

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2018

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

GUERIANI Rebiha & BOUDRAF Ouardia

Thème

**Etude phytochimique et effets antifongique de
*Daphne gnidium L.***

Soutenu publiquement le : 28/06 /2018

Devant le jury composé de :

<i>Mme. BOUTELDJA. R</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme. DJOUAHRA. Dj</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme. BENMAIL. S</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Co-Promotrice</i>
<i>Mme. AITMIMOUNE. N</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2017/2018

REMERCIEMENT

*Tout d'abord, nous tenons à remercier notre Dieu
le tout puissant, de ne avoir donné le courage et la Patient
jusqu'à l'achèvement de ce travail*

*Nous remercions en particulier notre promotrice
Madame DJOUAHRA Djamilia pour son encadrement très
efficace dans la conduite de cette petite recherche, pour ses
encouragement ses conseils, sa confiance, sa patience*

*Nous tenons aussi à remercier très chaleureusement notre Co-promotrice
Melle BENSMAIL S, pour sa gentillesse et sa disponibilité,
elle nous a aidé beaucoup dans évaluation de notre travail.*

*Je tiens à exprimer ma grandeconsidération et
mes sentiment de reconnaissance à Mme BOUTELLOUJA R,*

Qui me fait l'honneur de présider le jury

*Je voudrais exprimer également ma sincère reconnaissance au
Mme AIT MIMOUNNE. N, qui me fait l'honneur d'accepter
d'examiner mon travail*

*Nous ne n'oublierons pas de remercier Melle MAMERI AMEL
qui nous aidé beaucoup dans la réalisation de ce travail.*

*Notre gratitude et notre reconnaissance vont particulièrement
à tous les membres du laboratoire de Biochimie au niveau de
l'Université AKLI MOHAND OULHADJ, BOUIRA*

*Enfin, nous remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin
pour la réalisation de ce travail.*

MERCI

Dédicace

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

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

*Aucun mot, aucun dédicace ne serait exprimer mon
respect, ma considération et l'amour éternel pour les
sacrifices que vous avez déployés pour mon instruction et
mon bien être dans les meilleurs conditions*

*A mes charmantes sœurs Fatma , Fatiha, Malika, Baya
et Salima à mon unique frère Ahmed et toute ma famille.*

*A ma deuxième famille Guellil, à mon père Omar et ma
mère Aldja rabi yarhamha.*

*A mon marie Rachid qui sans leur encouragement ce
travail n'aura jamais vu le jour.*

A tous mes amies Khalissa, Sabah, Siham et Djedjega

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime.

Rebiha



DÉDICACE

A celui qui ne nattera jamais, tu ma quitté son te connaitre, son savoir dire papa, son sentir ta tendresse .Malgré tout ça j'ai grandi avec tant d'amour, tant de courage. Si ceci m'a arrivé toujours je dis HAMDOULLAH.C'est à toi que je dédie ce modeste travail que dieu t'accueille dans son vaste paradis.

Si je t'ai perdu, Ma perle maman t'a accomplis ce manque avec tant de tendresse. Tu es été et tu resteras le vrai amour.

A mes chers frères Fateh et Mohamed, qui ont remplacé l'absence de mon père, merci pour tout ce que vous avez faits et tout ce que vous faites toujours.

A mes sœurs : Hassina, Fatiha, Baya et son mari.

A ma belle sœur Tiziri et mes coquettes nièce Rimas et sirine.

*A ma chère grande mère que **Dieu** tu protège.*

A toute la famille BOUDRAF ET NADIR.

A mes chères amies: Syla, Dehia, Zineb, Meriam,Mamal.

(M W A Z I S).

Ouardia

Liste d'abréviation

ATP : Adénosine triphosphate.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CYP450 : Cytochrome 450.

DL50 : La dose létale 50

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

g : gramme.

GABA : Acide aminobutyrique.

HCl : Acide chlorhydrique.

HPLC ; Chromatographie liquide haute performance

H₃PM₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique.

H₃PM₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

Ig : Immunoglobuline.

IgE : Immunoglobuline E.

IgG : Immunoglobuline G

ml : millilitre.

Mo₈O₂₃ : molybdène.

Na₂CO₃ : carbonate de sodium.

nm : nanomètre.

PDA : Potato dextrose agar.

Phe : Phénylalanine.

RMN :

UV : Ultraviolet.

W₈O₂₃ : Oxydes bleus de tungstène.

µg : microgramme.

% : Pourcentage.

Liste des tableaux

Tableau 01 : Taxonomie de *Daphne gnidium* L.

Tableau 02 : Les principales classes de composés phénoliques

Tableau 03 : Principaux acides hydroxybenzoïques.

Tableau 04 : Principaux acides hydroxycinnamiques.

Tableau 05 : Les principaux types de coumarine.

Tableau 06 : Effet des principales mycotoxines sur l'homme et mécanisme d'action cellulaire et moléculaire identifiés

Tableau 07 : Systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des alcaloïdes de la plante par CCM.

Tableau 08: Systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des polyphénols de la par CCM

Tableau 09: Effet des principales mycotoxines sur l'homme et mécanisme d'action cellulaire et moléculaire identifiés

Tableau 10 : Résultats des tests phytochimiques de la poudre des feuilles de *Daphne gnidium* L.

Tableau 11 : Rendement de l'extrait en composés phénoliques

Tableau 12: Pourcentage d'inhibition de mycélium de moisissures après traitement par les extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

Liste des figures

Figure 01 : Les feuilles et les fleurs de *Daphne gnidium* L.

Figure 02 : Les fruits de *Daphne gnidium* L.

Figure 03 : Carte de répartition géographique des Thymélacées

Figure 04 : Structure chimique des polyphénols

Figure 05 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes

Figure 06 : Structure de quelques alcaloïdes.

Figure 07 : Schéma générale des différentes étapes du travail

Figure 08 : Le broyat de *Daphne gnidium* L.

Figure 09 : Les étapes d'exactions des alcaloïdes

Figure 10 : Les étapes d'extraction des polyphénols totaux

Figure 11 : Les étapes de dosage des polyphénols totaux

Figure 12 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Figure 13 : Séparation des polyphénols par CCM

Figure 14 : Séparation des alcaloïdes par CCM

Figure 15 : Aspect des cultures du champignon *Aspergillus niger* en présence des extraits alcaloïdique et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

Figure 16: Aspect des cultures du champignon *Aspergillus fumigatus* en présence des extraits alcaloïdique et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

Figure 17 : Aspect des cultures du champignon *Aspergillus flavus* en présence des extraits alcaloïdique et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

Table de matière

Remerciement

Dédicaces

Liste d'abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
Chapitre I : <i>Daphne gnidium</i> L.	3
I.1. <i>Daphne gnidium</i> L.....	3
I.2. Taxonomie	3
I.3. Description botanique de la plante.....	4
I.4. Distribution géographique	4
I.5. Composition chimique	5
I.6. Utilisation et propriétés biologiques	6
I.7. Toxicité du <i>Daphne gnidium</i> L.....	6
Chapitre II : Les métabolite secondaire	7
II.1. Généralité.....	7
II.2. Les composés phénoliques	7
II.2.1. Définition et structure chimique	7
II.2.2. Biosynthèse des composés phénoliques	8
II.2.2.1. La voie de Shikimate :	8
II.2.2.2. La voie de phenylpropanoide :	8
II.2.3. Classification des polyphénols	8
II.2.3.1. Les acides phénoliques	9
II.2.3.2. Les flavonoïdes	10
II.2.3.3. Les coumarines	10
II.2.3.4. Les tannins	11

Table de matière

II.2.4. Rôles, intérêt et propriétés des polyphénols	11
II.3. Alcaloïdes	12
II.3.1. Définition et structure	12
II.3.2. Classification des alcaloïdes	12
II.3.3. Structure des alcaloïdes	13
II.3.4. Propriétés biologiques des alcaloïdes	13
Chapitre III : les champignons	14
III.1. Les champignons	14
III.2. Classification	14
III.2.1. Les levures.....	14
III.2.2. Les moisissures	15
III.2.2.1 .Le genre <i>Aspergillus</i>	15
III.3. L'effet des champignons sur la sante des êtres humains.....	16
IV : Matériels et méthodes.....	18
IV.1. Matériel	18
IV.1.1. Matériel biologique	18
IV.1.2. Matériel non biologique	18
IV.2. Méthodes d'étude	18
IV.2.1. Séchage des feuilles	20
IV.2.2. Broyage des feuilles séchées	20
IV.2.3. Tests phytochimiques (screening phytochimique).....	20
IV.2.3.1. Préparation de l'infusé à 5%	21
IV.2.3.2. Identification des tanins totaux	21
IV.2.3.3. Identification des tanins galliques.....	21
IV.2.3.4. Identification des alcaloïdes	21
IV.2.3.5. Identification des saponosides	21
IV.2.3.6. Identification des coumarines	21

Table de matière

IV.2.3.7. Identification des quinones libres	22
IV.2.3.8. Identification de l'amidon	22
IV.2.3.9. Identification de glucosides	22
IV.2.3.10. Identification des mucilages.....	22
IV.2.3.11. Identification des irridoïdes	22
IV.3. Méthodes d'extraction des molécules bioactives.....	22
IV.3.1. Extraction des alcaloïdes.....	23
IV.3.2. Extraction des polyphénols	25
IV.4.2. Dosage des polyphénols totaux.....	27
IV.4.2.1. Principe	27
IV.5. Analyse qualitative des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de <i>Daphne gnidium</i>	29
IV.6. Activité antifongique des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de <i>Daphne gnidium</i>	31
Chapitre V : Résultats et discussion	33
V.1. Screening phytochimique	33
V.2. Extraction des composés phénoliques et alcaloïdiques	34
V.2.1. Calcul du Rendement d'extraction de l'extrait méthanolique.....	34
V.2.2. Calcul du Rendement d'extraction de l'extrait chloroformique	34
V.3. Dosage des polyphénols totaux	35
V. 4. Séparation des polyphénols et des alcaloïdes par CCM.....	36
V. 4.1. Les polyphénols.....	36
V. 4.1. Les alcaloïdes	36
V.5. Activité antifongique des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de la plante <i>Daphne gnidium L.</i>	38
Conclusion.....	42

Références bibliographiques

Annexes

Table de matière

Résumés

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25 à 30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont des dérivés de produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) (**Mohammedi, 2013**).

En dépit de cela, dans les dernières décennies, principalement en raison de l'avancée de la chimie synthétique, la recherche sur les produits naturels dans l'industrie pharmaceutique a connu un lent déclin.

