide ascorbique, il est à suggérer que les extraits méthanoliques de *O. elongatum* et acétate d'éthyle de *C. salvifolius* ont une capacité antioxydante plus importante que le standard qui a révélé une activité antioxydante de 2,5mg/ml traduite par une absorbance de ($1,608 \pm 0,593$). Toutefois, les extraits hexaniques montrent des activités réductrices moins importantes traduites par leurs absorbances maximales inférieures aux autres extraits à la même concentration. Ceci suggère que l'extraction par le méthanol et l'acétate d'éthyle sont favorables pour avoir la capacité antioxydante totale. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, les extraits méthanolique et d'acétate d'éthyle, présentant une capacité antioxydante importante, renferment des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort que l'hexane [173,174].

3. Test de blanchissement de β -carotène

3.1 Matériel et Méthodes

❖ Principe

L'acide linoléique qui est dans un système d'émulsion aqueuse génère des radicaux peroxydes qui par la suite oxydent le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. La présence des antioxydants réduit l'intensité de la destruction du β -carotène en neutralisant les radicaux libres dérivés et permet donc de prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène [175].

❖ Mode opératoire

Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissoute dans 10 ml de chloroforme. 1 ml de cette solution est additionné à 200 mg de tween 20 et 20 μ l d'acide ascorbique. Le chloroforme est éliminé ensuite par évaporation et 100 ml de l'eau oxygénée diluée sont ajoutés et le mélange résultant est agité vigoureusement. Un volume 0,1 ml de chaque extrait et de l'antioxydant de synthèse (*BHT*) (à différentes concentrations) est ajouté à un volume de 2 ml de l'émulsion du β -carotène/acide linoléique. L'absorbance des extraits est mesurée à 470 nm après une incubation à 50°C pendant 120 min. Le témoin est préparé de la même manière sauf que l'extrait est remplacé par le solvant d'extraction.

L'activité antioxydante (%) en termes de blanchissement de β -carotène des extraits a été évaluée en utilisant la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition (%)

$$= [(A_{E(120)} - A_{T(120)}) / (A_{T(0)} - A_{T(120)})] \times 100$$

$A_{E(120)}$: Absorbance de l'échantillon à 120 min.

$A_{T(120)}$: Absorbance de témoin à 120 min.

$A_{T(0)}$: Absorbance de témoin à 0 min

3.2 Résultats et discussion

Les résultats d'inhibition de décoloration de la solution de β -carotène des extraits méthanoliques des plantes sont représentés dans la figure suivante.

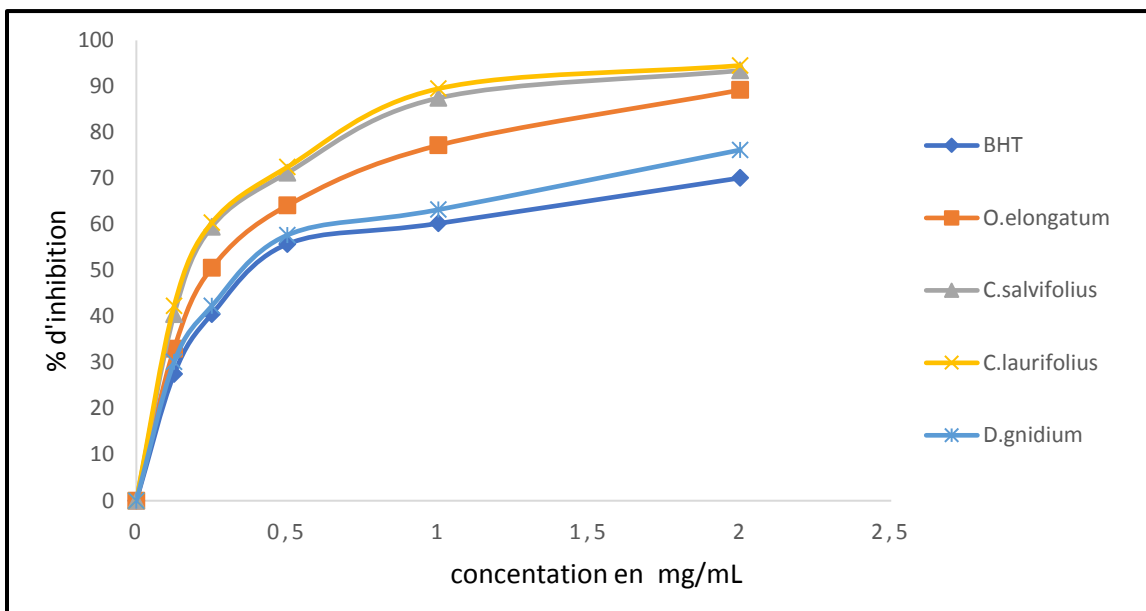


Figure 43 : Pourcentages d'inhibition des différents extraits méthanolique d'*O. elongatum*, *C. salvifolius*, *C. laurifolius*, *D. gnidium* et de la (BHT) à différentes concentrations pour le test de blanchissement de β -carotène

La figure ci-dessus indique que les extraits méthanoliques des plantes ainsi que le *BHT*, inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique β - carotène et que le pourcentage d'inhibition est proportionnel aux concentrations testées.

L'inhibition la plus élevée a été enregistrée par l'extrait de *C. laurifolius* ($94,45 \pm 2,54\%$) suivie, par l'extrait *C. salvifolius* ($93,45 \pm 1,3\%$), ensuite l'extrait *O. elongatum* ($89,21 \pm 1,71\%$) et l'extrait *D. gnidium* ($76,19 \pm 2,73\%$). Le standard (*BHT*) a révélé un pourcentage d'inhibition de ($76,2 \pm 3,2\%$) par rapport aux extraits de la plante étudiée à la même concentration qui est de 2mg/ml.

❖ Détermination des IC_{50}

Les valeurs d' IC_{50} de l'oxydation de l'acide linoléique couplée au β - carotène sont représentées dans l'histogramme suivant :

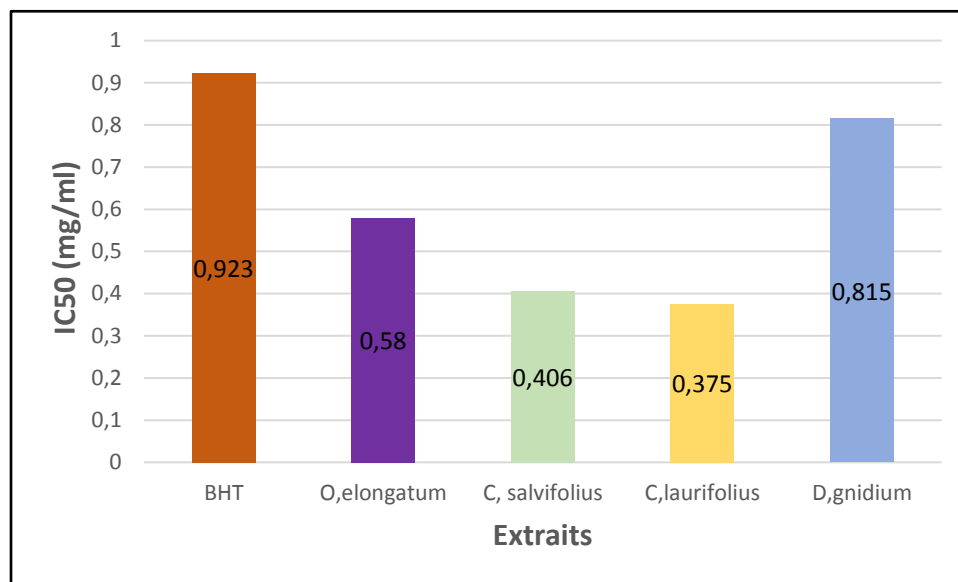


Figure 44 : Les valeurs d'IC₅₀ des différents extraits méthanoliques pour le test de blanchissement de β -carotène ($p < 0.05$) (n=3).

A partir des valeurs de IC₅₀ obtenues, il a été observé que l'extrait méthanolique *C. laurifolius*, montre une plus grande activité inhibitrice avec une IC₅₀ de (0,309 ± 0,009 mg/ml) par rapport au même extrait de *C. salviifolius* avec une IC₅₀ de (0,448 ± 0,020 mg/ml) et *O. elongatum* (0.580 ± 0.005mg/ml) suivi par l'extrait de *D. gnidium* qui représente l'extrait le moins actif (IC₅₀ = 0,815 ± 0,007mg/ml). Ces résultats restent toujours supérieurs au standard (*BHT*) qui présente une valeur de IC₅₀ plus élevée (IC₅₀ = 0,923 mg/ml).

On conclut que l'inhibition de la décoloration de β -carotène par les différents extraits des plantes étudiées sont, probablement, attribuées à la présence des composés phénoliques apolaires, permettant d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique couplée à la β - carotène. Le test de blanchissement du β -carotène étant similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau d'où les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes et ils se concentrent au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène [176].

❖ **Corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés Phénoliques d'*O. elongatum*.**

La corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques des extraits méthanoliques d'*O. elongatum* est représentée dans le tableau 21.

Tableau 21 : Matrice de corrélation entre les activités antioxydantes et les teneurs en polyphénols des extraits méthanoliques d'*O. elongatum*.

Variabiles	TP	TF	DPPH	CAT	β - carotène	IC ₅₀ DPPH	IC ₅₀ β - carotène
TP	1,000	0,973	0,967	0,959	0,985	0,983	0,962
TF		1	0,942	0,923	0,993	0,966	0,992
DPPH			1	0,933	0,932	0,911	0,952
CAT				1	0,933	0,931	0,886
β -carotène					1	0,989	0,978
IC ₅₀ DPPH						1	0,944
IC ₅₀ β - carotène							1

Les résultats obtenus ont révélé une corrélation entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes des extraits d'*O. elongatum*. De même, la corrélation observée entre les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes et certaines activités antioxydantes testées (DPPH, CAT et β -carotène) et les IC₅₀ est significative. L'analyse des résultats montre que ces activités pourraient être dues à la qualité des polyphénols. Nous constatons que l'activité antioxydante de β -carotène (0,993) est hautement corrélée à la teneur en flavonoïdes. Ces résultats indiquent donc que les flavonoïdes d'*O. elongatum* ont une activité anti radicalaire inhibant l'oxydation du β -carotène.

L'étude effectuée sur le pouvoir antioxydant de *O. elongatum*, suggère que les polyphénols et les flavonoïdes produits par ces plantes seraient responsables des trois activités antioxydantes étudiées à savoir : la capacité antioxydante totale, l'activité antiradicalaire du DPPH et le blanchissement du β -carotène. Ces constatations ont été déduites à partir des corrélations hautement révélées entre les variables quantifiant les trois activités, à savoir activité antioxydante totale, piégeage du DPPH et blanchiment β -carotène. Ceci confirme que les polyphénols et les flavonoïdes sont les antioxydants majoritairement responsables de l'activité antioxydante d'*O. elongatum*.

II. Activité vasodilatatrice

1. Matériel et Méthode

➤ Principe

L'évaluation de l'activité vasodilatatrice traduite par une chute de pression. Elle est basée sur la mesure des effets vasodilatateurs in vitro des extraits des cinq plantes, chaque échantillon a été déterminée en mesurant la pression de perfusion (PP) du lit mésentérique du rat. Elle est déterminée en calculant la différence entre la pression artérielle avant injection et la pression artérielle après injection du produit à tester. Cette différence est proportionnelle à l'activité vasodilatatrice (plus PP est grande plus le produit est actif).

1.1 Le lit vasculaire mésentérique isolé

Le lit vasculaire mésentérique (*LVM*) isolé s'est avéré être un tissu vasculaire utile pour des études de vasoréactivité puisqu'il contient une population représentative d'artères et d'artérioles et semble être un bon territoire de résistance très impliqué dans la régulation de la pression artérielle. Dans notre étude, nous avons choisi d'explorer l'effet vasodilatateur des cinq plantes « *D. gnidium*, *C. salviifolius*, *O. elongatum*, *T. willdenowii* Boiss et *C. laurifolius* » au niveau du (*LVM*).

Dans ce travail, la vasoréactivité du *LVM* du rat incubé en présence des extraits des cinq plantes avec un inhibiteur de synthèse des facteurs endothéliaux vasodilatateurs a été étudiée en réponse à un agent vasoconstricteur α mimétique : la phényléphrine (*PHE*).

1.2 Préparation du lit vasculaire mésentérique

Les rats ont été anesthésiés à l'uréthane (50 mg/Kg), la cavité abdominale est ensuite ouverte, l'artère mésentérique supérieure est repérée, une hémisection est effectuée à son origine avec l'aorte abdominale par laquelle on introduit une aiguille hypodermique.



Figure 45 : Photo du rat Wistar anesthésié est placé en décubitus b) Ouverture de la cavité abdominale et perfusion du (LVM) [177].

La perfusion est tout de suite démarrée afin d'éviter l'anoxie du lit mésentérique grâce à une pompe péristaltique (Pharmacia Bio Tech) à débit constant (2ml/min) [178, 179]. La solution de perfusion, le Krebs Heinsleit, est composée (en g/l) du : $NaCl$ 6,9; KCl 0,35; $CaCl_2$ 2; $MgSO_4$ 0,29; $NaHCO_2$ 2,1; KH_2PO_4 0,14; Glucose 0,27 et est ajustée à un pH de 7,4. Afin de maintenir ce pH et oxygéner la solution de perfusion, cette dernière est barbotée par du carbogène (95% $d'O_2$ et 5% de CO_2). La température est maintenue à 37 °C [177].

Une fois la perfusion démarrée, le (LVM) est isolé minutieusement avec des ciseaux fins aux bords des intestins et déposé sur une boîte de pétri. Le (LVM) est ensuite isolé puis les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale.



Figure 46 : Lit mésentérique mis en évidence par une perfusion colorée par du bleu de méthylène.

L'artère mésentérique supérieure se ramifie en un grand nombre de branches, qui se divisent également en plusieurs vaisseaux sanguins afin d'assurer l'irrigation des mésentères [177].

Les réponses vasculaires sont détectées par les changements de la pression de perfusion, qui a été mesurée en continu avec un capteur de pression (Capto 844) et enregistrée sur un oscillographe (Harvard apparatus limited). Les variations de perfusion en mmHg sont mesurées à l'aide d'un transducteur de pression (model TCB 100, Millar, Houston, TX).

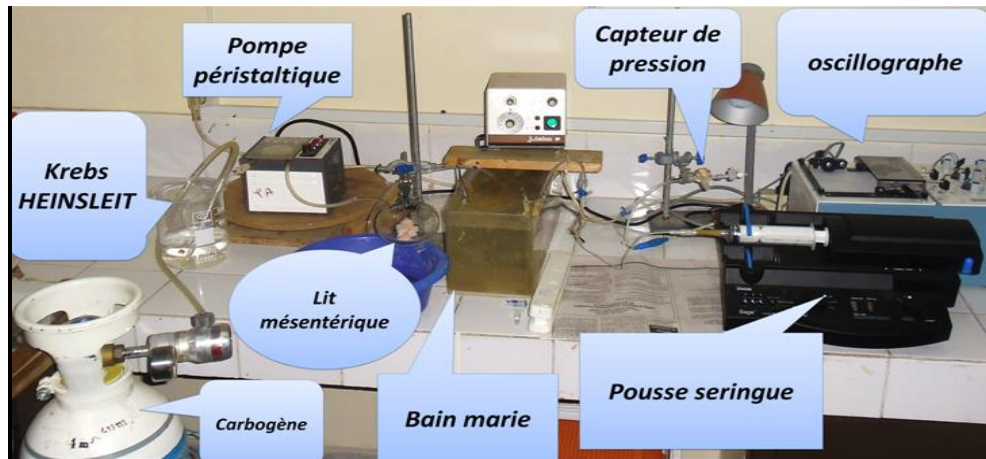


Figure 47 : Ensemble du montage utilisé lors de la perfusion du lit mésentérique

Après 30 min de stabilisation, le (LVM) reçoit des injections toutes les 5 minutes de la phényléphrine (50 nmole), un agoniste des récepteurs α_1 , jusqu'à ce que les réponses soient reproductibles. On pré-contracte, ensuite, en continue par la pousse seringue en mettant de la phényléphrine (la pression atteint 80mmHg à 100 mmHg). Nous faisons une pré contraction maximale en continue pour déterminer la réponse vasodilatatrice, ce qui nous permet de voir la chute de pression, puis on injecte l'acétylcholine qui est le vasodilatateur de référence. Après l'injection de l'acétylcholine on a une réponse vasodilatatrice traduite par une chute de pression. Des concentrations croissantes des extraits des cinq plantes sont ajoutées cumulativement au milieu de survie.

2. Résultats et Discussion

Dans cette étude nous avons démontré, les effets vasodilatateurs in vitro des extraits des cinq plantes, chaque échantillon a été déterminée en mesurant la pression de perfusion (PP) du lit mésentérique du rat. Elle est déterminée en calculant la différence entre la pression artérielle avant injection et la pression artérielle après injection du produit à tester. Cette différence est proportionnelle à l'activité vasodilatatrice (plus PP est grande plus le produit est actif). Les résultats des cinq plantes étudiées sont présentés dans les courbes suivantes :

2.1 *Daphne gnidium*

L'injection des extraits de *D.gnidium* aux différentes doses étudiées (de 30 à 300 µg/ml) n'entraîne aucun effet vasodilatateur comme le montre la figure suivante.

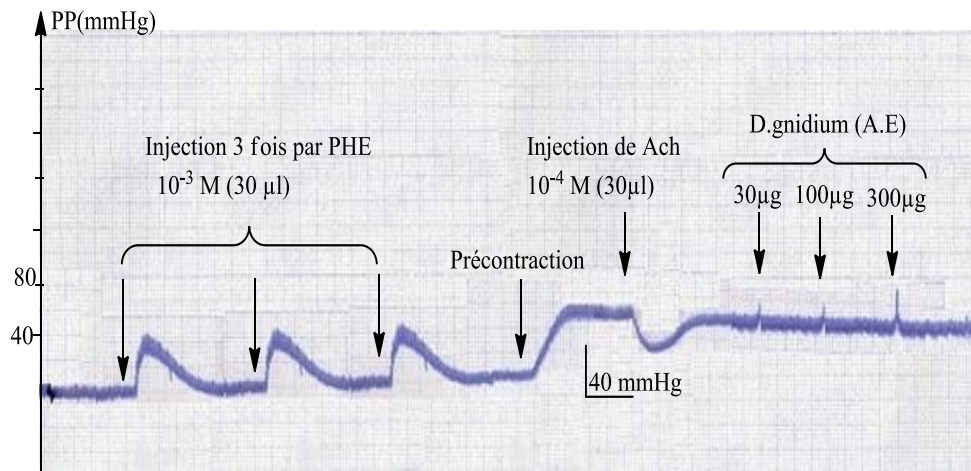


Figure 48 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle de *D. gnidium*.

2.2 *Origanum elongatum*

On remarque que l'extrait méthanolique d'*O. elongatum* a une activité vasodilatatrice (PP = 60 mmHg) plus élevée que celle de l'acétylcholine (PP = 40 mmHg) et qu'il induit aussi un prolongement de la réponse vasodilatatrice (figure 49).

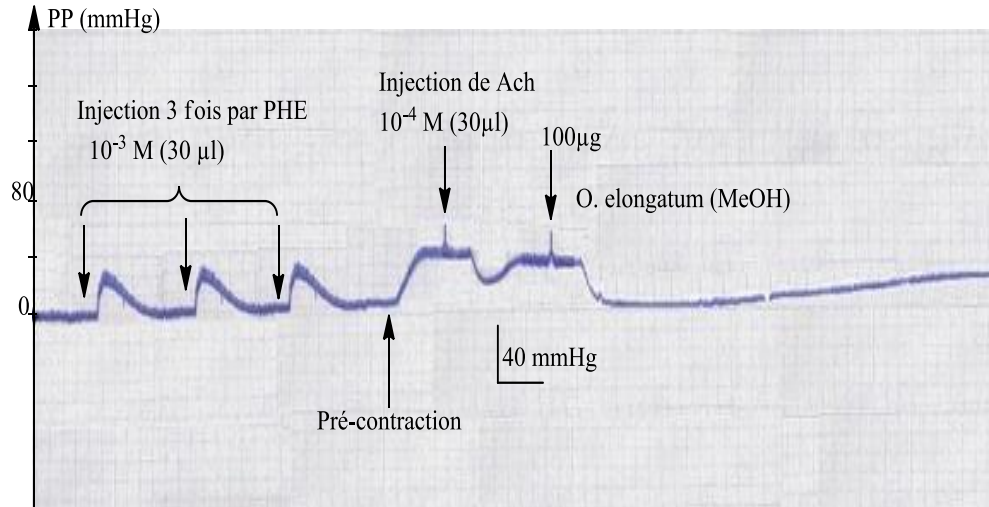


Figure 49 : Effet vasodilatateur de l'extrait méthanolique d'*O. elongatum*.

L'extrait dans l'acétate d'éthyle d'*O. elongatum* (PP=20 mmHg) s'est révélé moins actif que la référence (PP=40 mmHg). On remarque également un prolongement de la réponse vasodilatatrice après injection de cet extrait (figure 50).

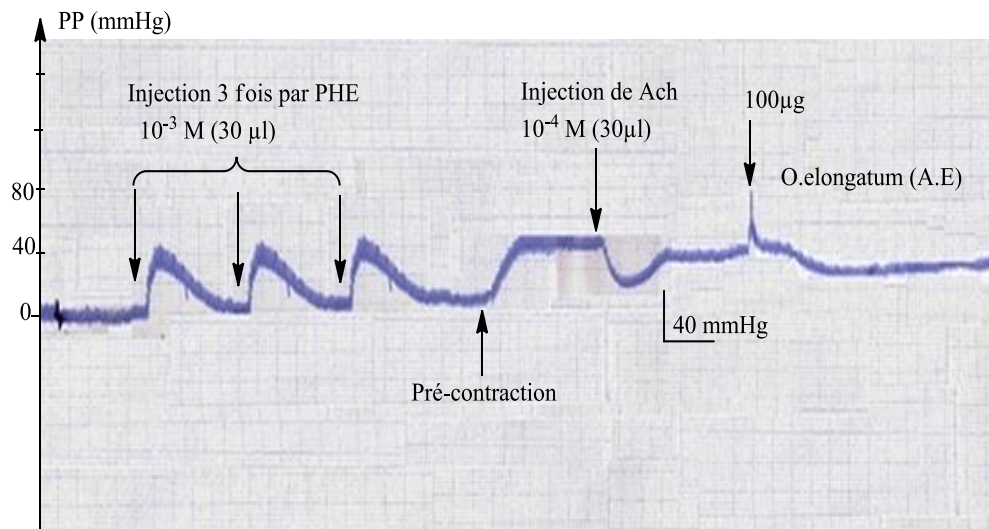


Figure 50 : Effet vasodilatateur de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*O. elongatum*.

On remarque que l'effet vasodilatateur de l'extrait méthanolique d'*O. elongatum* (PP = 50 mmHg) est plus marqué que celui dans l'acétate d'éthyle (PP=20 mmHg). Ce résultat est conforme au résultat de l'activité antioxydante que nous avons évaluée pour les mêmes extraits de *O. elongatum*.

2.3 *Cistus salviifolius*

L'injection de l'extrait dans le méthanol de *C.salviifolius* aux doses étudiées (30 à 300 µg/ml) a induit une activité vasodilatatrice proportionnelle à la dose injectée.

L'effet hypotenseur a été observé à partir de 100 µg/ml qui baissent la pression de 30 mmHg. A 300 µg/ml une réponse égale à l'activité de l'acétylcholine (PP=40 mmHg) a été obtenue. Les résultats sont indiqués dans la figure suivante.

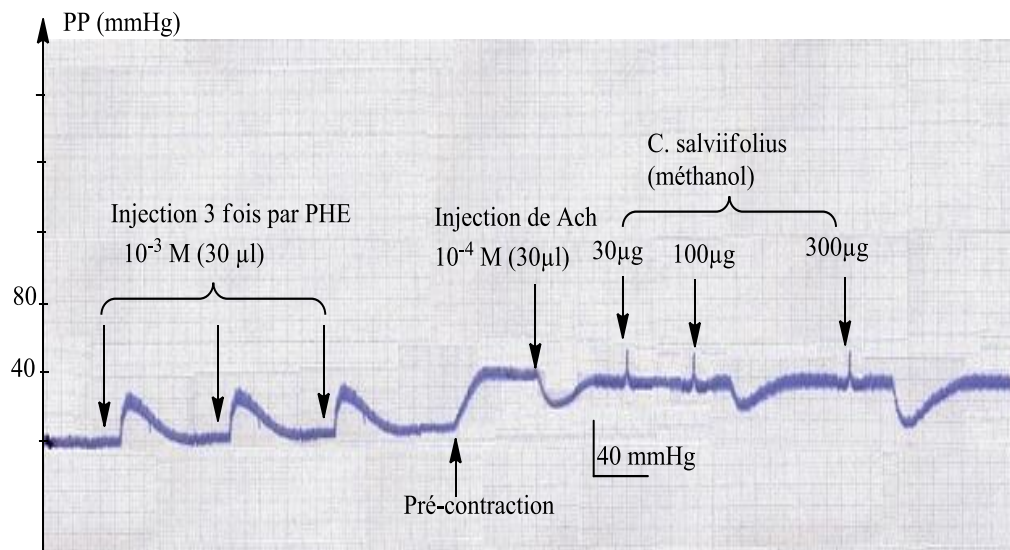


Figure 51 : Effet vasodilatateur de l'extrait de méthanol de *C. salviifolius*.

On peut conclure que l'activité vasodilatatrice retrouvée chez *C.salviifolius* serait due à leur pouvoir antioxydant

2.4 *Thymus wilddenowii* Boiss

L'injection des extraits (hexanique, acétate d'éthyle et le méthanol) de *T. wilddenowii* Boiss à différentes doses (de 100 à 200 µg/ml) n'entraînent aucune baisse de pression.

2.5 *Cistus laurifolius*

➤ L'extrait hexanique

L'injection des doses d'extrait hexanique a induit une chute dose-dépendante de la pression de perfusion, à partir de la concentration 30 µg/ml (baisse de 30 mmHg).

A la concentration de 100 µg/ml la pression baisse de 40 mmHg (même PP que l'acétylcholine), à 300 µg/ml elle baisse de 80 mmHg et enfin à 1 mg/ml une baisse de 120 mmHg de pression est observée.

L'extrait hexanique de *Cistus laurifolius* atteint le même effet hypotenseur que la référence à une concentration de 100 µg/ml puis cet effet augmente avec l'augmentation de la concentration.