Toutefois, des données récentes de l'industrie pharmaceutique montrent que, pour certaines maladies complexes, les produits naturels représentent toujours une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques, car elles représentent des structures privilégiées choisies par les mécanismes d'évolution sur une période de millions d'années (**Touafek, 2010**).

L'Algérie est considérée parmi les pays les plus connus pour leur diversité taxonomique vu sa position biogéographique privilégiée et son étendu entre la Méditerranée et l'Afrique sub-saharienne. La flore algérienne dispose d'une grande diversité à laquelle s'ajoute une tradition d'utilisation des plantes. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de cette biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologique (**Beddou, 2015**).

C'est dans ce cadre que rentre notre travail qui porte sur une plante médicinale de la flore algérienne *Daphne gnidium* L qui est récoltée dans la région de Bouira. Cette plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides et la sclérose en plaque (**Mahmoud DIF et al., 2015**).

L'objectif de cette étude est d'évaluation l'activité antifongique des extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de cette plante.

L'étude comprend :

- Des screening phytochimique pour détecter la présence de différentes substances naturelles bioactives.
- Application des méthodes conventionnelles (macération) pour l'extraction des alcaloïdes et des polyphénols.
- Analyse qualitative et quantitative de nos extraits.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des extraits obtenus.
- Notre travail répartie sur trois parties : synthèse bibliographiques, matériels et méthodes et résultats discussion.

I.1. *Daphne gnidium* L

Le Garou ou *Daphne gnidium* L. est un arbuste de la famille des Thymelaeacées (Mahmoud DIF *et al.*, 2015). Il se trouve communément dans les maquis méditerranéens, en particulier dans les régions montagneuses du Tell Nord-Africain de Tunis et au Maroc. On le retrouve souvent sur les talus escarpés bordant les oueds. Les parties les plus utilisées de cette plante sont les feuilles, les fruits et l'écorce (El Fennouni, 2012).

Noms vernaculaires

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

Nom anglais : Flax-leaved Daphne.

Nom arabe : Lazzaz.

I.2. Taxonomie

Tableau 01 : Taxonomie de *Daphne gnidium* L. Mohammedi (2013)

Régne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Sous –Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Ordre	Malvales
Famille	Thymelaeaceae
Genre	<i>Daphne</i>
Espèce	<i>gnidium</i> L.

I.3. Description botanique de la plante

Le Garou est un arbrisseau vivace, de 60 cm à 2 m de haut, à tige dressée, ramifiée, portant des feuilles lancéolées, persistantes ou caduques, glabres, subcoriaces, linéaires ou ovales-oblongues, aiguës, glanduleuses dessous qui se terminent par une petite pointe. Ses rameaux sont minces très feuillés et pubérulents au sommet (Ladhari *et al.*, 2011 ; EL Fennouni, 2012). C'est un arbuste des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, existe dans tout le Tell de l'Algérie (Mohammedi, 2013).



Figure 01 : Les feuilles et les fleurs de *Daphne gnidium* L. (El Fennouni, 2012).

Les fleurs blanches petites et tubulaires, sont pédonculées, poilues sur le calice, souvent odorantes et sont groupées en panicules terminales (El Fennouni, 2012). La floraison va d'octobre à mars, c'est une plante entomogame. Le fruit est une drupe ovoïde, rouge orangé (Mohammedi, 2013).



Figure 02 : Les fruits de *Daphne gnidium* L. (El Fennouni, 2012).

I.4. Distribution géographique

Les membres de la famille des Thyméléacées sont répandus surtout dans l'hémisphère sud et dans les climats tropicaux et tempérés voire dans les zones arides pour quelques espèces et sont absents seulement dans les régions aux climats froids.

Les Thyméléacées représentent la famille la plus cosmopolite de l'ordre des malvales. Nous la rencontrons dans l'ancien monde, en Afrique du sud, en Australie et en Europe et elle est abondante en région méditerranéenne (Ouazlifi, 2015).



Figure 03 : Répartition géographique des Thymélacées d'après Heywood (1996).

Parmi les principaux genres de Thymélacées, nous avons le genre *Daphne* avec environ 70 espèces. Ce sont des arbustes ou arbrisseaux connus par leurs fleurs odorantes et leurs baies toxiques (**Ouazlifi, 2015**).

Les trois *Daphne* les plus répandues sont :

1/*Daphne mezereum* (L) (Bois gentil).

2/*Daphne laureola* (L) (La lauréole).

3/*Daphne gnidium* (L) (Le garou) (**Ramdani et al., 2015**).

L'espèce qui a fait l'objectif de cette étude est *Daphne gnidium* L. qui se présente communément en région méditerranéenne, Corse comprise. Assez commune dans le littoral atlantique (Gironde, Charente, Vendée). En plus dans l'étage méditerranéen et collinéen atlantique jusqu'à 800m, Circum méditerranéenne et en Afrique du nord (Algérie, Tunisie, Maroc) (**Ouazlifi, 2015**).

I.5. Composition chimique

Le *Daphne gnidium* L. contient:

- ❖ Des coumarines (Daphnéline, daphnine, acétylimbelliférone, daphnorétine).
- ❖ Des flavonoïdes (lutéolin-3,7-di-O-glucosylrutéoline, orientine, isoorientine, quercétine, apigénine-7-O-glucoside, genkwanine, 5-O-b-D-primeverosyl genkwanine, 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavanol).

Les graines et les écorces de différentes espèces de *Daphne* renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines) (Ferrari, 2002 ; EL Fennouni, 2012).

I.6. Utilisation et propriétés biologiques

Anciennement, l'écorce du *Daphne gnidium* L. était utilisée sous forme de pommade aux propriétés épispastiques.

Les feuilles, séchées et pulvérisées, sont associées au henné, dans le traitement des cheveux (croissance, assouplissement et dégraissage) (EL Fennouni, 2012).

- ✓ En phytothérapie, la plante est indiquée dans le traitement des leucémies, des tumeurs solides et la sclérose en plaque (Mahmoud DIF *et al.*, 2015).
- ✓ Dans la pharmacopée traditionnelle, il était utilisé pour ses propriétés antiseptiques, insecticides, dépuratives, cicatrisantes, sudorifiques et abortives. Le Garou possède des effets cytotoxique, antioxydant et antimicrobien (Ladhari *et al.*, 2011).

I.7. Toxicité du *Daphne gnidium* L

Toutes les parties de la plante sont toxiques par leurs feuilles et leurs fruits. Le contact de la sève avec la peau peut causer chez certaines personnes des dermatites.

L'ingestion des fruits déclenche une ulcération du tube digestif, on observe une violente inflammation de la bouche, avec tuméfaction des lèvres et de la langue, ptyalisme, vomissements. Secondairement s'installe une diarrhée souvent hémorragique avec coliques. Enfin, dans les cas graves, on note l'apparition de signes neurologiques : une ataxie avec convulsions, céphalées et vertiges.

Dans les cas plus graves on assiste à un œdème du poumon, une néphrite et diminution du rythme cardiaque, jusqu'au point de causer la mort (Ferrari, 2002 ; EL Fennouni, 2012).

II.1. Généralités

De très nombreuses plantes médicinales, tinctoriales ou aromatiques contiennent des métabolites qui leur sont très spécifiques. Dans la mesure où ces molécules ne sont retrouvées que chez quelques espèces uniquement, nous constatons que ces dernières ne pouvaient avoir aucun rôle important en comparaison à des métabolites universellement représentés comme les glucides, les protéines, les lipides ou les acides nucléiques et dont les fonctions biologiques commençaient déjà à être solidement établies (**Donatien, 2009 ; Attou , 2011**).

Les métabolites secondaires sont bio-synthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement. Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont : les alcaloïdes et les composés phénoliques (**Alilou, 2012**).

II.2. Les composés phénoliques

II.2.1. Définition et structure chimique

Les composés phénoliques se caractérisent par la présence d'un cycle aromatique ou plusieurs portants des groupements hydroxyles libres ou engagés avec les glucides (**Beddou, 2015**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) (**Clément, 2009**) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits. Les composés phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, et antimicrobiens (**Herzi, 2013**).

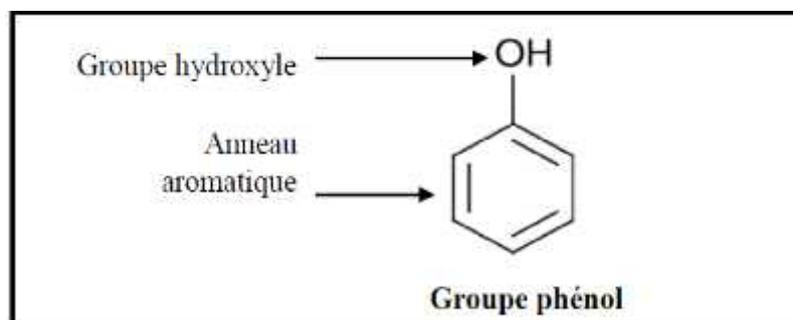


Figure 04 : Structure chimique des polyphénols

II.2.2. Biosynthèse de composés phénoliques

II.2.2.1. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde.

II.2.2.2. La voie de phénylpropanoïde

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Michel, 2011 ; Remila, 2015).

II.2.3. Classification des polyphénols

Nous distinguons différentes classes tels que les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide ferulique), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines.

Tableau 02 : les principales classes de composés phénoliques (Berreghioua, 2016)

Structure	Classe
C6	Phénols simples
C6-C1	Acides phénoliques et composés dérivés
C6-C2	Acétophénonnes et acides phénylacétiques
C6-C3	Acides cinnamiques, coumarines, isocoumarines, chromones
C15	Flavanols, flavonones, anthocyanines et anthocyanidines
C30	Biflavonyles

C6–C1–C6, C6–C1–C6	Benzophénones,xanthones et stilbéne
C6, C10, C14	Quinones
C18	Bétacyanines
Lignanes, neolignanes	Dimères ou oligomères
Lignine	Polymères
Tanins	Condensé et hydrolysable

II.2.3.1. Les acides phénoliques

Ces composés dérivent de deux sous-groupes distingués : les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide chlorogénique et les acides hydroxbenzoïques, mais les plus répandus sont l'acide salicylique et l'acide gallique (Ghnimi, 2015). Ils sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales, ainsi que chez toutes les céréales. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotiques, comme antioxydants de chélation et anti-inflammatoires ainsi que non toxiques (Remila, 2015).

Tableau 03 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Donatien, 2009 ; Beddou, 2015)

	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentsique

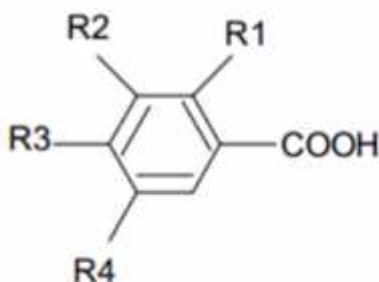
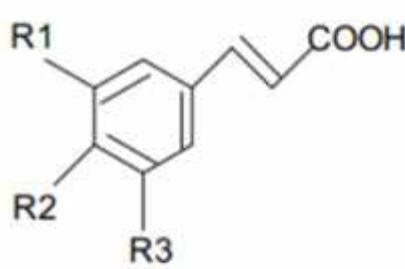


Tableau 04 : Principaux acides hydroxycinnamiques. (Donatien, 2009 ; Beddou, 2015)

	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

II.2.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles issues de plantes, présentes dans tout le règne végétal. Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (Touafek, 2010 ; Alillou, 2012). Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV, ce qui explique une grande partie de leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire et des colorants (Chibani, 2013).

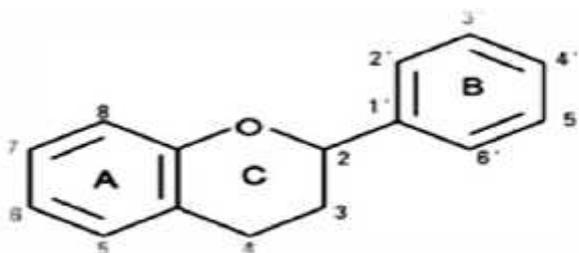


Figure 05 : Squelette moléculaire de base des flavonoïdes (Morel, 2011 ; Dima, 2013)

II.2.3.3. Les coumarines

Les coumarines sont issues de la cyclisation du résidu C3 de dérivés du cinnamate. Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques. Ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (exemple : la scopolétine qui s'accumule dans le tabac au cours de la réaction hypersensible) (Touafek, 2010). La coumarine est une molécule aromatique (au sens olfactif). Elles sont présentes sous forme glycoconjuguée chez

certaines graminées (exemple : la flouve odorante) mais c'est lorsque les tissus sont endommagés par la coupe que les glycosidases libèrent la coumarine libre à l'origine de l'odeur de foin coupé. La coumarine est utilisée dans la composition de nombreux parfums ainsi que pour aromatiser des alcools.

Tableau 05 : Les principaux types de coumarine (Bouderdara, 2013)

	R1	R2	R3
Ombelliférone	H	OH	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH3	OH	H
Herniarine	H	OCH3	H
Fraxétol	OCH3	OH	OH

II.2.3.4. Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques qui ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines (Messai, 2011). Deux groupes de tanins différents aussi bien par leur structure que par leur origine biogénétique sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Akroum, 2006).

II.2.4. Rôles, intérêts et propriétés des polyphénols

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux. Ils peuvent en effet intervenir:

- ✓ Dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites).
- ✓ Dans les interactions de plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV), soit

directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux.

- ✓ Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualité nutritionnelle.) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules) et des produits qui en dérivent par transformation.
- ✓ Dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentent) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.
- ✓ Dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Djabali, 2012**).

II.3. Alcaloïdes

II.3.1. Définition et structure

Les alcaloïdes sont des molécules hétérocycliques azotées à structure souvent complexe et dont l'activité physiologique et pharmacologique est souvent marquée (**Benkiki, 2006 ; Touafek, 2010 ; Kalla, 2012**). Ce sont des composés basiques qui s'extraient soit dans l'eau acide soit dans des solvants comme le chloroforme après alcalinisation (**Attou, 2011**). Généralement, ce sont des dérivés d'acides aminés (tryptophane, l'ornithine, lysine). Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés.

II.3.2. Classification des alcaloïdes

En fonction de leurs noyaux hétérocycliques on distingue généralement :

- **Les alcaloïdes vrais**, représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes se trouvent soit sous forme libre soit sous forme de sel, N- oxyde présentent au moins un hétérocycle : exemple la strychnine dérivée du tryptophane (**Attou, 2011 ; Badiaga, 2011**).
- **Les proto-alcaloïdes**, qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine).

- Les **pseudo-alcaloïdes**, ressemble à la première classe mais ne dérivent pas d'acides aminés (exemple : la caféine) (Badiaga, 2011).

II.3.3. Structure des alcaloïdes

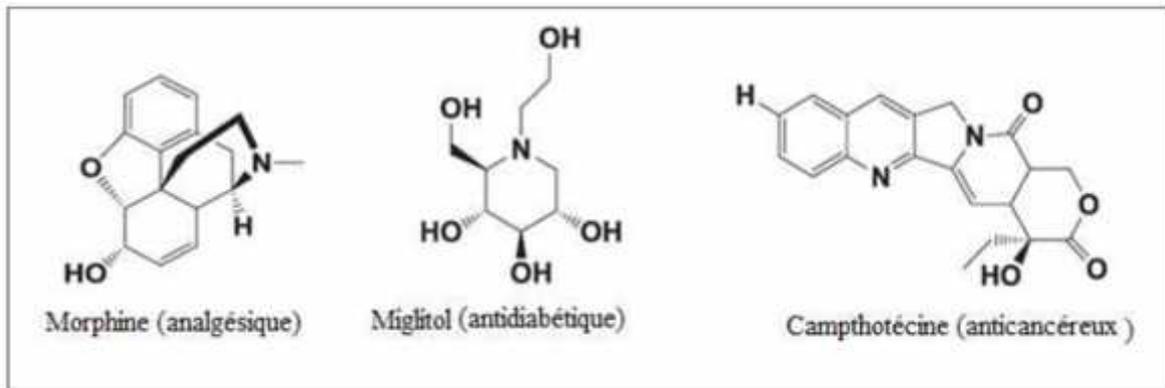


Figure 06: Structure de quelques alcaloïdes (Berregioua, 2016)

II.3.4. Propriétés biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes exercent généralement leurs activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'homme. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acetylcholine, epinephrine, norepinephrine, acide aminobutyrique (GABA), dopamine et la serotonine. Les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques : analgésique (cocaine), anticholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (reserpine), antitussive (codeine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caffeine), diurétique, anesthésiant local (cocaine), (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (ephedrine), plusieurs alcaloïdes servent de model pour la synthèse danalogues avec des propriétés meilleures (Benkiki, 2006).

III.1. Les champignons

Les microorganismes sont très largement répartis dans notre environnement puisqu'ils peuvent occuper plus ou moins sélectivement la terre, l'eau, l'air. (Denis, 1996 ; Hencké, 2000).

Les champignons sont des microorganismes filamenteux, dont l'élément structural est l'hyphes, plusieurs hyphes formant le mycélium ou thalle. (Briki et zitouni, 2013 ; Behnas et Benayache, 2015). Les champignons sont des eucaryotes possédant une paroi constituée de chitine qui est un polysaccharide (Behnas et Benayache, 2015).

III.2. Classification

Le terme de "Champignons" regroupe principalement : les levures, les champignons filamenteux (communément appelés moisissures) et les champignons supérieurs (ou champignons comestibles) (Denis, 1996).

III.2.1. Les levures

Ce sont des champignons microscopiques unicellulaires, eucaryotes non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (l'énergie se produit à partir de la dégradation de substances organiques en transformant les sucres en alcool et en gaz carbonique) (Hencké, 2000).

Les levures présentent sous plusieurs formes mais les formes les plus répandues sont la forme sphérique, ovoïdes, globuleuse, cylindrique (Rezki-bekki, 2014).

III.2.2. Les moisissures

Ce sont des champignons filamenteux (filaments multicellulaires, appelés hyphes), hétérotrophes, uni ou pluricellulaires qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme (Nguyen Minh Tri, 2007 ; Salimi, 2011).

Les moisissures sont des champignons microscopiques ne peuvent pas se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement adaptés à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et

physiologiques ; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Laib, 2011).

Les aliments sont généralement des milieux très favorables pour le développement de plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* qui sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques. Ils se reproduisent grâce à des spores, cette dernière issue soit d'une reproduction sexuée ou de multiplication asexuée (Nguyen Minh Tri, 2007 ; Salimi, 2011).

III.2.2.1. Le genre *Aspergillus*

L'*Aspergillus* est une espèce de champignon, constitué de filaments, présent dans les moisissures. L'*Aspergillus* se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et la composition en décomposition. Leurs spores sont présentes dans l'air et la poussière, et peuvent être ingérés en consommant des fruits. Il existe environ 180 espèces d'*Aspergillus*, qui peuvent être nocifs pour l'être humain, en causant des mycoses, ou l'aspergillose, une infestation des voies respiratoires, potentiellement mortelle (Bougherara et Aliani, 2017).

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif). (Denis, 1996 ; Belmessikh, 2011 ; OUIS, 2015 ; Bougherara et Aliani, 2017).

Les principales espèces d'*Aspergillus* : *Aspergillus. niger*, *Aspergillus. flavus*, *Aspergillus. fumigatus*, *Aspergillus. Nidulan*.

- ✓ *Aspergillus fumigatus* : considéré et permet les principaux agents pathogènes de champignons filamenteux de l'homme (Belmessikh, 2011).
- ✓ *Aspergillus flavus* : est la principale espèce productrice d'aflatoxines (uniquement du groupe B). *A. parasiticus* et *A. nomius* produisent en plus des aflatoxines du groupe G, mais ces autres champignons microscopiques (moisissures) ne sont rencontrés que très rarement dans les aliments
- ✓ *Aspergillus niger* : est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol et de la litière, dans le compost et le matériel végétal en décomposition (Briki et zitouni, 2013).

Aspergillus niger est utilisé dans des applications industrielles dans le domaine alimentaire et dans l'industrie biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Bougherara et Aliani, 2017).

III.3. L'effet des champignons sur la sante des êtres humains

Les spores de champignons et leurs mycotoxines peuvent représenter un danger potentiel pour l'homme. Trois effets pathologiques nocifs pour la santé humaine sont : les effets immunologiques, les infections fongiques et les intoxications par les mycotoxines. Ces dernières sont détaillées dans le **Tableau 06 (Boudih, 2011)**.

Les effets immunologiques sont liés à des réactions allergiques de type I (IgE dépendantes) ou de type III (IgG dépendantes), suite à l'exposition de protéines allergisantes pouvant activer ou aggraver les allergies. Les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, seraient fréquemment associés aux allergies et aggraveraient des pathologies telles que la rhinite ou l'asthme (Boudih, 2011).