➤ **L'extrait méthanolique**

L'injection des doses croissantes d'extrait méthanolique de *Cistus laurifolius* a induit une chute dose-dépendante de la pression de perfusion. A partir de 30 µg/ml on observe une baisse de pression de 20 mmHg et à 100 µg/ml une baisse de 40 mmHg.

L'activité vasodilatatrice d'extrait méthanolique de *Cistus laurifolius* à 100 µg/ml est la même que celle de l'acétylcholine 10^{-4} M (40 mmHg).

2.6 Effet vasodilatateur des extraits actifs

Presque tous les extraits des plantes testés ont provoqué une relaxation liée à la concentration des anneaux aortiques de rat contractés par la phényléphrine. Il est important de souligner que l'extrait méthanolique d'*O. elongatum* a présenté un effet vasodilatateur maximal supérieur à celui de l'acétylcholine.

Parmi les cinq plantes testées, trois ont montré une activité vasodilatatrice. Les extraits méthanolique de *O. elongatum*, *C. salvifolius* et *C. laurifolius* induisent une meilleure relaxation du lit vasculaire mésentérique pré-contracté avec du phényléphrine utilisés à des doses de 100 µg/ml. L'activité vasodilatatrice a été démontrée in vitro pour *O. elongatum* d'un effet hypotenseur meilleur que la référence, l'acétylcholine. Tandis que, *D. gnidium* et *T. willdenowii* n'ont eu aucun effet sur la pression du (LVM).

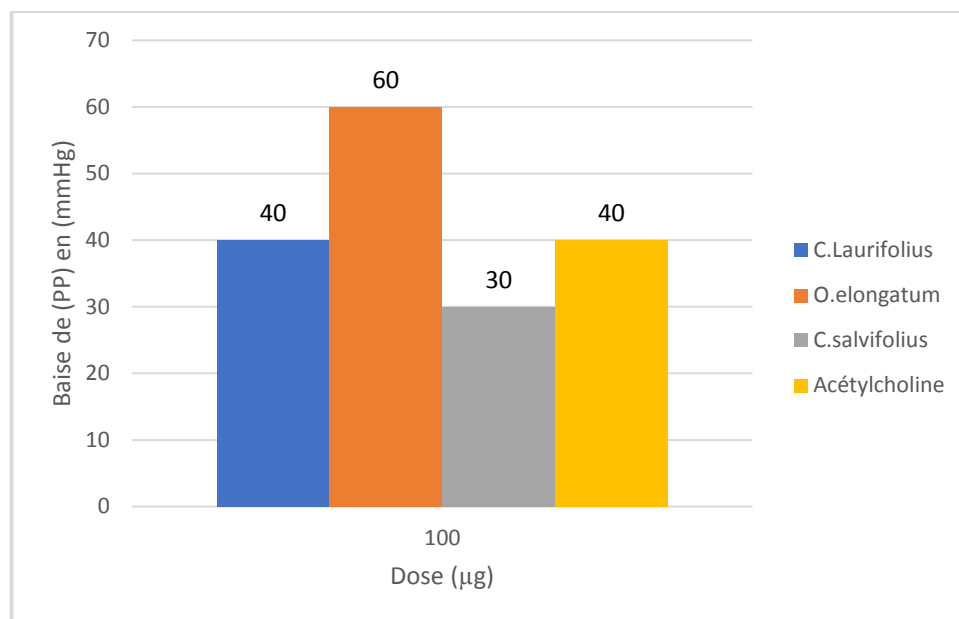


Figure 52 : Effet vasodilatateur des extraits méthanoliques d'*O. elongatum*, *C. salviifolius*, *C. laurifolius* et Ach sur (LVM)

Les extraits méthanoliques ont induit une relaxation dépendante de la concentration, dont l'efficacité était variable d'une plante à l'autre. L'extrait d'*O. elongatum* (ainsi que dans les tests d'activité antioxydante) était le plus efficace, induisant une relaxation maximale de 75%, suivi par *C. laurifolius* de 50%, cet échantillon avait une relaxation maximale similaire à la relaxation induite par l'acétylcholine 50%. *C. salviifolius* a induit 37,5% de relaxation à la dose de 100 µg. Les résultats obtenus avec les extraits méthanoliques des trois plantes se sont avérés prometteurs. Les métabolites secondaires existant dans ces espèces représentent des pistes précieuses pour le développement de médicaments utiles dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

Les autres extraits hexanique et acétate d'éthyle ont montré une relaxation importante à la même dose (100 µg) (figure 52).

Les effets vasodilatateurs des extraits de nos plantes pourraient être liés à leurs métabolites secondaires à activité antioxydante. En effet, les recherches de (*Ferreira et al*) [180], ont montré que les flavonoïdes des extraits méthanoliques contribuaient à l'activité vasodilatatrice dépendante de l'endothélium dans l'environnement mésentérique des rats.

L'action vasodilatatrice indépendante de l'endothélium a également été vérifiée dans des études sur les flavonoïdes [180].

En résumé, nous pouvons conclure que l'activité vasodilatatrice trouvée chez les extraits des trois espèces *O. elongatum*, *C. laurifolius* et *C. salviifolius* était due à leur pouvoir antioxydant. Ce résultat peut, également, être associé à la présence de composés phénoliques. (Burn *et al*) [166], ont démontré une relation étroite entre l'activité antioxydante et la capacité vasodilatatrice d'un groupe de composés phénoliques. De même, d'autres études ont conclu que les antioxydants agissent comme des vasodilatateurs, ce qui contribue à baisser la tension artérielle et à prévenir les accidents vasculaires cérébraux [181,182].

Conclusion

Notre criblage sur l'activité antioxydante des cinq plantes du caïdat de Beni Ammart, révèle que les extraits des plantes ont une activité antioxydante qui varie toujours en fonction du solvant d'extraction et de la concentration.

De tous les extraits testés c'est l'extrait méthanolique qui a donné la meilleure activité. On peut classer les plantes étudiées selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant :

O. elongatum > *C. salvifolius* > *D. gnidium* > *T. willdenowii* > *C. laurifolius*

Les extraits méthanoliques ont exercé une bonne activité réductrice du molybdate, une activité anti radicalaire vis-à-vis du radical (DPPH) et une activité inhibitrice du blanchissement de β -carotène. Les activités antioxydantes exercées par les extraits pourraient être liées à la richesse des plantes en molécules antioxydantes telles que les polyphénols et les flavonoides.

L'étude de l'activité vasodilatatrice des extraits des cinq plantes a révélé l'effet vasodilatateur des extraits méthanoliques et acétate d'éthyle d'*O. elongatum*, *C. salvifolius* et hexanique et méthanolique de *C. laurifolius*. Ces extraits ont montré une efficacité dose dépendante sur le lit vasculaire mésentérique du rat. Il serait donc intéressant d'envisager d'approfondir les recherches d'optimisation de fractionnement et d'analyse afin de caractériser d'autres composés qui peuvent avoir d'autres activités et donc d'autres effets thérapeutiques.

Chapitre IV : Séparation et analyse des extraits étudiés

Introduction

Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent être séparés de leur matrice végétale d'origine : chaque composé chimique d'origine naturelle joue un rôle particulier dans une matrice donnée. La chromatographie demeure la technique la plus utilisée à cette fin. C'est une méthode physico-chimique qui sert à séparer les différentes substances présentes dans un mélange. La solubilité dans un solvant liquide, la taille et la polarité sont parmi les facteurs intervenants dans le fractionnement des molécules à séparer. Il existe différentes sortes de chromatographies parmi lesquelles la chromatographie sur colonne qui est une méthode de base dans toute étude phyto-chimique. Elle permet dans un premier temps de simplifier les extraits naturels en des fractions, comme elle est utilisée par la suite pour purifier les constituants de ces mélanges.

À partir de l'étude bibliographique et selon les résultats expérimentaux qui ont montré la richesse de nos extraits en composés phénoliques, ce qui justifie notre choix de les soumettre à une nouvelle investigation chimique.

Notre objectif principal dans cette partie est de présenter les protocoles expérimentaux préconisés pour isoler et analyser les différents métabolites contenus dans les espèces de *D. gnidium* *O. elongatum* et *C. salviifolius*.

I. Matériel et Méthodes

➤ Principe des expériences

Le principe de la caractérisation spectroscopique des flavonoïdes est basée sur la comparaison de leurs différentes propriétés spectroscopiques avec celles de la littérature.

Les flavonoïdes s'identifient par les colorations jaune, jaune orange, orange et verdâtre.

Le principe de cette analyse a consisté à déterminer des principaux de composés d'une famille donnée de molécules dans l'extrait aqueux par spectrophotométrie UV/VIS, ainsi de comparer chaque fraction issue d'un solvant donné avec des produits cosmétiques sont utilisés comme des références, en comparant globalement l'allure des spectres des fractions étudiés et de références et pouvoir regrouper les différentes fractions en fonction de la forme générale des spectres.

1. Matériel végétal

Les plantes ont été récoltées de la région de Beni Ammart d'Al Houceima en février et septembre 2014, seules les feuilles et les tiges des trois espèces *Daphne gnidium*, *Origanum elongatum* et *Cistus salviifolius*, ont été étudiées.

Les espèces ont été triées, séparées et séchées dans un endroit aéré à l'abri des rayons solaires. Ensuite les parties aériennes ont été broyées pour obtenir une poudre végétale fine qui a été conservée jusqu'à son utilisation. Le tableau suivant comprend le non botanique, saison de récolte, organe et la masse utilisés.

Tableau 22 : Matériel végétal étudié et saison de récolte

Nom botanique	Saison de récolte	Organe	Masse
<i>Daphne gnidium</i>	(Septembre) (Février)	-Feuilles	100 g
		-Tiges	
<i>Origanum elongatum</i>		-Feuilles	100 g
		-Tiges	
<i>Cistus salviifolius</i>		-Feuilles	100 g
		-Tiges	

2. Méthode d'extraction

2.1 Extraction par macération à froid

La méthode d'extraction que nous avons employée est la macération des extraits bruts aqueux (H_2O). Une quantité de 100 g de poudre pour 1 L d'eau (10%) dans une bouteille en verre recouverte d'aluminium afin d'éviter toute dégradation thermique, est placée à température ambiante pendant 48h. Après filtration à l'aide d'un papier filtre (papier Whatman), nous avons mis le filtrat aqueux au soleil jusqu'à élimination d'eau. Cette opération a permis de récupérer un extrait huileux solide, que nous avons repris. Le protocole suivi est détaillé dans les figures ci-dessous (Figures. 53 ; 54)

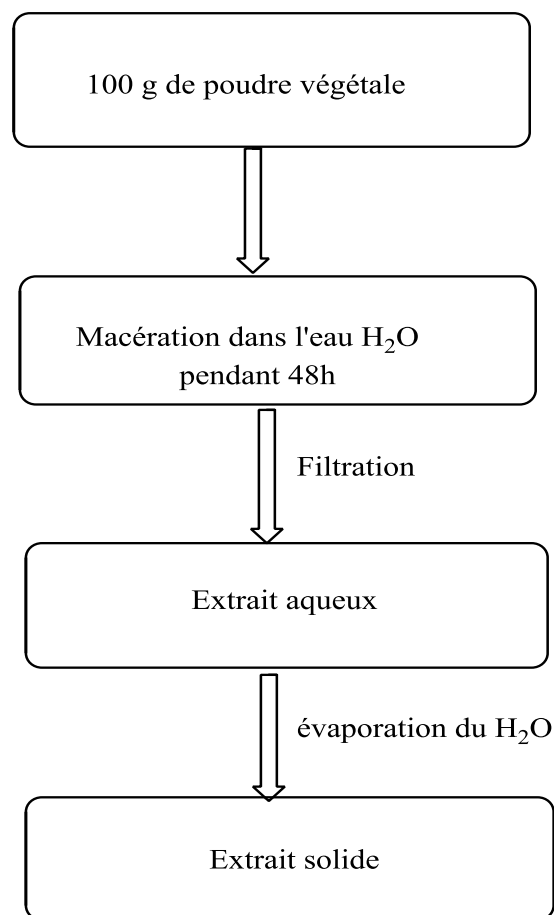


Figure 53 : Protocole de préparation des extraits aqueux bruts



Figure 54 : Etapes de macération et de filtration des parties des plantes étudiées

3. Technique de séparation

3.1 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

La méthode utilisée en premier dans le fractionnement des extraits bruts est la chromatographie sur colonne ouverte à gel de silice. Les conditions expérimentales prises sont représentées comme Suit :

- Deux colonnes ou adsorbants :
 - Colonne 1 : de diamètre 13 mm et de hauteur 10cm
 - Colonne 2 : de diamètre 2 cm et de hauteur 40cm.
- Gel de Silice : (taille des pores 63-200 μ m)
- Les éluants de séparation sont des solvants à polarité croissante (méthanol, n-butanol, l'acétone et l'eau).

La préparation manuelle des colonnes commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement.

Colonne 1 : (4.5 g) de la phase stationnaire (gel de silice) sont versés progressivement dans la colonne jusqu'à stabilisation au niveau désiré. Une fois la colonne est préparée, une masse de 20 mg d'extrait a été déposée sur le front de la phase stationnaire (gel de silice) puis éluee par des volumes de 20 et 60 ml. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche protectrice de sable. Le débit de séparation est de 1 μ l/min.

Colonne 2 : (250 g) de la phase stationnaire (gel de silice) sont versés progressivement dans la colonne jusqu'à stabilisation au niveau désiré. Une masse d'environ 12 g d'extrait

a été déposée sur le front de la phase stationnaire (gel de silice) puis éluée par des volumes de 350 ml. Le débit de séparation est de 0,1 ml/min.