Les champignons filamenteux sont essentiellement des champignons ubiquitaires naturellement peu ou non pathogènes. Ce sont des agents d'infections opportunistes qui expriment leur pouvoir pathogène dans des conditions cliniques favorables à leur installation dans l'organisme. Plusieurs pathologies ont été décrites chez l'homme. Elles touchent principalement l'appareil respiratoire, mais plus rarement aussi d'autres organes. L'aspergillose pulmonaire invasive est la principale et la plus grave des pathologies dues à ces champignons (Nguyen, 2007 ; Boudih, 2011).

Les effets liés aux mycotoxines (regroupés dans le **Tableau 06**), selon (Nguyen, 2007 ; Boudih, 2011).

Tableau 06 : Effet des principales mycotoxines sur l’homme et mécanisme d’action cellulaire et moléculaire identifiés (Nguyen, 2007 ; Boudih, 2011).

Mycotoxine	Effets	Mécanismes d’action cellulaire et moléculaires
Aflatoxine B1 et M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d’adduits à l’ADN Péroxydation lipidique Bioactivation par des CYP450 Conjugaison aux Glutathion- transférases
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation	Impact sur la synthèse des protéines Inhibition de la production d’ATP Détoxification par les peptidases
Trichothécènes (A et B)	hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée	Induction de l’apoptose sur progéniteur Hématopoïétique et cellules immunitaire Impact sur la synthèse des protéine Altération des Ig
patuline	Neurotoxicité Mutagenèse <i>in vitro</i>	Inhibition indirecte d’enzymes

IV. Matériels et méthodes

Notre travail consiste à une étude phytochimique, suivi d'une évaluation de l'activité antifongique des substances bioactives (les polyphénols totaux, les alcaloïdes) de *Daphne gnidium* L.

IV.1. Matériel

IV.1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé est constitué d'un matériel végétal représenté par les feuilles de *Daphne gnidium* L, récoltée au niveau de la région de la wilaya de Bouira, et d'un matériel microbiologique formé par des souches fongiques : *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*.

IV.1.2. Matériel non biologique

Un ensemble de matériel composé d'appareils, de réactifs, de produits chimiques et de verreries est utilisés dans la réalisation de nos études (**Annexe 01, 02**).

IV.2. Méthodes d'étude

Notre travail est composé de trois étapes :(**figure 07**)

- Un screening phytochimique de la poudre végétal de *Daphne gnidium* L.
- Une extraction des alcaloïdes et des polyphénols totaux.
- Une évaluation de l'activité antifongique des substances bioactives extraites.

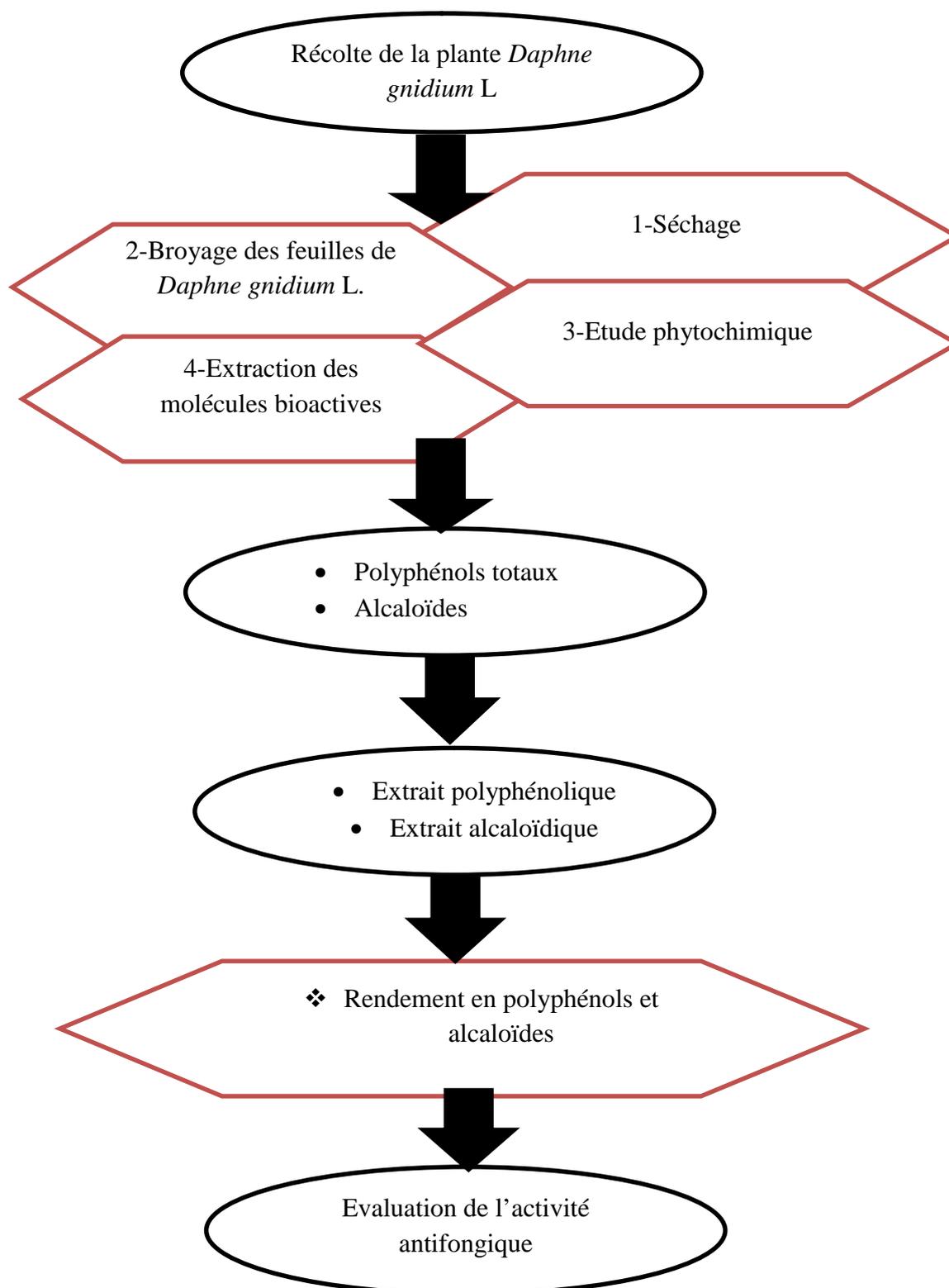


Figure 07 : Schéma expérimentale

IV.2.1. Séchage des feuilles

Cette étape est réalisée dans le but d'abaisser la teneur en eau des feuilles récoltées, et d'empêcher ainsi les réactions d'altération qui peuvent se produire.

La partie récolté est séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant deux semaines.

IV.2.2. Broyage des feuilles séchées

Les feuilles séchées sont réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue est conservée à l'abri de l'air et l'humidité, dans des bocaux en verre hermétiquement fermés. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction des alcaloïdes et des polyphénols totaux (**Figure 08**)



Figure 08 : Le broyat des feuilles de *Daphne gnidium L.*

IV.2.3. Tests phytochimiques (screening phytochimique)

C'est une procédure qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence de substances chimiques. La méthode de caractérisation appliquée est celle adoptée par **Tona et al., 1998 ; Longaga et al., 2000.**

IV.2.3.1. Préparation de l'infusé à 5%

Pour préparer un infusé à 5%, on met 100 ml d'eau distillée sous la plaque chauffante jusqu'à ébullition (15 min). Après on met 5g de poudre dans l'eau distillé bouillante pendant 15 min. Puis on filtre le mélange, le filtrat est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

IV.2.3.2. Identification des tanins totaux

Mettre 5 ml de l'infusé, puis ajouter quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl_3) à 5%. La réaction positive est mise en évidence par l'apparition de précipité ou de coloration bleuâtre ou bleu noir intense.

IV.2.3.3. Identification des tanins galliques

Mettre 5 ml de l'infusé, puis ajouter 2g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . La réaction positive se manifeste par une coloration bleue foncée en présence des tanins galliques.

IV.2.3.4. Identification des alcaloïdes

On' à peser 5g de poudre végétale humectée avec l'ammoniaque 1/2, en suite macérée dans 50 ml du mélange éther/chloroforme (3/1) (v/v) pendant 24h. Après filtration, le filtrat récupéré est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N. Des réactions de précipitation apparaissent sur la solution chlorhydrique. La présence des alcaloïdes est révélée par le réactif de Dragendroff, la réaction positive est confirmée par l'apparition d'un précipité rouge.

IV.2.3.5. Identification des saponosides

Mettre 2 ml de l'infusé, puis ajouter quelques gouttes d'acétate de plomb. La réaction positive s'exprime par la formation d'un précipité blanc.

IV.2.3.6. Identification des coumarines

2g de poudre sont mises dans 20 ml d'éthanol pendant 15 min sous reflux, après ce temps, le mélange est filtré. 10 gouttes d'hydroxyde de potassium à 10% et quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 10% sont additionnées à 25 ml du filtrat. La réaction positive est démontrée par la formation d'un trouble indiquant la présence des coumarines.

IV.2.3.7. Identification des quinones libres

Mettre 2g de poudre végétale en contact avec 2 ml d'acide chlorhydrique pure et 20 ml de chloroforme. Après 3h, le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque (1/2). La réaction positive est indiquée par la formation d'une coloration rouge.

IV.2.3.8. Identification de l'amidon

Mettre 2g de poudre végétale avec quelques gouttes d'iode. La réaction positive est démontrée par la formation d'une coloration bleu violette indiquant la présence de l'amidon.

IV.2.3.9. Identification des glucosides

Mettre 2g de poudre végétale en contact avec quelques gouttes d'acide sulfurique. La réaction positive est justifiée par la formation d'une coloration rouge brique montrant la présence des glucosides.

IV.2.3.10. Identification des mucilages

Ajouter 5 ml d'éthanol absolu à 1 ml d'infusé. Le mélange est incubé pendant 15 min. La réaction positive s'exprime par l'apparition d'un précipité floconneux indiquant la présence des mucilages.

IV.2.3.11. Identification des irridoides

Quelques gouttes d'acide chlorhydrique sont ajoutés à 2 ml d'infusé. Le mélange est chauffé. La réaction positive est confirmée par l'apparition d'une coloration bleue indiquant la présence des irridoides.

IV.3. Méthodes d'extraction des molécules bioactives**IV.3.1. Extraction des alcaloïdes**

L'extraction des alcaloïdes est établie selon **Bruneton, 1999 ; Badiaga, 2011** qui passe par une macération de la matière végétale dans un milieu acide, suivie d'une extraction liquide-liquide.