Les phases mobiles pour colonnes ouvertes utilisées dans ce travail sont à base d'acétate d'éthyle, de méthanol, acétone, n-butanol et d'eau. Les éluions sont effectuées par deux méthode différentes soit en utilisant un seul solvant ou un mélange de solvants à différents gradients.

Les différentes étapes suivies dans ces manipulations sont regroupées dans les figures ci-dessous :

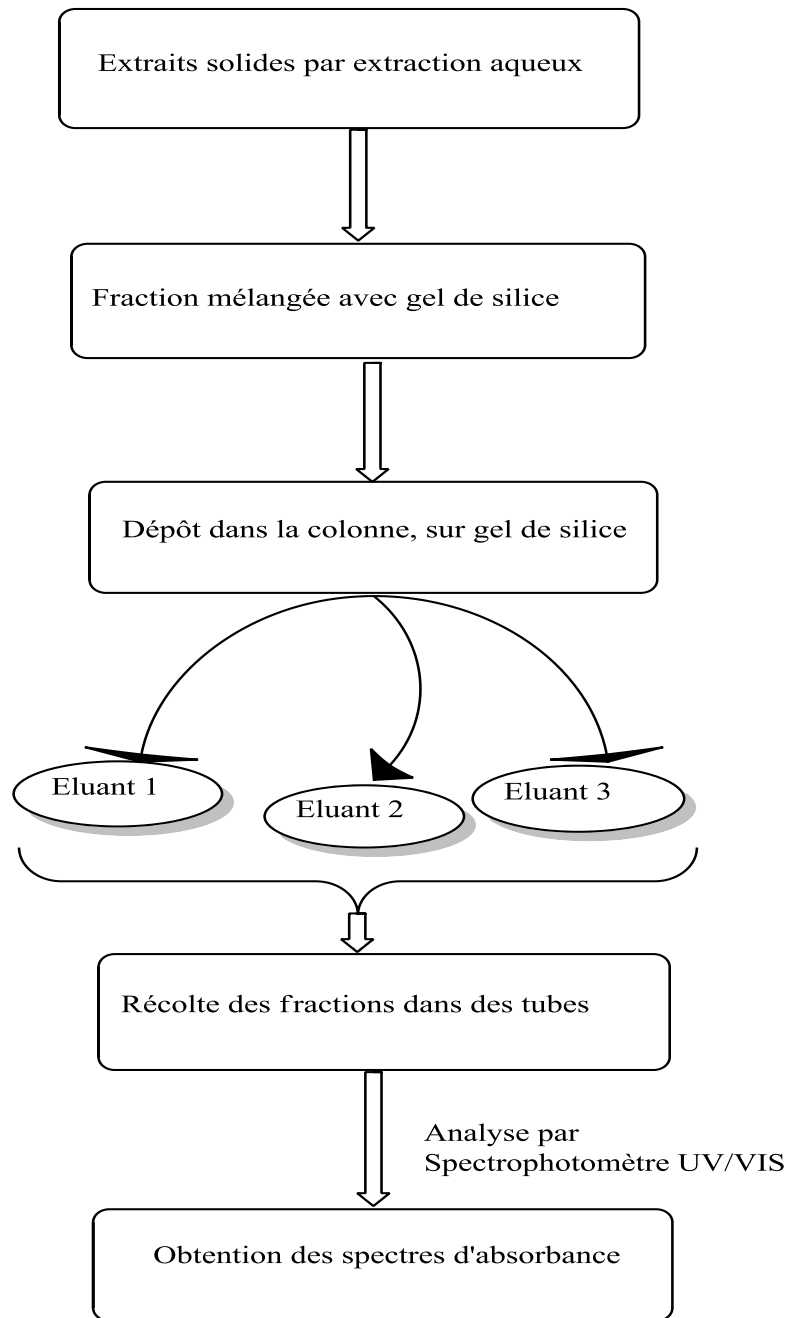


Figure 55 : Etapes de Séparation et différentes analyses chromatographiques par colonne des extraits des plantes étudiées

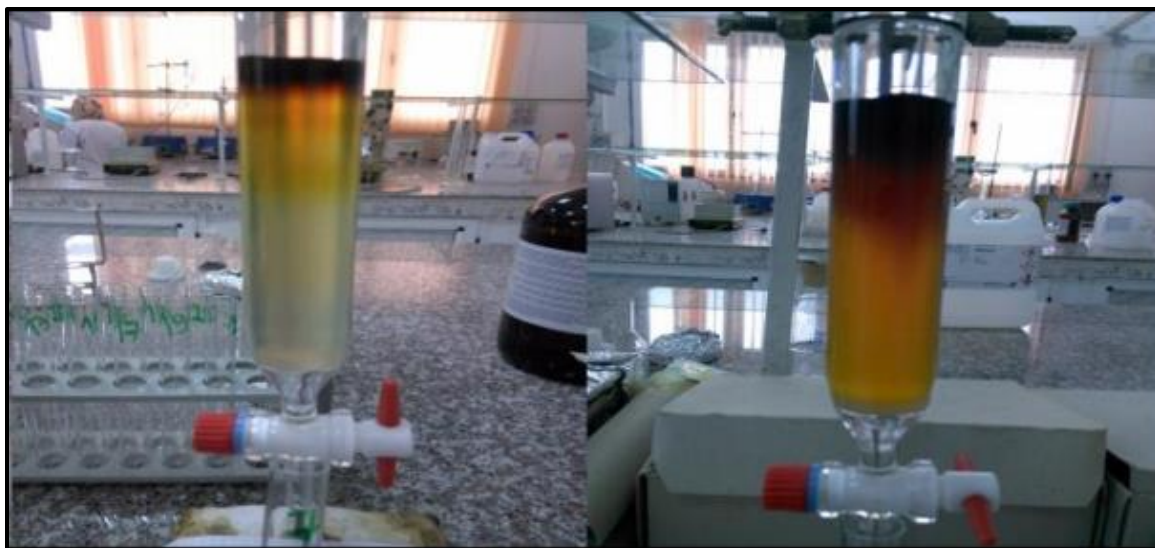


Figure 56 : Evolution de la chromatographie sur colonne de gel de silice.

4. Méthode physico-chimique

4.1 Spectrophotométrie UV/ Vis

Les techniques de spectroscopie U.V- visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée, ce qui permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption U.V-visible permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange par comparaison avec des témoins [183-185].

L'identification des flavonoïdes est caractérisée par la présence de deux pics d'absorption maximale. La première dans la gamme 240-285 nm (bande II, principalement due à l'absorption du système benzoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A) [186], et la deuxième dans la gamme 300-550 nm (bande I, due à l'absorption du système cinnamoyle en faisant intervenir la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau B) [187-190] (figure 57). La position précise et les intensités relatives de ces absorptions maximales fournissent des informations

intéressantes concernant la nature du flavonoïde et des positions hydroxylées dans la structure [191].

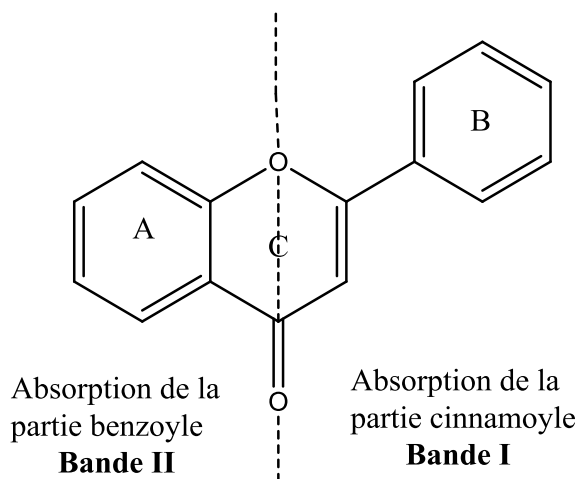


Figure 57 : Les deux bandes caractéristiques d'un squelette flavonique

➤ Analyse des fractions

Les fractions isolées sont dissoutes dans le méthanol et les spectres UV-visible sont enregistrés dans le solvant sur un spectrophotomètre UV/ Vis 6800 Jenway, piloté par un logiciel adapté et basée sur le principe suivant : en milieu alcoolique, chaque famille de flavonoïdes à un spectre d'absorption caractéristique, susceptible d'être modifié par l'addition des réactifs.

Les mesures sont faites à 470 nm. Des cuves standards de quartz sont utilisées. Les solutions sont préparées par dissolution d'une faible quantité des extraits fractionnés (10 mg) dans 100 ml de *MeOH*, dilués à différentes concentrations (1% et 2% m/v) pour analyser les composés isolés.

II. Résultats et Discussion

1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction correspond au pourcentage des principes actifs dissouts dans un solvant aqueux utilisé pour l'extraction. Il est déterminé à partir du poids de l'extrait sec par rapport au poids de la matière végétale sèche réduit en poudre [192].

Les rendements d'extraction obtenus lors de ces étapes de fractionnement sont présentés dans le (tableau 23).

Tableau 23 : Rendement des plantes selon la saison de récolte

Nom botanique	Saison de récolte	Organe	Rendement
<i>Daphne gnidium</i>	-été	Feuilles et Tiges	10%
	-hiver		18%
<i>Origanum elongatum</i>	-été	Feuilles et Tiges	15%
	-hiver		16%
<i>Cistus salviifolius</i>	-été	Feuilles et Tiges	19%
	-hiver		22%

D'après les résultats, nous constatons que le rendement d'extraction dépend de la saison de récolte ; le rendement d'extraction des plantes récoltées en hiver est légèrement supérieur à celui de l'été. De même, l'extrait aqueux de *C. salviifolius* présente le rendement le plus élevé (22 %), suivi de l'extrait aqueux d'*O. elongatum*, puis l'extrait aqueux de *D. gnidium*. On remarque aussi que les feuilles sont plus riches en substances actives que les tiges.

Les valeurs de rendement obtenues peuvent influencer de plusieurs facteurs tel que : les facteurs abiotiques, comme elles peuvent être liées aux conditions expérimentales (solvant d'extraction).

2. Séparation sur colonne

Nous avons réalisé un fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte (CC) à gel de silice des trois extraits aqueux de (*D. gnidium*, *O. elongatum* et *C. salviifolius*), par différentes éluions. Les solvants d'éluion apolaires (Acétate d'éthyle) ont tendance à faire migrer les molécules apolaires lipophiles. Les solvants polaires (méthanol, n-butanol et eau), par contre, ont tendance à extraire les composés

polaires hydrophiles. Quant à l'acétone, un solvant polaire et aprotique, va surement extraire les deux familles lipophiles et hydrophiles

Les résultats des rendements obtenus sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 24 : Résultats des rendements des différentes éluions des trois plantes

Plante	Eluant	Rendement
<i>O. elongatum</i>	A.E (20 ml)	4%
	A.E +MeOH (10ml:10ml; v: v)	3%
	MeOH(20ml)	20%
	H ₂ O (20 ml)	18%
<i>C. salvifolius</i>	A.E (20 ml)	8%
	A.E +MeOH (10ml:10ml; v: v)	4%
	MeOH(20ml)	20%
	H ₂ O (20 ml)	12%
<i>D. gnidium</i>	A.E (20 ml)	17%
	A.E +MeOH (10ml:10ml; v: v)	6%
	MeOH (20ml)	25%
	H ₂ O (20 ml)	15%
<i>O. elongatum</i>	A.E (20 ml)	9%
	Acétone (20ml)	8.5%
	Acétone + MeOH (9/1:20ml; v: v)	8%
	Acétone + MeOH (5/5 :20ml; v: v)	8.9%
	Acétone + MeOH (3/7 :20ml; v: v)	8.6%
	MeOH (20ml)	14%
	H ₂ O (20 ml)	17%
<i>C. salvifolius</i>	A.E (20 ml)	10%
	Acétone (20ml)	9%
	Acétone + MeOH (9/1:20ml)	8.8%
	Acétone + MeOH (5/5 :20ml)	9%
	Acétone + MeOH (3/7 :20ml)	9%
	MeOH (20ml)	12%

	H ₂ O (20 ml)	17%
	A.E (20 ml)	10%
	Acétone (20ml)	9.5%
	Acétone + MeOH (9/1:20ml; v: v)	9%
<i>D. gnidium</i>	Acétone + MeOH (5/5 :20ml; v: v)	8.9%
	Acétone + MeOH (3/7 :20ml; v: v)	10%
	MeOH (20ml)	13%
	H ₂ O (20 ml)	15%
	A.E (60 ml)	20%
<i>O. elongatum</i>	Acétone (60ml)	43%
	Acétone + MeOH (5/5:60ml; v: v)	31%
	A.E (60 ml)	20%
<i>C. salvifolius</i>	Acétone (60ml)	30%
	Acétone + MeOH (5/5:60ml; v: v)	45%
<i>D. gnidium</i>	A.E (60 ml)	5%
	Acétone (60ml)	15%
	Acétone + MeOH (5/5:60ml; v: v)	65%
<i>C. salvifolius</i>	A.E (350 ml)	0.85%
	n-butanol (350 ml)	12.94%
	MeOH (350 ml)	55.15%

Parmi les fractions obtenues par la séparation sur colonne, les éluants eau et méthanol présentent les rendements les plus élevés, suivi des éluants acétone et n-butanol. Le rendement le plus faible est celui de l'éluant acétate d'éthyle. Comme attendu ce dernier solvant contient des composés peu polaires alors que les autres extraits contiennent plus de composés polaires. Cela indique que les espèces étudiées contiennent des quantités importantes de polyphénols polaires. Ce résultat est confirmé par les couleurs caractérisant les fractions récoltées.