- **Mode opératoire**

50g de *Daphne gnidium* L. est laissé macérer dans 400 ml d'une solution d'acide chlorhydrique (1N), pendant deux heures sous agitation magnétique. Après filtration à travers une passoire puis sur coton, un dégraissage avec 30 ml de n-héxane est effectué, suivie d'une alcalinisation de la phase aqueuse avec 20 ml de l'ammoniaque. La solution basique ainsi obtenue est extraite avec un volume de 30 ml de chloroforme. La solution organique obtenue est ensuite lavée à l'eau distillée, puis sécher par le sulfate de sodium anhydre et enfin à sec à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

La procédure suivie est résumée dans le schéma suivant : **(Figure 09)**

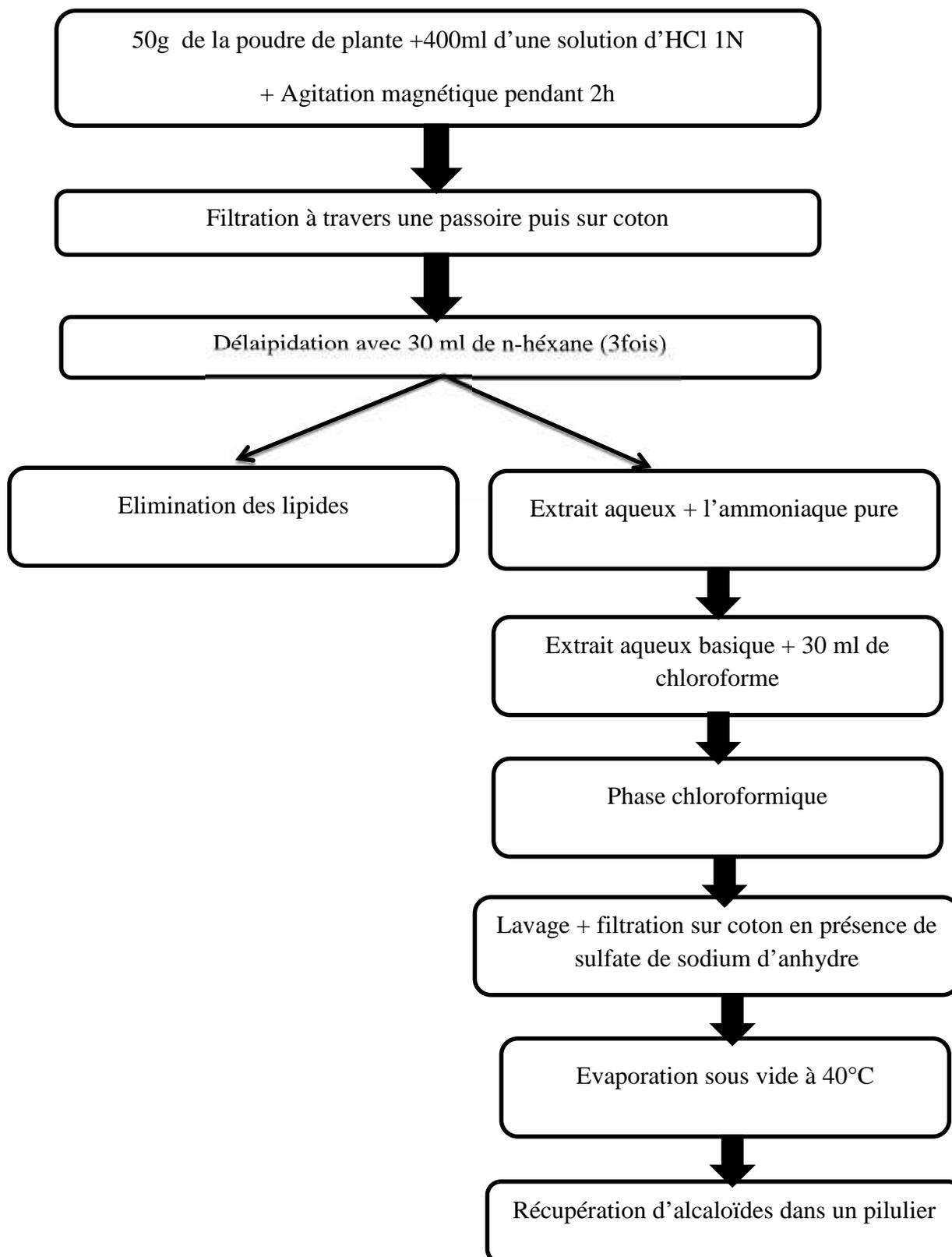


Figure 09: Les étapes d'exactions des alcaloïdes (Brunton, 1999).

IV.3.2. Extraction des polyphénols totaux

Le méthanol est fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques d'après **Felleh *et al.*, 2008**. La procédure suivie est celle décrite par **Owen *et al.*, (1999)**.

Le principe de cette méthode repose sur l'extraction solide-liquide.

- **Mode opératoire**

Mettre 50g de la poudre dans un 100 ml de méthanol et laisser macérer pendant 3 jours sous agitation magnétique. Après une filtration sur coton, le résidu est extrait pour la deuxième fois avec 50 ml de méthanol pendant 24h à 48h.

Après la deuxième extraction, les deux solutions sont mélangées et filtrées à travers un papier filtre standard. La solution filtrée est laissée à 4°C pendant une nuit, puis mise dans une ampoule à décanter pour l'exclusion des impuretés par lavage à n-héxane (3fois). L'extrait méthanolique est ensuite soumis à une évaporation à basse pression et à 40°C, puis récupéré dans un pilulier et enfin laisser à l'air libre jusqu'à évaporation totale du méthanol.

La procédure suivie est résumée dans le schéma suivant :

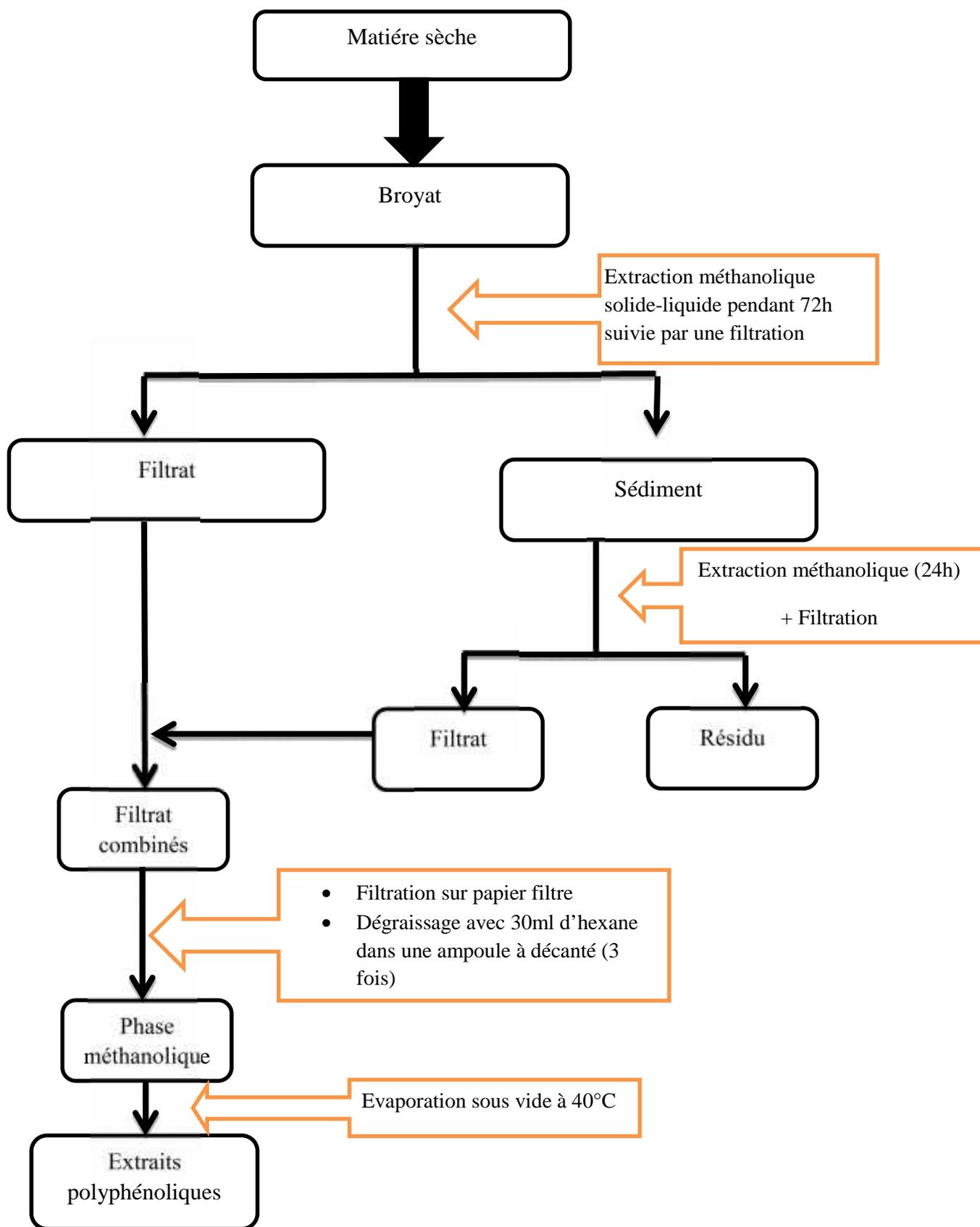


Figure 10: Les étapes d'extraction des polyphénols totaux (Owen et Johns, 1999).

IV.3.3. Dosage des polyphénols totaux**IV.3.2.1. Principe**

La quantification des composés phénoliques totaux est réalisée selon **Gonçalves *et al.*, (2012)** avec le réactif Folin-Ciocalteu en milieu basique, l'ensemble des composés phénoliques sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu, ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PM_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$) qui est réduit en mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite, présente un maximum d'absorption aux environs de 760nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/ mg E) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée pour l'acide gallique.

Les étapes de cette quantification sont résumées dans la figure ci –dessous (**Figure 10**).

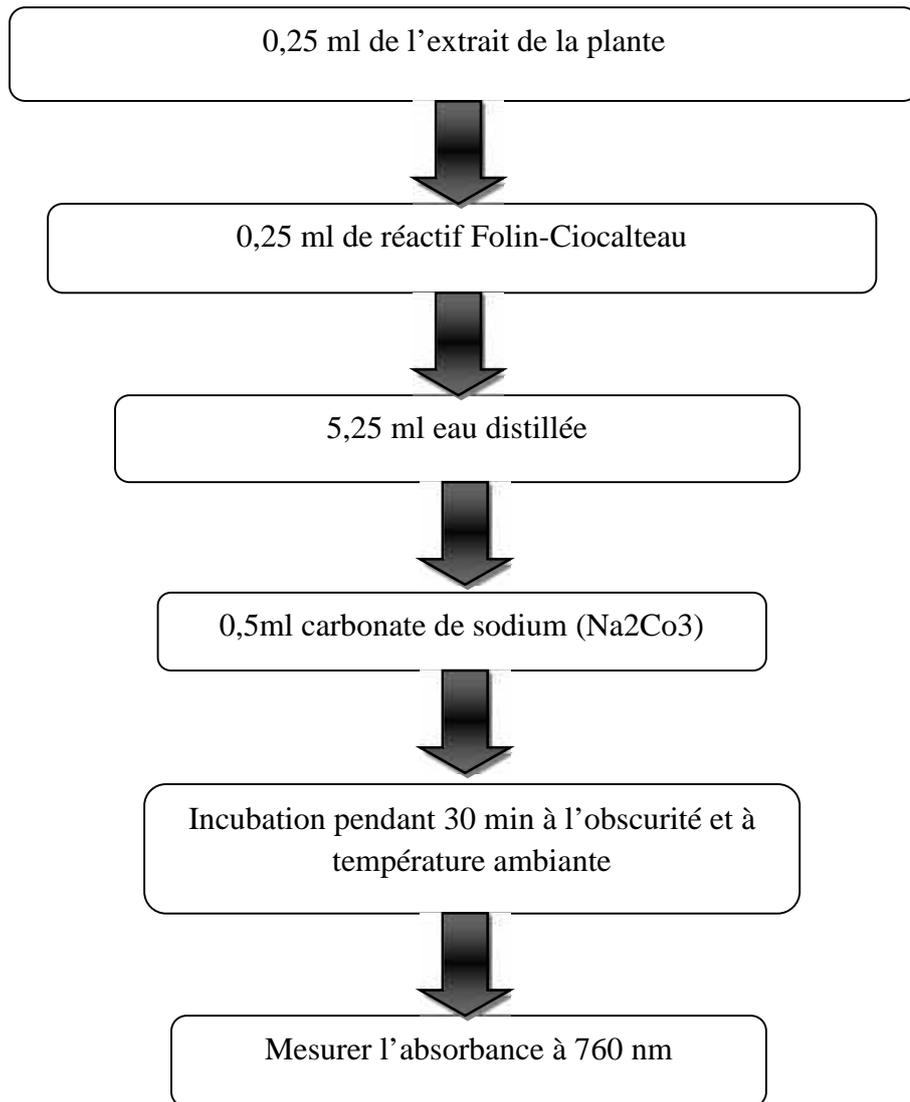


Figure 11: étapes de dosage des polyphénols totaux (Chaabane *et al.*, 2013) avec quelques modifications.

IV.4. Analyse quantitative des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de *Daphne gnidium* L.

- **Détermination des rendements en polyphénols et en alcaloïdes**

Le rendement d'extraction des différents extraits obtenus est défini comme étant un rapport entre la masse des extraits bruts à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée, il est calculé comme suit d'après **Ouahas *et al.*, (1988)** :

$$\text{Le taux de matière extraite(\%)} = [(P_1 - P_0) / P] * 100$$

Avec :

P : poids initial de l'échantillon (g).

p₀ : poids de bécher vide (g).

P₁ : poids du bécher après évaporation (g).

IV .5. Analyse qualitative des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de *Daphne gnidium* L.

L'analyse qualitative est faite par chromatographie sur couche mince (CCM) qui est une méthode efficace et rapide. Associant la sensibilité à la simplicité pour identifier les substances, en fonction de leur aptitude de migration dans des conditions données. La CCM est une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée sur un support planaire. Elle permet la séparation des constituants d'un mélange ; en se basant sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases : l'une stationnaire l'autre mobile (**Bouheroum, 2007**).

- **Mode opératoire**

Préparation des extraits

Une concentration 2g/10 ml est préparée pour chaque extraits dans l'éthanol (soit pour les alcaloïdes ou pour les polyphénols).

Plusieurs systèmes solvants sont testés afin de fixer le meilleur système qui assure la séparation des extraits d'alcaloïde (**Tableau 07**) et de polyphénols (**Tableau08**) de la plante. Le choix du système est basé sur l'observation des plaques après migration.

Tableau 07: systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des alcaloïdes de la plante par CCM.

Systèmes solvants	Composition (v/v)
S1	Chloroforme - Methanol (9:1).
S2	Chloroforme-Acetone (9:1).
S3	Hexane –Acétated'éthyle (8:2).
S4	Chloroforme-Acétated'éthyle –Acétone (5:4:1).
S5	Acétated'éthyle –Méthanol -Eau distillée (77:13:10).
S6	Chloroforme –Méthanol- Ammoniaque concentré (90:9:1).
S7	Diethyléther –Méthanol - Ammoniaque concentré (44:5:1).
S8	Toluène –Acétone –Ethanol-Ammoniaque concentré (40:4:8:3).

Tableau 08: systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des polyphénols par la CCM.

Systems solvants	Composition (v/v)
S1	Acétate d'Ethyle –Méthanol –Eau distillée (100 :13,5 :10).
S2	Butanol -Acide Acétique -Eau distillée (4 :1 :5).
S3	Chloroforme- Méthanol –Eau distillée (1 :1 :0,5).

Révélation : la visualisation des plaques est fait sous une lampe UV à 365nm (Zaaror,2012).

IV.6. Activité antifongique des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de *Daphne gnidium* L.

- **Pré culture des moisissures**

Sur des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, un disque de champignon d'une culture pure est déposé au centre de chaque boîte. Puis incubé à 28 C° durant 7 jours.

On a essayé d'évaluer l'activité antifongique des extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L. en se basant sur la méthode de contact direct sur milieu gélosé.

- **Mode opératoire de la méthode de contact direct sur milieu gélosé**

Cette technique décrite par Grover *et al.*, (1962) et Khallili (2001) consiste à mélanger 1 ml d'une solution alcoolique à base d'extrait alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L. à une concentration de 500 mg/ml, avec 7 ml du milieu PDA en surfusion, dans un tube à essai stérile. Après agitation, le contenu est versé dans une boîte de Pétri.

Une boîte contenant le milieu PDA et 1 ml d'éthanol 95° est utilisé comme témoin négatif. Un disque de champignon est implanté au centre de chaque boîte (traitées et témoin), ces dernières sont ensuite incubées à 28 °C pendant 7 à 8 jours.

Le suivie de la croissance fongique est effectué tous les deux jours jusqu'à la fin de la durée appropriée d'incubation ou nous procédons à la mesure des diamètres de mycélium pour calculer le pourcentage d'inhibition ou le taux d'inhibition comme suit:

$$\%d'inhibition\ du\ mycélium = ((MIc - MI_t) / MIc) \times 100$$

MIc = diamètre de mycélium dans la boîte témoin.

Mit = diamètre de Mycélium dans les boîtes contenant les principes actifs (champignons traités).

L'extrait est qualifié de :

- Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100%, la souche fongique est dite très sensible.
- Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75%, la souche fongique est dite sensible.
- Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche fongique est dite limite.
- Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche fongique est dite peu sensible ou résistante (Alilou *et al.*, 2007 ; Hajji *et al.*, 2017).

V.1. Screening phytochimique

La première partie de notre étude consiste à détecter les différentes familles de composés existant dans les feuilles de *Daphne gnidium* L. Les tests appliqués sont basés sur des phénomènes de précipitation et/ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé. Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau 09**.

Tableau 09 : Résultats des tests phytochimiques des feuilles de *Daphne gnidium* L.

Substance	Réaction positive	Résultats obtenus
Tanins totaux	Coloration bleue noire	(+++)
Tanins galliques	Coloration bleue foncée	(+++)
Alcaloïdes	Précipité rouge	(+)
Saponosides	Précipité blanc	(+)
Coumarines	Formation d'un trouble	(+++)
Quinones libres	Coloration rouge	(+++)
L'amidon	Coloration bleue violette	(-)
Glucosides	Coloration rouge brique	(+)
Mucilages	Précipité floconneux	(+)
Irridoïdes	Coloration bleue	(-)

Avec : (+) présence de substance active.

(-) absence de substance active

Les résultats expérimentaux mentionnés dans le **Tableau 09**, montrent la présence des tanins totaux, tanins galliques, les coumarines et les quinones libres en quantités importantes dans les feuilles de la plante étudiée par contre les alcaloïdes, les saponosides, les glucosides et les mucilages sont présents en faible quantité, alors que l'amidon et l'irridoides sont absents

Peu de travaux antérieurs ont été réalisés sur la pythochimie de *Daphne gnidium* L, nous avons trouvé que d'après **Ramdani et al., (2015)** cette espèce contient des tanins, des coumarines et des polyphénols. Par contre d'autres travaux ont été portés sur l'optimisation et l'extraction de cette espèce (**Mahmoud DIF et al., 2015 ; Chaabaneet al., 2013**), tandis que les autres ont consacré l'objectif de leur étude sur la description botanique et la vérification de sa classification (**Roccoliello et al., 2009 ; Mohammedi, 2013**).

V.2. Extraction des composés phénoliques et alcaloïdiques

V.2.1. Calcul du rendement d'extraction de l'extrait méthanolique

L'extrait obtenu présente une couleur vert foncée .Le tableau suivant regroupe le rendement et la quantité en gramme d'extrait.

Tableau 10 : Le rendement de l'extrait en composés phénoliques.

	Extrait1	Extrait 2	La moyenne
Rendement%	8 ,2%	7,8%	8%

Le rendement en composés phénolique obtenu à partir de feuilles de *Daphne gnidum* L. est de 8%.

Les résultats obtenus sont différents de ceux trouvés par quelques auteures qui ont travaillé sur d'autres plantes .En effet, le taux de composés phénoliques totaux de *Daphne gnidium* L (8%) est nettement inférieure à celui de *S. tripartita* (36,20%) et celui de *L. guyonianum* (21 ,50%) (**Hadjadj,2017**).Il est par contre supérieur à celui obtenue par **Cvetuie et al., (2004)** lors d'une extraction éthanolique de composés phénoliques de la *Rutaceae Citrus* (3,98%) toutefois **Aref (2015)** a obtenue durant une extraction par le méthanol un rendement proche du notre, avec la plante *Cleome arabica* (8, 19%).

V.2.2. Calcul de rendement d'extraction de l'extrait chloroformique

Le rendement en composés alcaloïdiques obtenu à partir de *Daphne gnidium* L. est de 2,45%.

Tableau 11 : Le rendement de l'extrait en composés alcaloïdiques.