3. Propriétés physico-chimiques

Dans des études antérieures, les flavonoïdes jouent un rôle important dans la coloration des végétaux [193]. Les fractions issues de cette séparation se présentent sous forme d'extraits jaune et marron, soluble dans le méthanol, ce qui signifie que les feuilles de ces plantes contiennent des substances actives, tel que la famille des flavonoides. (Figure 58).

Les fractions obtenues après séparation sur colonne et passées à l'évaporateur rotatif pour chasser les solvants.



Figure 58 : Les fractions des extraits par chromatographie par colonne

Remarque

Au cours de la séparation par chromatographie sur colonne, nous avons constaté la formation des précipités jaune et marron dans la plupart des fractions recueillies. Les précipités sont immédiatement récupérés. Ils se présentent sous forme des poudres jaune et marron, permettent de supposer que ce sont des produits purs.

Afin de vérifier cette hypothèse une analyse de ces solides par résonance magnétique (RMN) est envisagée.

4. Données spectroscopiques UV

La sélection des extraits aqueux étudiés a été basée sur les résultats des données spectrales d'absorption en UV/visible de chaque échantillon.

Les spectres en spectroscopie Ultra-Violette des extraits aqueux à partir des feuilles et des tiges d'*O. elongatum* sont donnés dans la figure suivante.

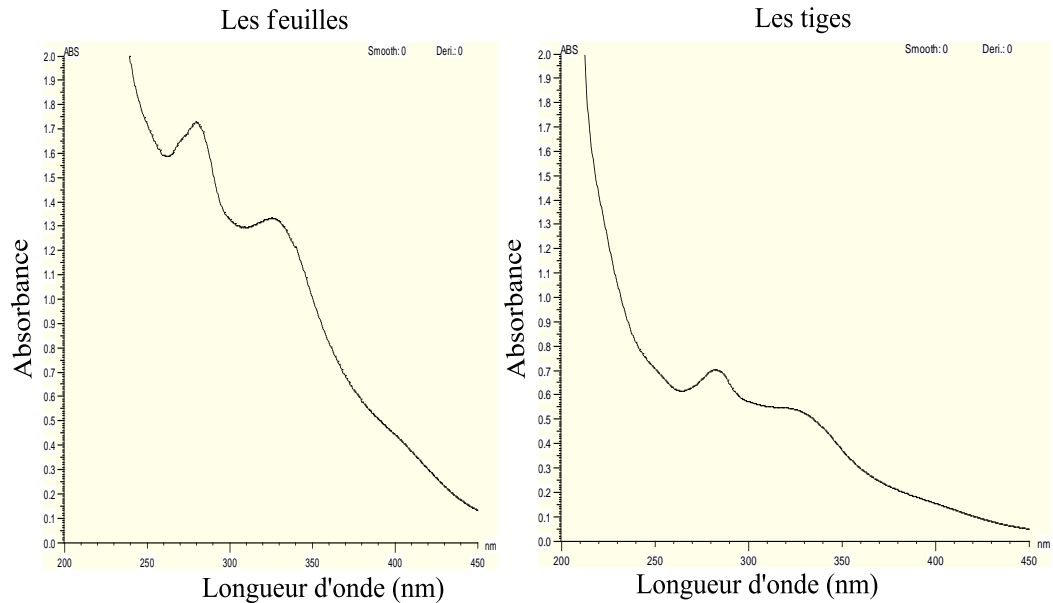


Figure 59 : Les spectres d'absorption en UV/VIS d'extract aqueux des feuilles et des tiges d'*O. elongatum*

La comparaison des deux extraits aqueux des feuilles et des tiges d'*Origanum elongatum* montre que l'allure de spectre des feuilles est légèrement plus intense que le spectre des tiges, pour des échantillons préparés à la même concentration et le même volume injection. Donc on peut penser que les composés bioactifs sont influencés par la saison de floraison, car la plupart des substances sont stockés dans les feuilles qui apparaissent en été. Ceci permet de dire que la teneur en flavonoïdes dépend de la saison de floraison qui s'étend pour *l'O. elongatum* de juin à septembre.

Concernant les autres espèces, les spectres UV/visible de leurs extraits aqueux ont permis les constatations suivantes :

$Ex_{(hiver)} D. gnidium > Ex_{(été)} D. gnidium$

$Ex_{(été)} C. salvifolius > Ex_{(hiver)} C. salvifolius$

$Ex_{(été)} O. elongatum > Ex_{(hiver)} O. elongatum$

Avec le signe « > » signifie plus riche en flavonoïdes

➤ **Les spectres UV/VIS des fractions des extraits de n-butanol et de l'acétone**

Le dosage de différents composés phénoliques des feuilles *D. gnidium*, *O. elongatum* et *C. salvifolius* a révélé une teneur importante en polyphénols particulièrement les flavonoïdes.

L'étude qualitative a permis de caractériser les principaux composés phénoliques des feuilles *D. gnidium*, *O. elongatum* et *C. salvifolius*. En effet, une diversité des polyphénols a été observée. Pour cette raison, une étude spectrophotométrique basée sur les caractéristiques spectrales et chromatographiques a été nécessaire pour l'identification des différentes molécules phénoliques.

Dans notre étude, la purification des polyphénols sur colonne en utilisant comme solvants d'élution : l'acétate d'éthyle, eau, méthanol, n-butanol et l'acétone nous a permis d'isoler différentes molécules. Ainsi, en comparant leurs différentes propriétés spectroscopiques avec celles de la littérature, nous avons pu identifier des flavonoïdes. Les extraits n-butanol et l'acétone contiennent des composés intéressants, notamment, les spectres UV des fractions enregistrés présentent deux Bandes, une première bande (BI) située à 340 nm et une deuxième bande (BII) à 284 nm. Ces spectres renseignent sur une structure de flavone [194]. Nous constatons aussi que la fraction n-butanol de *C. salvifolius* présent deux bandes, une première bande (BI) située à 360 nm et une deuxième bande (BII) à 270 nm. Ce spectre renseigne sur une structure de l'isoflavone [194].

Le tableau suivant rassemble l'ensemble de des bandes UV des fractions obtenues des extraits de n-butanol et d'acétone des feuilles de *D. gnidium*, *O. elongatum*, *C. salvifolius*.

Tableau 25 : Résultats d'UV des fractions

Extrait	Réactif	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Flavonoides
<i>D. gnidium</i>	Acétone	340 nm	284 nm	+
<i>O. elongatum</i>	Acétone	340 nm	284 nm	+
<i>C. salvifolius</i>	Acétone	330 nm	284 nm	+
	n-butanol	360 nm	270 nm	+

(+) Présence des flavonoides

Les spectres d'absorption UV-Visible des extraits d'acétone de *D. gnidium*, *O. elongatum* et *C. salvifolius* de la même concentration (2mg/100mL), présentent des pics des spectres UV-Visible relativement similaires. Tandis que l'extrait n-butanol de *C. salvifolius* montre des pics à des longueurs d'onde différentes (Figure 65). L'absorbance varie proportionnellement avec la concentration des extraits étudiés, en augmentant la concentration l'absorption augmente.

Les analyses par spectrophotomètre UV/VIS ont clairement montré la richesse en composés phénoliques des extraits d'acétone et de n-butanol des plantes étudiées. Pour illustrer cette observation, Les spectres d'absorption de ces espèces pures sont présentés dans la (Figure 60).

- *D. gnidium* et *O. elongatum*

Les spectres d'absorption UV (Figure 64) présentent deux maximums d'absorption à 284 nm et 340 nm correspondant à l'absorption des bandes : (bande II) et B (bande I) d'un flavone.

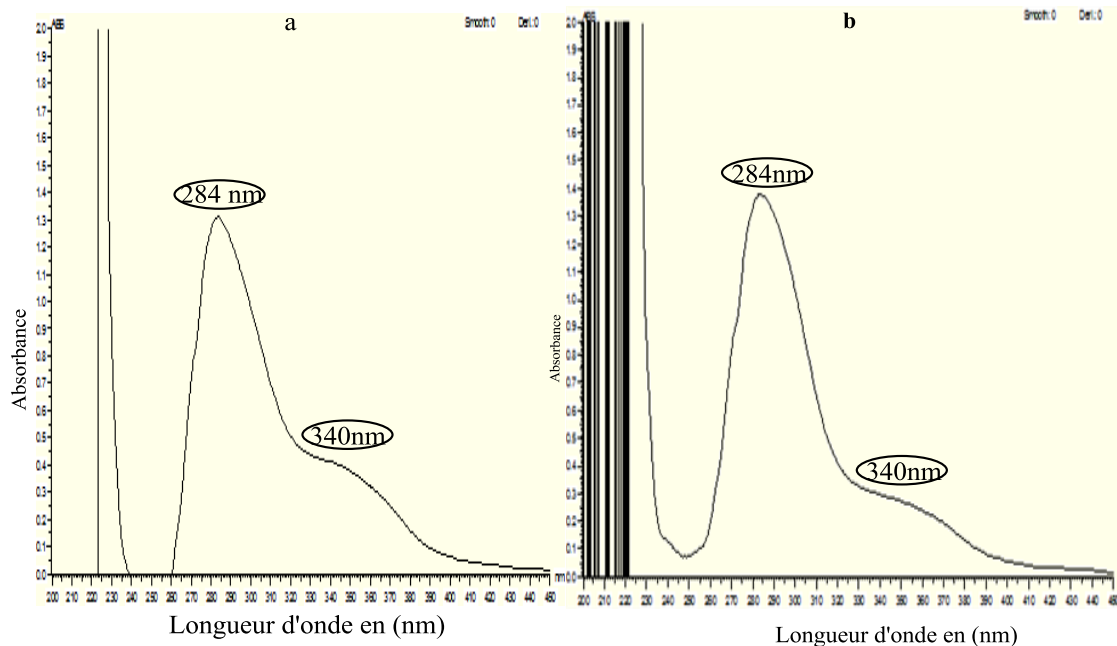


Figure 60 : Série spectrale d'absorption en UV/VIS d'extrait aqueux de feuilles des deux fractions d'acétone a) *D. gnidium* et b) *O. elongatum*. Les extraits sont dilués dans le méthanol (2mg/100ml)

- *Cistus salvifolius*

Les spectres d'absorption UV des fractions de *C. salvifolius* (Figure 61) présentent deux pics à 284 nm et 340 nm relatifs à la bande I et la bande II. Pour la fraction d'acétone, les spectres d'absorption UV montrent deux pics à 270 nm et 360 nm relatifs à la bande pour la fraction de n-butanol.

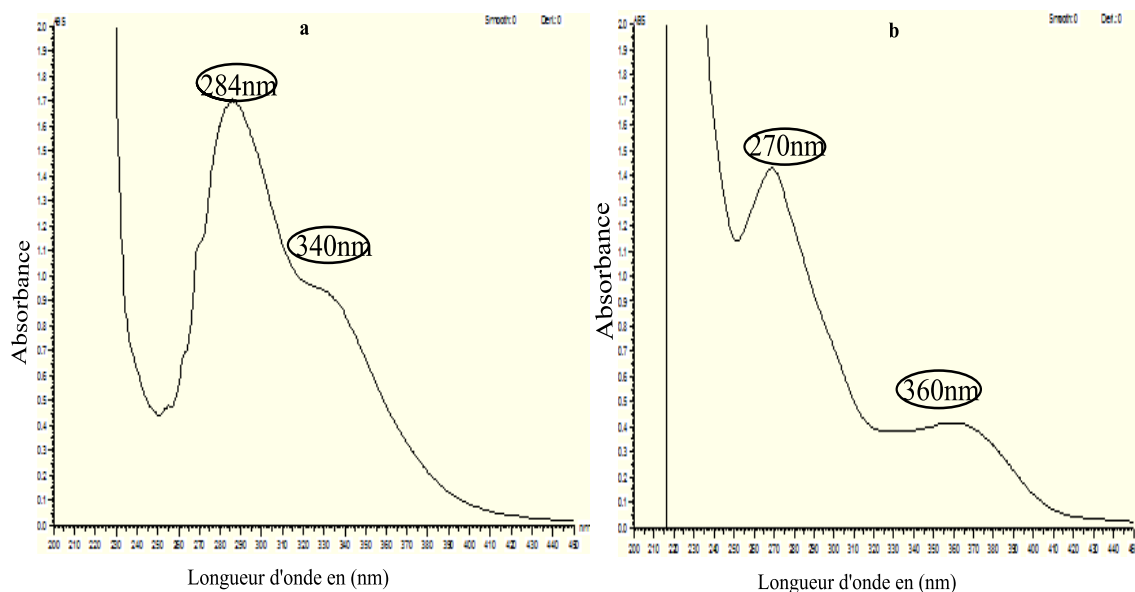


Figure 61 : Série spectrale d'absorption en UV/VIS d'extrait aqueux de feuilles des deux fractions de *C. salvifolius* a) d'acétone et b) n-butanol. Les extraits sont dilués dans le méthanol (2mg/100ml)

L'analyse des spectres UV des fractions aqueux de feuilles des trois espèces étudiées, présentent approximativement la même allure du spectre d'absorption enregistré entre 250 et 400 nm, (Figure 64). Pour ces deux pics d'absorption, un majeur et l'autre moins intense sont observés : le premier pic est en lumière ultra-violet (284 nm) et le deuxième pic est à l'intervalle (320 et 360 nm). L'absorbance des fractions d'acétone à 284 nm respectivement, *C. salvifolius*, *O. elongatum* et *D. gnidium* de (1.75), (1.4) et (1.35) et la fraction n-butanol de *C. salvifolius* à 270 nm de (1,45), correspond à des teneurs considérables en pigments jaunes y compris les flavonoïdes (caroténoïdes). (Yanishlieva et al, 2001) [195], ont montrés que ces pigments sont des substances colorantes et lipophiles connues comme désactivant de l'oxygène singulet et sont donc des inhibiteurs très efficaces de la photooxydation. Les pigments marrons, particulièrement les isoflavones, mesurés généralement à 335 nm sont présents en quantités respectivement pour *D. gnidium*, *O. elongatum* (absorbance de l'ordre de 0.25 et 0.45) et *C. salvifolius* (0.75), tandis que cette dernière espèce de la fraction n-butanol a présenté une absorbance de (0.42) à 360 nm. (Amarowicz et al, 1995) [196], a utilisé des conditions similaires pour l'extraction

des composés phénoliques et des sucres des lentilles et a signalé que le spectre UV de l'extrait d'acétone avait un maximum à 274 nm et que le composé dans l'extrait de butanol avait un maximum à 272 nm.

Ces résultats peuvent suggérer que l'activité antioxydante des fractions des flavonoïdes étudiés des trois plantes, est en relation avec la composition en polyphénols. Ceci est confirmé par les différentes analyses chromatographiques effectuées sur les fractions choisies en raison de leur pouvoir antioxydant. Ces résultats nous conduisent à faire une comparaison des spectres des fractions obtenus avec des spectres de références.

5. Comparaison de l'allure des spectres des fractions étudiés et de références

Afin de comparer globalement l'allure des spectres des fractions étudiés et de références et pouvoir regrouper les différentes fractions en fonction de la forme générale des spectres, nous avons réalisé une analyse spectrale pour un ensemble des fractions, en prenant comme variables les absorbances aux différentes longueurs d'onde.

Comme on peut le voir sur les figures ci-dessous, de nombreux composés présentent des spectres caractéristiques des fractions de références qui sont des pigments de protection contre les radiations ultraviolettes responsable des dégâts cellulaires et du stress oxydatif de la peau. Cette observation nous a incités à comparer notre travail sur les extraits des plantes avec les références.

Dans le but d'évaluer et de valoriser le potentiel préventif contre le rayonnement UV des extraits des plantes qui font l'objet de notre étude, certains spectres d'absorption en UV surtout, en été comparés à des spectres d'absorption relatifs à certains principes actifs qui composent certains produits cosmétiques appliqués sur la peau pour la protéger du rayonnement ultraviolet.

➤ *Les spectres des références (produits cosmétiques).*

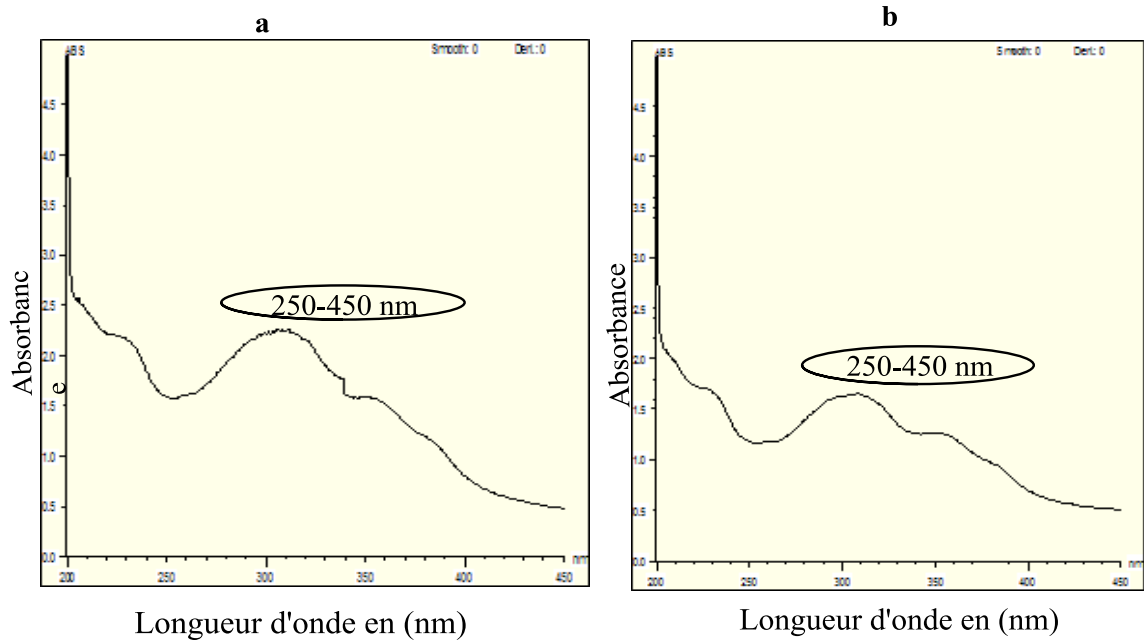


Figure 62 : Spectre d’absorption en UV/VIS d’extraits méthanoliques des variétés de teinte solaire ; a : 009 iderm ramadan Esclalol solaire, b : 010 iderm ramadan Esclalol solaire teinte Les extraits sont dilués dans méthanol (2mg/100ml)

Les spectres d’absorption des extraits de *C. salvifolius*, *O. elongatum* et *D. gnidium* ont été comparé aux spectres de références (009 iderm ramadan Esclalol solaire et 010 iderm ramadan Esclalol solaire teinte). Nous remarquons que les extraits d’acétone et de n-butanol des trois espèces étudiées sont riches en polyphénols (caroténoïdes) absorbent à la longueur d’onde dans Ultra-violet de 250 à 450 nm. Apparemment, les extraits de référence absorbent à la longueur d’onde entre 250 à 450 nm.

De ce fait, les extraits de feuilles des plantes étudiés, pourraient être utilisés comme agents de protection contre les radiations ultraviolettes responsable des dégâts cellulaires et du stress oxydatif de la peau.

Conclusion

La caractérisation chimique des extraits d'*O. elongatum*, *C. salvifolius* et *D. gnidium* nous a donné une idée sur les classes de métabolites secondaires présents dans nos extraits essentiellement des polyphénols. Nous avons établi les conditions de leur séparation par chromatographie sur colonne.

Les extraits aqueux issus des trois plantes ont été soumis à des fractionnements de séparation par chromatographie sur colonne, en utilisant des systèmes d'élution différents. On a obtenu des fractions caractérisées par leurs couleurs.

L'analyse par la spectrophotométrie UV/VIS a permis de déterminer les types de quelques flavonoïdes, ces résultats sont en accord avec ceux de l'analyse colorimétrique, par comparaison de leurs données spectrales par rapport à celles indiquées par des spectres de références utilisés dans des produits des écrans solaires. Ces extraits pourraient donc entrer dans les formulations des filtres antisolaires et des produits de soin.

Conclusion générale

A l'issue de ce travail ayant brigué l'identification des usages traditionnels de cinq plantes médicinales du caïdat Beni Ammart, la détermination de leurs teneurs en polyphénols totaux ainsi que leurs activités antioxydante et vasodilatatrice correspondantes et finalement la séparation et l'analyse des composés fractionnés. Les résultats obtenus nous ont permis de dégager les conclusions suivantes :

L'enquête ethnobotanique réalisée auprès des enquêtés de Beni Ammart, nous a permis de connaître l'usage fréquent des plantes par la population afin de remédier durablement aux nombreuses maladies et infections auxquelles ils sont exposés. Cette enquête a révélé des usages non décrits à ce jour dans la littérature comme l'utilisation d'*O. elongatum* pour la conservation des pommes de terre c'est-à-dire comme antibactérienne. D'une façon générale les affections respiratoires, digestives et dermatologiques, représentent les maladies les plus citées. *C. salvifolius* et *C. laurifolius*, sont des plantes largement employées dans les traitements des douleurs à l'estomac. *D. gnidium*, qui est une plante toxique, les produits toxiques seraient dans les graines, est connue par son utilisation dans les traitements de cheveux et les soins du visage, et est réputée pour ses propriétés cicatrisantes.

L'étude phytochimique des différents extraits obtenus par sonication a révélé la présence des polyphénols et des flavonoïdes. Les extraits d'acétate d'éthyle se sont révélés plus riches en polyphénols tandis que les flavonoïdes se concentrent principalement dans les extraits méthanoliques des plantes.

Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques et acétate d'éthyle des espèces d'*O. elongatum*, *C. salvifolius* et *C. laurifolius* ont des activités antioxydante et vasodilatatrice très importantes.

La méthode de fractionnement sur colonne de gel de silice, nous a permis une purification performante des extraits bruts. Une majorité de ces constituants sont des flavonoïdes (flavones et isoflavone), d'après les résultats de spectrophotométrie UV/VIS.

Elle a été confirmée par comparaison des données spectrales de nos extraits aqueux avec celles des références.

Le présent travail n'est que le commencement d'une longue investigation ; l'étude des plantes médicinales, afin d'esquisser un développement durable à la région de Beni Ammart.

En perspectives nous envisageons de :

- Tester d'autres activités biologiques des extraits aqueux et des huiles essentielles répondant aux usages majeurs de la plante selon les résultats de l'enquête ethnobotanique.

- Isoler et identifier les métabolites secondaires par différentes méthodes (IR, RMN, 1H et ¹³C) et les tester contre les utilisations traditionnelles.

- Etudier la toxicité des métabolites secondaires extraits des espèces pour une éventuelle utilisation en formulation cosmétique.

REFERENCES

1. Diallo, D., (2000) ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica*(Ebenaceae), *Entada africana* (mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae). Thèse de doctorat, 221 P, Lausanne (Suisse)
2. Anthony, J.P., Fyfe, L. and Smith, H., (2005). Plant active components - a resource for antiparasitic agents. *TRENDS in Parasitology* Vol. 21, No.10 October
3. Bellakhdar, J. Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes. Contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Editions techniques nord-africaines, Rabat, Maroc, 1978 ; 365p.
4. Nabih, M. Secrets et vertus thérapeutiques des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle à Settat. Thèse de pharmacie, Université Mohamed V, Rabat Maroc, 1992, 195p.
5. El Haji, M. Contribution à l'étude des plantes toxiques médicinales dans les régions Nord du Maroc (Province de Tanger, Tétouan, et Chefchaouan). Thèse de Doctorat vétérinaire, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc, 1995, 275p.
6. Kahouadji, S. Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental, Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université Mohamed I, Oujda, Maroc, 1995, 207p.
7. El Rhaffari, L. ; Zaid, A. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Actes du 4^{ème} congrès Européen d'Ethnopharmacologie origine des pharmacopées savantes, Montpellier, France ; Publiés par le CRD, 2002, pp 295-304.
8. Mehdioui, R. ; Kahouadji, A. Etude ethnobotanique auprès de population riveraine da la foret d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). *Bulletin de l'Institut Scientifique* 29 (2007) 11-20.
9. Lahsissene, H. ; Kahouadji, A. ; Tijane, M. ; Hseini, S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la region de Zaer (Maroc Occidental). *LEJEUNIA* 186 (2009) URL: [http \\
popus.ulg.ac.be/0457-4184/index.php?id=701](http://popus.ulg.ac.be/0457-4184/index.php?id=701)

-
10. Benkhniq, O. ; Zidane, Z. ; Fadli, M. ; Elyacoubi, H. ; Rochdi, A. ; Drouira A. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Machraa Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 53 (2010-2011) 191-216.
 11. Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi A., Zidane L. Etude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haute Moulouya, Maroc, *Journal of Applied Biosciences* 78 (2014) 6771-6787.
 12. El hafian, M. ; Benlamdini, N. ; Elyacoubi, H., Zidane, L. ; Rochdi, A. Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la vallée de Khenifra (Maroc). *International Journal of Applied Biosciences* 81 (2014) 7198-7213.
 13. Hachi, M. ; Hachi, T. ; Belahbib, N. ; Dahmani, J. ; Zidane L. Contribution à l'étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale utilisée au niveau de vallée de khenifra (Maroc). *International Journal of Innovation and Applied Studies* 11 (2015) 754-770.
 14. El Azzouzi, F., Zidane, L. La flore médicinale traditionnelle de la region de Béni Mella (Maroc). *Journal of Applied Biosciences* 91 (2015) 8493-8502.
 15. Hmamouchi M., (1999). *Les Plantes médicinales et aromatiques Marocaines : Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie*-Imprimerie de Fédala, Mohammedia (Maroc), 389 pp.
 16. Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A. (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* 24, 41-9
 17. Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3e édition, Technique & Documentation, Paris, pp. 274, 654-655.
 18. Brooks, G., Evans, F.J. (1990). Toxic Hazards of Plants from the Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. In: Rizk, A.M. (ed.), *Poisonous Plant Contamination of Edible Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 27-63.
 19. Brauchler C., Meimberg H. Et Heubl G. (2010). Molecular phylogeny of Menthiane (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) – Taxonomy, biogeography and conflicts, *Molecular phylogenetics and Evolution* 55: 501-523.
 20. Naghibi F., Mosaddegh M., Motamed S.M and Ghorbani A. (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran from Ethnobotany to Pharmacology, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 63-79.