	Extrait1	Extrait 2	La moyenne
Rendement%	2,6%	2,3%	2,45%

Nous notons des taux différents entre quelques espèces et notre taux d'alcaloïde de *Daphne gnidium*L. qui est de 2,45%.Il y'a des plantes qui montrent un taux inférieur par rapport au nôtre telle que *N. latifolia* 0,9% (**Babiaga, 2011**).

V.3. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols est estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales.

Une courbe d'étalonnage est alors effectuée avec l'acide gallique (**Figure 12**), une mesure de l'absorbance de l'extrait est réalisée à 760nm. La quantité des polyphénols correspondante est déterminée par cette équation $Y = 47.41x$ et elle est rapportée en mg/g de la matière sèche équivalent en acide gallique.

Le taux de polyphénols totaux dans l'extrait des feuilles du *Daphne gnidium* L. est de 4mg EGA/g. Notre plante présente une faible teneur en polyphénols comparé aux autres résultats. Elle est inférieure à celle de *S. tripatita* collectée dans la région de Ouargla pour laquelle, le taux en composé phénoliques estimés à 9.17 mg GAE/ g (**Hadjadh, 2017**). Aussi, elle est inférieure à celle trouvée chez la plante *Pinus pinea* L. dont la teneur 7,99mg GAE/g. Mais d'autre côté, elle est très proche à celle de *Pinus halepensis* pour laquelle, le taux en composés phénolique est estimé à 3.71 mg GAE/g (**Kadri, 2014**).

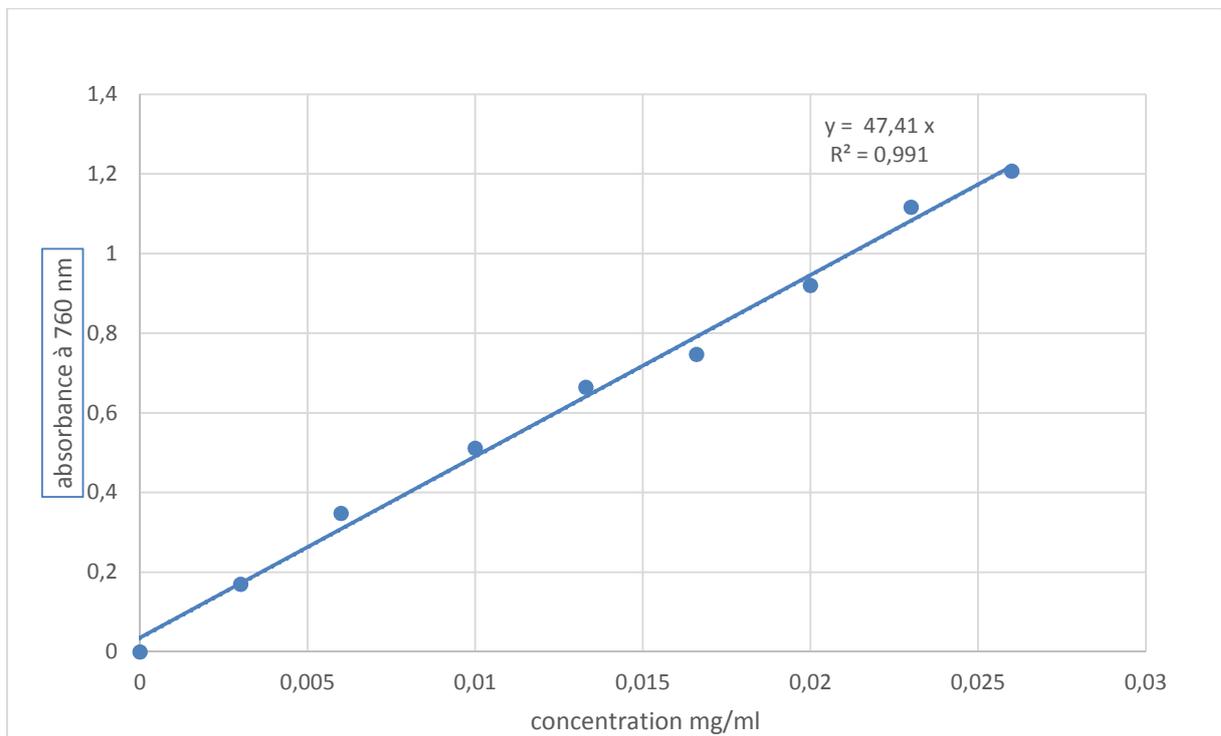


Figure 12 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

En vue de ces résultats nous pouvons conclure qu'en réalité une estimation du taux de polyphénols via le réactif de Folin-Ciocalteu présente une faible spécificité dont l'inconvénient principal est le dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes hydroxyles non seulement ceux des composés phénoliques, mais également de certains sucres et protéines, donnant ainsi un taux phénolique apparent élevé . Cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage.

Il est important aussi de savoir que le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques et extrinsèques. Des études ont montrés que les facteurs extrinsèques (tels que les facteurs géographiques et climatiques l'irrigation,), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage)ont une forte influence sur le contenu en polyphénols . Ceci peut donc expliquer la faible teneur de nos extraits en composés polyphénoliques par rapport aux extraits déjà mentionnés au-dessus (Kadri, 2014)

V.4. Séparation des polyphénols et des alcaloïdes par CCM

Nous avons soumis nos extraits à une analyse qualitative par CCM dont le but de caractériser qualitativement chaque extrait.

L'extrait de la plante est déposé, à 1cm du bord inférieur de la plaque. Après la migration de la phase mobile et lorsque le solvant d'élution a atteint la ligne supérieure, la plaque est retirée, séchée et examinée sous la lampe UV à 365 nm suivi d'une révélation chimique afin d'avoir une identification de nombre de constituants présents.

V.4.1. Les polyphénols

D'après les résultats obtenus des CCM qui sont regroupés dans la (Figure 12) et en se basant sur l'observation sous UV à 365 nm nous avons choisis le système S1 contenant l'écetate d'ethyle-méthanol-eau distillée (100 :13,5 :10) (v/v/v) comme la meilleure phase mobile pour la séparation des polyphénols de notre plante par contre les deux autres systèmes S2 et S3 ont donné une mauvaise séparation pour les polyphénols de *Daphne gnidium* L.

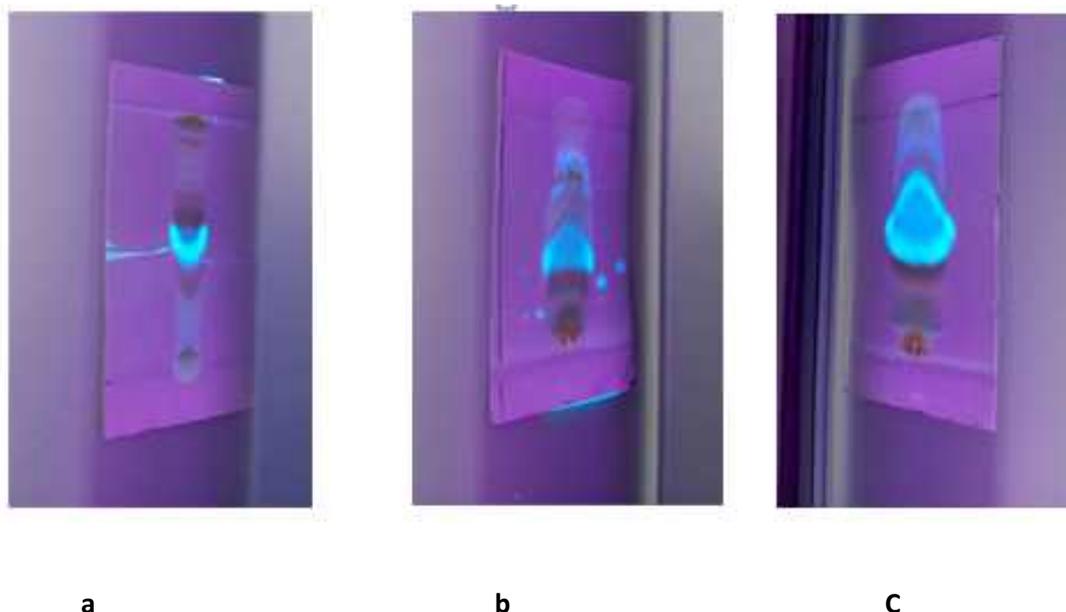


Figure 13 : Séparation des polyphénols par CCM (a : système S1, b : système S2, c : système S3) , visualisation sous UV à 365 nm

Les bandes de fluorescence bleue correspondraient aux acides phénols ou à la présence de coumarines selon **Diallo. (2005)**. Tandis que celle colorées en brun correspondraient aux flavonols et flavones selon **Dahou et al., (2003)**.

V.4.1. Les alcaloïdes

Les résultats de séparation des alcaloïdes de *Daphne gnidium* L. par les différents systèmes solvants sont visualisés sous la lampe UV à 365 nm qui montrent un certain nombre de taches dont la fluorescence est différente d'un système à un autre. Nous avons choisis les trois systèmes (S3, S7, S8) qui assurent une meilleure migration des alcaloïdes sont représenter ci-dessous (**Figure 13**) par contre les autres systèmes ont donné une mauvaise séparation. Selon les photos on n'observe que c'est le système 7 qui assure la meilleure séparation.

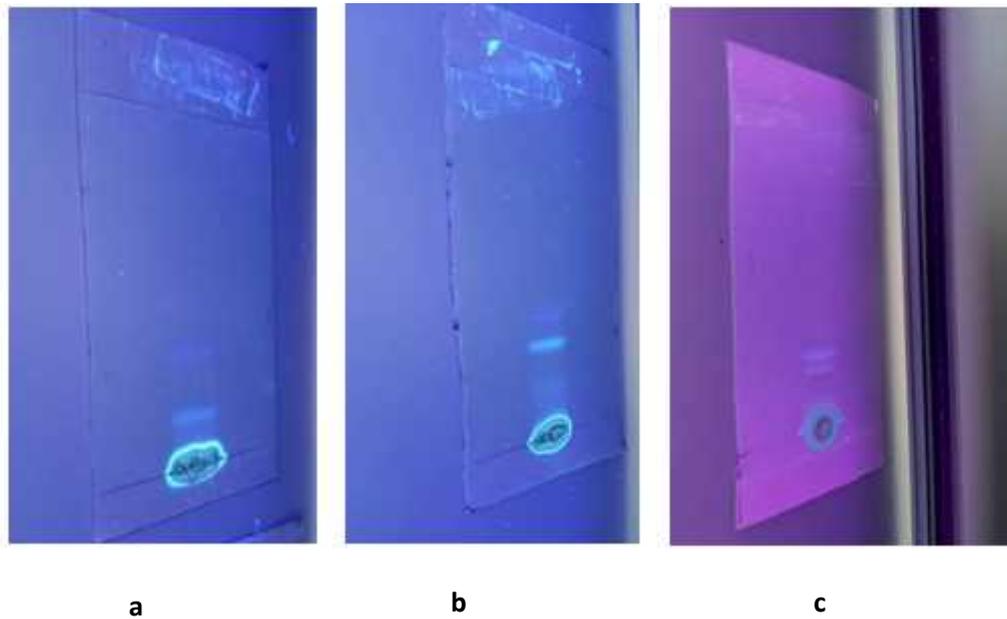


Figure 14 : séparation des alcaloïdes par CCM (a :système S3, b :système S7, c : système S8). Visualisation sous UV à 365 nm

V.5. Activité antifongique des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de *Daphne gnidium*L.