-
21. Yalcin F.N., Kaya D. (2006). Ethnobotany, Pharmacology and Phytochemistry of the Genus *Lamium* (Lamiaceae), *Pharm. Sci.*, 31: 43-52.
 22. Amiri H. (2011). The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja macrosiphonia* Bornm, *Natural Product Research*, 25: 232-243
 23. Judd, Campbell, Kellogg et Stevens (2002). *Botanique Systématique, une perspective phylogénétique*, Deboeck Université, Paris, pp 384.
 24. M. C. F. Proctor (1978). *Cistaceae*, Flowering plants of the world: Heywood, V.H. (ed). Oxford University Press, Oxford, 108-109.
 25. B. Guzmán, P. Vergas (2009). Historical biogeography and character evolution of *Cistaceae* (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences *Organisms. Diversity & Evolution*, 9 : 83–99
 26. D. Angelopoulou, C. Demetzos, D. Perdetzoglou (2001). An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29 : 405-415.
 27. S. Baslar, Y. Dogan, H. H. Mert (2002). A study on the soil-plant interactions of some *Cistus* L. species distributed in West Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 26 : 149–159
 28. O. Ustun, I. Gurbuz, S. Kusmenoglu, S. Turkoz (2004). Fatty acid content of three *Cistus* species growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 40 : 526- 528.
 29. B. Wang, Y. L. Qiu (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16 : 299-363
 30. J. Bellakhdar (1998). *Pharmacopée traditionnelle marocaine, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires*. Ibis Press, Paris, 770.
 31. Julien Ferrari (2002), *Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : Gnidia involucreta Steud.* Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.p13.
 32. Nisrin Benayed (2008), *les huiles essentielles extraction des plantes médicinales marocaines*, Faculté des Sciences de Rabat, p18.
 33. Mohammedi Zohra (2012-2013), *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie*, Faculté des Sciences Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire Laboratoire des Produits Naturels, p35-3. <http://fr.scribd.com>

-
34. Atlan M. (1987), Les labiées : études botaniques, économiques, chimiques et pharmacologiques. Doctorat en Pharmacie. Université de Bordeaux II.
 35. Mohamed Ghanmi, Plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc, p46 ,47 Antibacterial and Antiviral Activities of Essential Oils of Northern Moroccan Plants, British Biotechnology Journal 3(3) : 318-331, 2013.
 36. Naima El Moussaoui, Gloria Sanchez, El Ouardy Khay, Mohammed Idaomar, Ahmed Ibn Mansour, Jamal Abrini and Rosa Aznar.
 37. B. Douhri, M. Idaomar¹, N. Skali Senhaji¹, A. Ennabili and J. Abrini¹ Hepatoprotective Effect of *Origanum elongatum* against Carbon Tetrachloride (CCl₄) Induced Toxicity in Rats European Journal of Medicinal Plants 4(1): 14-28, 2014.
 38. Christaki E, Bonos E, Giannenas I, Florou-Paneri P. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. Agriculture. 2012;(2):228- 43.
 39. G. figuereo (2007), Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, Université Blaise Pascal, p151.
 40. F. bouzergoune, faculté des sciences, étude photochimique de la plante *Helianthemum Kahiricum* Université Hadj Lakhdar Batna, Classification de la flore (25/05/14) : <http://www.omnibota.com>
 41. Amina DAMERDJI (2012), La faune malacologique sur différentes plantes médicinales dans la région de Tlemcen (Algérie nord-occidentale) Département d'Écologie et Environnement, Faculté S.N.V/S.T. U, Université de Tlemcen, Algérie
 42. H. Bouamama, T. Noel, J. Villard, A. Benharref, M. Jana (2006) Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. Journal of Ethnopharmacology ,104–107.
 43. J. De Pascual Teresa, P. Basabe., I. S. Marcos, F. Bermejo. Et J. G. Urones. (1981) An. Quim. 77C, 184.
 44. Jesus.M.L. Rodilla, Dina I. M. DeMendonça, J.G. Urones, R.F. Moro et D.J. Williams (1998) Tricyclic diterpenes from *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 47. 8. 1545-1549

-
45. Brauchler C., Meimberg H. et Heubl H. (2010). Molecular Phylogeny of Menthae (Lamiaceae, Nepetoideae, Menthae)- Taxonomy, biogeography and conflicts, Molecular phylogenetics and Evolution 55: 501-523.
 46. Ismaili H., Sosa S., Brkic D., Fkih Tetouani S., Ildrissi A., Touat D., P. et Tubora A. (2002). Topical anti-inflammatoire activity of extracts and compounds from thymus broussonetii journal of pharmacy and pharmacology, 54: 1137-1140.
 47. <http://www.planfor.fr/achat,ciste-a-feuilles-de-laurier,3009,FR>
 48. http://jardin-sec.pagesperso-orange.fr/catalogue_C.htm
 49. Bouzergoune Fouzia, mémoire : Etude phytochimique de la plante helianthemum kahiricum, Université Hadj Lakhdar-Batna, Algérie, Faculté des Sciences, Département de chimie, pag 5, 6.
 50. Hmamouchi M. Plantes médicinales et Aromatiques marocaines. Edition 1999
 51. Ghanmi et al., 2011. Les plantes Aromatiques et Médicinales du Maroc, Centre de Recherche Forestière, Rabat, 128p.
 52. Atouati B. Y. 2002. La situation du secteur des Plantes Aromatiques et médicinales au Maroc. Terre et Vi, 26p.
 53. Echgada, G; Babri, M. Ettahri, R. Bouabid & K. Allali 2005. Etat actuel du secteur des PAM au Maroc, International congress on Medicinal Plants, Errachidia, 16-19 Mai 2005.
 54. Anonyme 2003a. Office de change, Rabat, Maroc.
 55. Anonyme 2008a. Stratégie Nationale de développement du secteur des PAM au Maroc, Rapport final, juillet 2008, Hauts Commissariats aux Eaux et Forêts et à la lutte contre la Désertification.
 56. Anonyme 2008b. bulletin officiel annuelle des exportations des plantes aromatiques, Edition EACCE, Rabat.
 57. Halliwell, B., Gutteridge, JMC. 1999a Free Radicals in Biology and Medicine. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds,1-543.
 58. Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. 2003. Radicaux libres et antioxydants. In Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires : 59-81. Médecine-sciences Flammarion Paris.
 59. Justine, Odile, Carole PASTRE 2005, thèse : Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, Ecole Nationale vétérinaire

Toulouse, pag 14,15, 27.

60. D'après <http://blogue.passeportsante.net>.
61. Favier A. (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* 55 (1) : 9-16.
62. Papa Madièye Gueye 2007, thèse : Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge, Université Louis Pasteur-Strasbourg I, Institut Gilbert Laustriat, page 26.
63. Halliwell. B. (1999). How to characterize a biological antioxidant. *Free RadicRes Commun*, 9, 1-32.
64. Kahina Bouhadjra année 2011, mémoire : étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Algérie, Faculté des Sciences, pag 42-43.
65. Charles M. Benbrook, Ph. D,2005, Accroître la teneur en antioxydant des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques, Rapport sur l'état des connaissances, the Organic Center, pag 24.
66. Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). "Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?" *L'actualité chimique*, novembre-décembre 2003.
67. Huang D., OU B, and Prior R.L. (2005). "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6) : 1841-1856.
68. Pibiri M.C (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse doctorale. Polytechniques Fédérale de Lausanne.
69. Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
70. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol Interact*, 160 : 1–40 M-C. Martin, M. Seller, *Actifs et Additifs en cosmétologies*, Lavoisier, 1992, p 112.
71. Vansant G. (2004) Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.

-
72. Layachi Naima, 2013, thèse : l'effet combiné des vitamines c (acide ascorbique) et E (α -Tocophérol) sur la toxicité du Cadmium chez les rats Wistar, université Baji MokhtarAnnaba, Algérie, Faculté des sciences, pag 33.
 73. Guillard Carine, 2011, mémoire : Photo-vieillessement : photo- protection par application topique d'antioxydants, Université de Rennes 1, France, I.F.R de Sciences de la vie et de l'environnement, pag 36.
 74. Hadbaoui Zineb, 2007, mémoire : étude de l'activité antioxydante des fractions lipidique, protéiques et phénoliques des graines de sorgho local, Université Kasdi Merbah Ourgala, Algérie, Faculté des Sciences et Sciences de l'ingénieur, pag 48.
 75. Jean-Paul Curtay, Jean-Marc ROBIN, octobre 2000, intérêt des complexes antioxydants par, centre d'étude et de développement de la nutrithérapie, journal : Nutrithérapie info pag 1, 2, 3 ; volume 4.
 76. Céline Chaforan, 2010, thèse : Stabilité de micro constituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, France, pag 11, 19, 20.
 77. Nutra News, Science nutrition prévention et santé, avril 2005. Les caroténoïdes, des nutriments antioxydants fortement protecteurs. Pag11.
 78. Dacosta, Y. (2003) Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. Pag 317.
 79. Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicalesinternationales Paris, 1 - 405.
 80. Attou Amina, 2011, mémoire : Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, Algérie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, pag 23, 36.
 81. Djamila DJEMOUI, 2012, mémoire : Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie, Faculté des Sciences et de la Technologie et Sciences de la matière, pag 11.

-
82. Fatima Zohra Bouras et Houchi abdelbasset, 2013, mémoire : étude de l'activité antioxydante de la plante *Rumex Vesicarius.L*, Université Kasdi Marbah Oaurla, Algérie, Faculté des Sciences et Technologie et Sciences de la matière, pag 8, 27.
83. Schijlen, E.G.W.M., Ric de Vos, C.H., van Tunen, A.J. & Bovy, A.G. (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65(19), 2631-2648.
84. D'après <http://www.physagreg.fr>
85. N. boulenouar, A. marouf, A. cheriti (2011), phytopathologie fongique et métabolites secondaire, Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique Université de Bechar, Bechar 08000, Algérie
86. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N, Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, volume 17, p. 426-436.
87. Soxhlet, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Dingler's Polytech. J* 1879, 232, 461-465.
88. D'après <http://nathaliepirioudeslandes.wordpress.com>
89. D'après <http://web04.univ-lorraine.fr>
90. C. Judson King;(2002), *Separation Processes, Introduction*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, coll. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry,
91. G. Mahuzier ; (1978), *Méthodes de separation*, ed. Maçon.
92. National Institute of Standards and Technology; (1999), PC Version 1.7 of the IST/EPA/NIH Mass Spectral Library, The Perkin Elmer Corporation.
93. M. Stobiecki; (2000), Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides, *Phytochemistry* 54 (3), 237-256.
94. M. Arpino, A. Prevot, J. Serpinet, J. Tranchant, A. Vergnol, P. Witier ; (1995), *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, ed. Masson, Paris.
95. Degobert Paul, 1992, *Automobile et pollution*, Editions Technip, Paris, 186 pages.
96. Sanchez-Moreno C & Larrauri J A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Science and Technologie International*, 4: 391-399.

-
97. Sanchez-Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Science and Technologie International*, 8(3): 121-137.
 98. Prieto P., Pineda M & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, (269): 337-341.
 99. Hedi Mighri, Hafedh Hajlaoui, Ahmed Akrouf, Hanen Najjaa, Mohamed Neffati, (2010) (Mighri et al, 2010):, Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone.
 100. Matkowski A., Tasarz P. and Szypuła E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (11) : 321-330.
 101. Sun T & Ho C T. Antioxidant activities of buckwheat extracts. (2005). *Food Chemistry*, 90 :743–749. S.
 102. Unten L., Koketsu M & Kim M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agric. Food Chemistry*, 45 (6), P: 2009–2012.
 103. Martin, R. Andriantsitohaina, septembre 2002, Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, *Annales de cardiologie et d'angéiologie* 51 (2002) 304–315 pag 1.
 104. Schwarzacher SP, Hutchison S, Chou TM, Sun YP, Zhu BQ, Chatterjee K, Glantz SA, Deedwania PC, Parmley ww, Sudhir K, Mai 1998, Antioxidant diet preserves endothelium-dependent vasodilatation in resistance arteries of hypercholesterolemic rabbits exposed to environmental tobacco smoke. *J Cardiovasc Pharmacol* ; 31(5) :649-53.
 105. T L Yue, H Y Cheng, P G Lysko, P J McKenna, J L Gu, K A Lysko, L L Davis and G Feuerstein, octobre 1992, Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *Journal Pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 263 no. 1 92-98.
 106. G. Z. Feuerstein. R. Ruffolo JR, 1985, Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection, *Oxford Journals Medicine European Heart Journal Volume 16, Issue suppl F Pp. 38-42.*

-
107. Duchnowicz P., Broncel M., Podsędek A. and Koter-Michalak M. 2012. Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). *European Journal of Nutrition*, 51: 435–43.
 108. Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R. 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49: 963–975.
 109. Liu H., Zhang L. and Lu S. 2012. Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, 17: 4281–4291.
 110. Botta B., Menendez P., Zappia G., Lima R.A.D., Torge R. and Monache G.D. 2009. Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry*, 16: 3414–3468.
 111. M. Arpino, A. Prevot, J. Serpinet, J. Tranchant, A. Vergnol, P. Witier; (1995), *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, ed. Masson, Paris.
 112. Degobert Paul, 1992, *Automobile et pollution*, Editions Technip, Paris, 186 pages.
 113. Couteau C. *Cours de physiologie cutanée, Les effets du soleil sur la peau*. Dispensé à l'Université de Nantes en septembre 2010.
 114. Robert P. *Dermopharmacologie clinique*. Edisem Inc., 1985.
 115. Martini M.-C., Seiller M. *Actifs et additifs en cosmétologie*. Lavoisier, 3e édition. 2006
 116. Martini M.-C. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*. Lavoisier, 3e édition. 2011.
 117. Bel S. *Les produits solaires. Mémoires D.E.S.S. Cosmétologie*, Nantes, 1999-2000.
 118. D'après <http://www.laroche-posay.fr>
 119. Hmamouchi M., (2005). *Stratégie de conservation, de valorisation et de développement des plantes aromatiques et médicinales au Maroc*. Congrès International sur les Plantes Médicinales 16-19 Mars. Errachidia. p.
 120. El Yahyaoui et al - *International Journal of Innovation and Applied Studies* - ISSN 2028-9324 Vol. 12 No. 3 Aug. 2015, pp. 533-541.
 121. Mehdioui, R. ; Kahouadji, A. *Etude ethnobotanique auprès de population riveraine de la forêt d'Amsittène : cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira)*. *Bulletin de l'Institut Scientifique* 29 (2007) 11-20.

-
122. Dibong SD, Mpondo Mpondo E, Ngoy A, Kwin MF, Betti JL. 2011. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala. *J. Appl. Biosci*, 37 : 2496-2507.
 123. Ktotoé JR Douguon TV, Koudouvo K, Atègbo JM, Loko F, Akoègninou A, Aklikokou K, Dramane K, Gbeassor M. 2013. Ethnopharmacological survey on antihemorrhagic medicinal plants in south of Benin: *European Journal of Medicinal Plants*, 3(1): 40-51.
 124. Kahouadji M.S 1995. Contribution à une étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Maroc oriental. Thèse de 3ème Cycle Université Mohamed 1er, Faculté des sciences, Oujda Maroc, 205 P.
 125. Hmamouchi, M., 2001. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. Utilisation, Biologie, Ecologie, Pharmacologie, Toxicologie, Lexique. 2ème éd., 389 pp.
 126. Benkhniq, O. ; Zidane, Z. ; Fadli, M. ; Elyacoubi, H. ; Rochdi, A. ; Drouira A. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Machraa Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.* 53 (2010-2011) 191-216.
 127. El hafian, M. ; Benlamdini, N. ; Elyacoubi, H., Zidane, L. ; Rochdi, A. Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la vallée de Khenifra (Maroc). *International Journal of Applied Biosciences* 81 (2014) 7198-7213.
 128. Weniger, B., 1991. Interest and limitation of global ethnopharmacological survey. *Journal of Ethnopharmacology*. 32, 37-41.
 129. Anyinam C. 1995. Ecology and ethnomedicine. Exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Social Science and Medicine*, 4, 321-329.
 130. S. Maregesi, O. Ngassapa, L. Pieters, J. Vlietinck; Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases; *Journal of Ethnopharmacology* 113 (2007) 457-470.
 131. Bitsindou M, 1986. Enquête sur la phytothérapie traditionnelle à Kindamba et Odzala (Congo) et analyse de convergence d'usage des plantes médicinales en Afrique centrale. Mem. Doc (inéd). Univ. Libre de Bruxelles. 482 pp.
 132. Bigendako- Polygenis MJ & Lejoly, J, 1990. La pharmacopée traditionnelle au Burundi. Pesticides et médicaments en santé animale. *Pres. Univ. Namur*. Pp. 425-442.

-
133. Cunningham A.B. 1996. Peuples, parc et plantes. Recommandations pour les zones à usage multiples et alternatives de développement autour du parc national de Bwindi Impénétrable, Ouganda. Documents de travail Peuples et Plantes n°4. UNESCO, Paris, 66 p.
 134. Dextreit R., 1984. La cure végétale, Toutes les plantes pour se guérir, Vivre en harmonie, 3^{ème} ed, 118p
 135. Lahsissene, H. ; Kahouadji, A. ; Tijane, M. ; Hseini, S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la region de Zaer (Maroc Occidental). LEJEUNIA 186 (2009) URL: [http \\
popus.ulg.ac.be/0457-4184/index.php?id=701](http://popus.ulg.ac.be/0457-4184/index.php?id=701).
 136. Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi A., Zidane L. Etude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haute Moulouya, Maroc, journal of Applied Biosciences 78 (2014) 6771-6787.
 137. Benlamdini N., Elhafian M. ; Rochdi A., et Zidane L., 2014. Etude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haute Moulouya, Maroc. Journal of Applied Biosciences, 78 : 6771-6787.
 138. Vongsak, B., et al., Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of Moringa oleifera leaf extract by the appropriate extraction method. Industrial Crops and Products, 2013. 44 : p. 566-571.
 139. Nait Sidi Ahmed, A. (2012). Mise en place d'un procédé d'extraction et de pré purification de molécules bioactives à partir d'une culture énergétique « Salix miyabeana SX67 ». Maitrise en génie chimique, Université de Sherbrooke, Canada.
 140. Badiaga M. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat 2011, P 74.
 141. Yam M.F, Ang L.F, Ameer O.Z, Salman I.M, Aziz H.A, Asmawi M.Z. Anti-inflammatory and analgesic effects of Elephantopus tomentosus ethanolic extract. Journal of acupuncture and meridian studies. 2009 ; 280-287.
 142. Awor et Samseny R-R. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante traditionnellement utilisée comme poison d'épreuve au Gabon : le Strychnos Icaja Baillon (Mbundu), Loganiacée. Thèse, Université de Bamako, Faculté de Médecine, de Pharmacie Et d'Odonto-Stomatologie, Mali.2003.

-
143. Singleton V. L. and Rossi J. A., 1965. Colorimetry of total phenols with phospho molybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144- 158.
 144. Arnous, A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655–665.
 145. Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P., 1994 – Standardization d'un extrait de propolis et identification des principaux constituents, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, p. 462- 468.
 146. Paris R. et Moyses M. (1965). *Précis de matière médicale*. Edit. Masson. Paris. 412 p.
 147. Mahmoudi S, Khali M, et Mahmoudi N. (2013) Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. 9 : 35-40
 148. Galvez C J, Martin-Cordero P, Houghton A M. (2005) Antioxidant Activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1927-1933.
 149. Mueller Harvey. (2006). Unraveling the conundrum of tannins and health. *J. Sci. Food Agric.* 86(13), 2010-2037.
 150. Malik F., S. Hussain, A. Sadiq, G. Parveen, A. Wajid, S. Shafat, R. A. Channa, R. Mahmood, H. Riaz, M. Ismail & F. Yasin Raja. Phyto-chemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Mentha arvensis* in animals. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012 ; 6 (9) :613-619.
 151. Sujana, P., Sridhar, T.M., Josthna, P., Naidu, C.V. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Mentha piperita* L. (Peppermint) – an important multipurpose medicinal plant. *Am. J. PlantSci.* 2013 ; 4 :77–83.
 152. N Akhtar, Ihsan-ul-Haq, Bushra Mirza. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian Journal*. 2015. <https://www.sciencedirect.com>.
 153. D. Ameni, A. Baghiani, S. Boumerfeg, S. Dahamna, S. Khennouf, M. H. Abou Zarga, L. Arrar. Phytochemical profiles, antioxidant capacity and protective effect against aaph-induced mouse erythrocyte damage by daphne gnidium shoots extracts; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; Vol 7, Issue 11, 2015.

-
154. Bouyahya A., Abrini J., EL-Baabou A., Bakri Y. et Bakri N.(2016). Determenation of phenol content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from North-West of Marocco *Jornal of Plant Pathology and Microbiology*,7: 1-4.
 155. Benchikh Y., Louailache H., George B. et Merlin A.(2014). Changes in bioactives phytochemical content and in vitro antioxydant activity of carob (*Ceratonia Siliqua L.*) as influenced by fruit ripening . *Industrial Corps and Products*, 60: 298-303.
 156. Rodriguez-MeizosoI., Marin F.R., Herrero M., Senorans F.J., Reglero G., Cifeuentes A. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*.41: 1560-1565.
 157. Skerget M., Katnik P., Hadolin M., Hros A.R., Simonic et Knez Z. (2005). Phenols, proanthoyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidants activites. *Food chemistry*. 89 :191-198.
 158. Capecka E., Mareczek A., Leja M. (2005). Antioxydant activity of fresh and dry herbs of omelamiaceae species. *Food chemistry*.9 :223-226.
 159. Macheix E., Hano C., Lamblin F. (2007). Les lignanesphytoestrogenes du lin sont lis des bienfaiteurs méconnus, .5 .121-128.
 160. Tsai P.J., Tsai T.H. et Ho, S.H. (2007). In vitro inhibitory effects of rosmmary extract on growth and glycosyltransferase activity of *Streptococcus sotorinus*. *Food Chemistry*.
 161. Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M. et Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331 : 372-379.
 162. Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Butler J., Halliwell B., 1995. Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethyl peroxy radicals, P: 187 - 190.
 163. Bruneton J., 1993. *Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales*. Paris, France : Eds Lavoisier.
 164. C. Nejjar, M. Arharbi, MT. Chentir, R. Boujnah, *Journal of hypertenssion* 31 (1), 49-62, 2013.
 165. MCGREGOR, D. D. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.*, v.177, n.1, p.21-30, 1965.

-
166. Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB, Lister C, Matthews D, MacLean MR, Lean ME, Duthie GG, Crozier A (2000), Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines., *J Agric Food Chem.* 2000 Feb;48(2):220-30.
167. Matkowski A., Tasarz P. and Szypuła E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (11) : 321-330.
168. H. Mighri, H. Hajlaoui, A. Akrouf, H. Najjaa and M. Neffati, (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone.
169. Gulcin, I., Huyut, Z., Elmastas, M. et Aboul-Enein, HY. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* 3 : 43-53.
170. Popovici, C., Saykova, I. et Tytkowski, B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4 : 25-39.
171. Sun, T., Powers, J.R. et Tang, J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of asparagus broccoli and their juices. *Food Chemistry* 105 : 101-106.
172. Prieto P., Pineda M & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, (269): 337-341.
173. Lessage-Messen L., Navarro D, Maunier S., Sigoilot J C., Lorquin J., Delattre M., Simon J L., Asher M & Labat M. (2001). Simple phenolic content in olive oil residue as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75 :501-507.
174. Mc Donald S., Prenzler P D., Antolovich M & Robards K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73 :73-84.
175. Unten L., Koketsu M & Kim M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agric. Food Chemistry*, 45 (6), P : 2009–2012.
176. Frankel E N & Meyer A S. (2000). The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 : 1925-1940.

-
177. Chokri A, El Abida K, Zegzouti YF, Ben Cheikh R (2012), Endothelium-dependent vascular relaxation induced by Globularia alypum extract is mediated by EDHF in perfused rat mesenteric arterial bed. *Can J Physiol Pharmacol*. May ;90(5) :607-16.
178. Namiranian K, et al.(2001) Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rats: roles of opioid and nitric oxide systems.
179. Rachid Ben Cheikh, Jean-Claude Feray, Abdelillah Alaoui, and Bertrand Crozatier, Thromboxane A (2002), in Vasomotor Effects of Phenylephrine, Acetylcholine, and Bradykinin in Rat Mesenteric Bed. *J Cardiovasc Pharmacol*, Vol. 40, No. 2:255–264.
180. FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, v.14, n.7, p.473-478, 2007.
181. T L Yue, H Y Cheng, P G Lysko, P J McKenna, R Feuerstein, J L Gu, K A Lysko, L L Davis and G Feuerstein (1992), Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger *the journal of pharmacology* :192-98.
182. G. Z. Feuerstein and R. R. Ruffolo JR (1995), Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection *European Heart Journal* :38-42
183. Latifou Lagnika" Etude phytochimique et activite biologique de substances naturelles isolees de plantes beninoises" universite louis pasteur strasbourg faculte de pharmacie (2005)
184. D.R. Browning, "méthodes spectroscopique", masson édition, 120, Boulevard saintgermain, parisVIer (1974), p13, 34, 75.
185. R. Freeman " Molecular Structure by Two-Dimensional NMR spectroscopy " *Journal of Molecular Structure*, 173 (1988) 17-30.
186. Mabry T. J., (1969), In "Perspective in Phytochemistry". Ed. Harborne J. B., Academic Press. London.
187. Jurd L. (1962). In " The Chemistry of Flavonoid compounds ". Ed. Geissman, T. A., Pergamon Press, 107 p., New York.
188. Bae, I.K., Ham, H.M., Jeong, M.H., Kim, D.H., Kim, H.J., 2015. Simultaneous determination of 15 phenolic compounds and caffeine in teas and mate using RP-HPLC/UV detection: Method development and optimization of extraction process. *Food Chem.* 172, 469– 475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.050>.

-
189. Kassi, B.A.B., 2013. Contribution à l'étude phytochimique des amandes de *Mangifera Indica* et des Feuilles, écorces, graines de *Santaloides Afzelii*. Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan Côte d'Ivoire.
 190. Michel, T., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) (PhD Thesis). Université d'Orléans.
 191. Manfred Hesse, Herbert Meier et Bernd Zeeh "Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique" MASSON, Paris, 1997.
 192. Abe, E., Delye, S.G., Alvarez, J.C., 2010. Liquid-liquid extraction: theory, applications and difficulties. *Annales de Toxicologie Analytique.*, 22 (2), pp 51-59.
 193. J. Ribéreau-Gayon et E. Peynaud, Les composés phénoliques des végétaux, *Traité d'œnologie*, Paris : Édition Dunod, (1968) 254 p.
 194. Mabry T.J., Trlorkhom K.R. K, Thonos B. (1970) - The systematic identification of Flavonoids. *Springer Verlag, New York*, 35-261.
 195. Yanishlieva, N. V., and Marinova, E. M. (2001). Stabilization of edible oils with natural antioxidants. *European Journal of lipid Science and Technology*, 103, 752- 767.
 196. Amarowicz R., Shahidi, F., A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. *Food Res. Intern.*, 1995, 29, 71–76.