- **Effet des extraits polyphénoliques et alcaloïdiques de *Daphne gnidium* L .par la méthode de contact direct**

Les résultats enregistrés par la méthode de contact direct sur milieu PDA additionnée de 500 mg/ml de chaque extrait sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 12 : pourcentage d'inhibition de mycélium de moisissures après traitement par les extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

Souches de moisissure	% d'inhibition de mycélium au 7 ^{em} jour	
	Alcaloïdes	Polyphénols
<i>Aspergillus flavus</i>	25%	37,5%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	54,54%	60%
<i>Aspergillus niger</i>	16,66%	33%

L'effet antifongique est plus au moins important selon la nature de la souche. Nos résultats (**Tableau 12**) montrent des pourcentages d'inhibitions des alcaloïdes et des polyphénols ne dépassent pas 50% pour *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* par contre *Aspergillus fumégatus* sont supérieur à 50%.

La meilleure activité est observée avec les polyphénols pour la souche d'*Aspergillus fumégatus* (figure 15) avec un pourcentage d'inhibition de 60%, suivie par la souche d'*Aspergillus flavus* 37,5%, puis *Aspergillus niger* 33%. Cet ordre de sensibilité est conservé pour les substances alcaloïdiques avec de faibles pourcentages qui sont respectivement (54,54%, 25%, 16,66%) pour les souches d'*Aspergillus fumégatus*, d'*Aspergillus flavus*, d'*Aspergillus niger*.

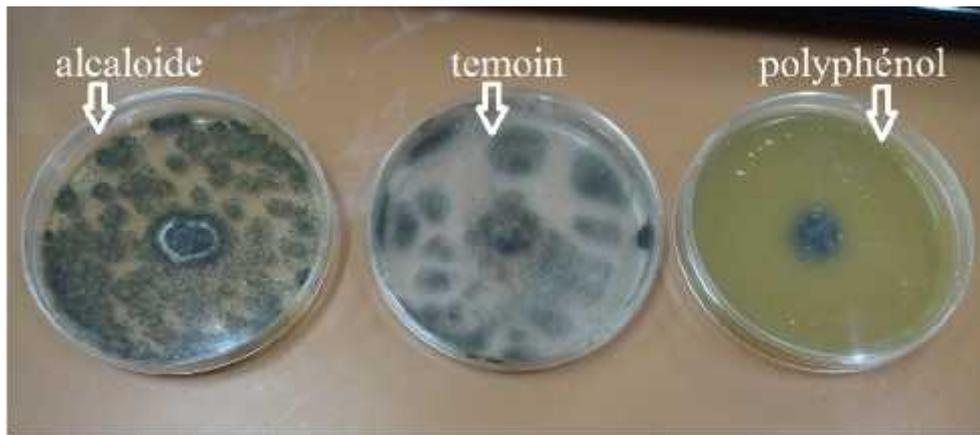


Figure 15 : Aspect des cultures d'*Aspergillus niger* en présence des extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

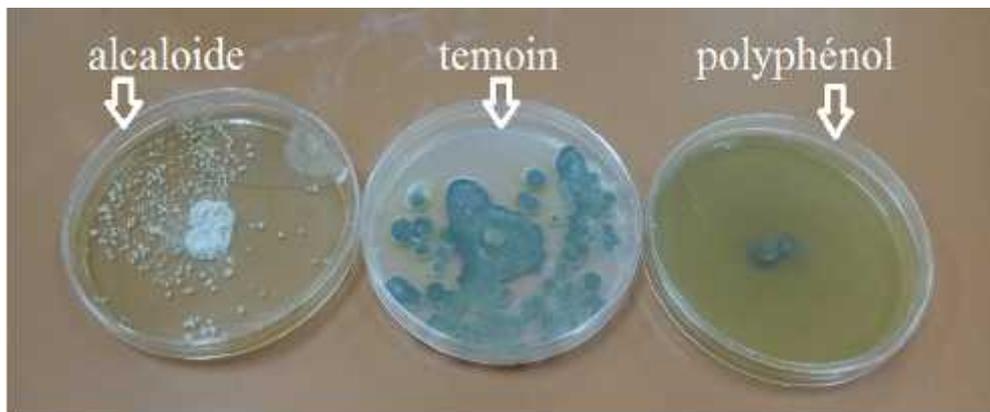


Figure 16 : Aspect des cultures d'*Aspergillus fumigatus* en présence des extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

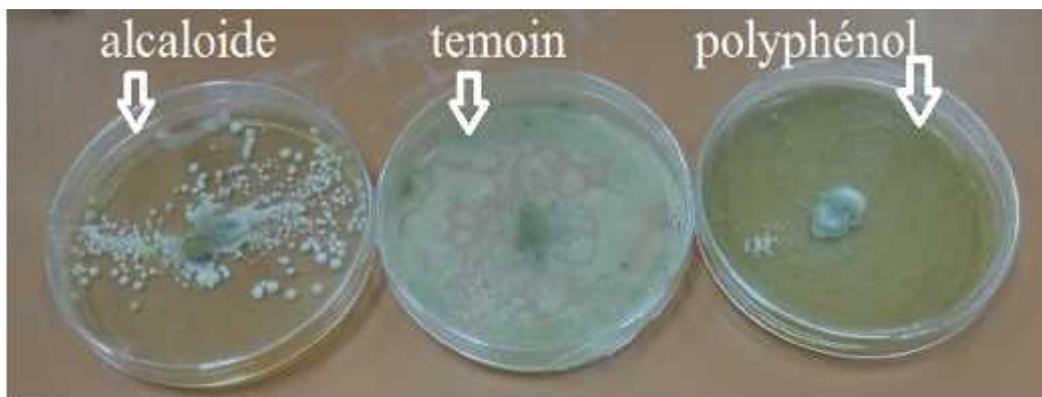


Figure 17 : Aspect des cultures d'*Aspergillus flavus* en présence des extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L.

La souche de champignons (*Aspergillus fumigatus*) est alors remarquablement sensible aux extraits alcaloïdiques et polyphénoliques de *Daphne gnidium* L, mais les souches de champignons (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*) sont dites limités aux extraits, malgré que la concentration des deux substances utilisées est de 500 mg/ml, très élevée en la comparant avec celle utilisée par **Mohammedi, (2013)** qui est de 5µg/ml. Cet auteur a effectué des travaux avec des extraits de deux espèces qui sont riche en alcaloïdes, *H. scoparium* et *Aspergillus schmittianum* ont inhibé fortement la croissance de la souche *Aspergillus flavus*. Les pourcentages d'inhibition sont de 65,33% et 83.56% respectivement. Aussi contrairement à nos résultats obtenus avec les alcaloïdes et les polyphénols de *Daphne gnidium* L, les huiles essentielles de la plante *Lavandula officinalis* ont présenté une activité antifongique sur les souches fongique *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* sont les moisissures les plus sensibles à l'huile essentielle étudiée. Les deux souches donnent des taux d'inhibition supérieurs à 50% (**Laib, 2011**).

Les résultats sont aussi complètement différents de ceux obtenus par **Djeugap et al. (2017)** qui ont étudié l'activité antifongique de l'extrait de *Monodoramyris ticakemels*, une faible activité antifongique a été observée sur les souches (*Aspergillus niger*, *Creflexum*) les pourcentages d'inhibition est de 8,57% et 2,85% respectivement.

Conclusion et perspective

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour des antifongiques naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés à partir des extraits de plantes.

Ce travail a comme objectif une étude phytochimique et une évaluation de l'activité antifongique des extraits méthanolique et chloroformique présents chez *Daphne gnidium*L récoltée dans la région de Bouira sur des souches fongiques.

Le screening phytochimique de la poudre des feuilles de *Daphne gnidium*L. montre la présence des tanins totaux, tanins gallique, les coumarines et les quinones libres en quantités importantes par contre les alcaloïdes, les saponosides, les glucosides et les mucilages sont présents en faible quantité, alors que l'amidon et l'irridoides sont absents. L'extraction des alcaloïdes et des polyphénols établie par une macération présentent respectivement des rendements de 2,45% et 8%. Ces extraits sont testés par CCM, nous avons déduit que c'est le système S1 contenant l'écetate d'éthyle-méthanol-eau distillée (100:13,5:10)(v/v/v) qui permet la séparation des polyphénols et pour les extraits alcaloïdiques c'est le système S7 contenant Diéthyléther - Méthanol - Ammoniaque concentré (44:5:1) (v/v/v) qui assure la meilleure séparation.

L'évaluation de l'effet antifongique des polyphénols totaux et des alcaloïdes a fait ressortir une action différente de ces substances bioactives sur la croissance de souches fongiques testées.

En effet, les résultats montrent des pourcentages d'inhibition des alcaloïdes et des polyphénols qui ne dépasse pas 50% pour les souches *Aspergillus flavus*, et *Aspergillus niger* par contre *Aspergillus fumigatus* sont supérieur à 50%.

A la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons conclure que les polyphénols et les alcaloïdes de cette plante médicinale présentent un effet antifongique modéré.

Conclusion et perspective

En perspective et afin de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait souhaitable de :

- Exploiter les autres méthodes d'extraction et évaluer le rendement de substances obtenues.
- Caractériser des constituants de cette plante par des méthodes analytiques plus performantes comme : l'HPLC et RMN.
- Analyser la toxicité de la plante *in vivo* afin de déterminer la dose létale (DL50).

Références bibliographiques

- Abadlia, M., & Chebbour, A. (2014). *Etude des huiles essentielles de la plante mentha piperita et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusoires*. magester, Constantine 1.
- Adrian, M., Owen, N., Nicholas, J., Herrod, D., Menon, J., Clark, S., John, D. (1999). Redefining the functional organization of working memory processes within human lateral prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, 567.
- Akroum, S. (2005). *Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de Rosmarinus officinalis et Vicia faba L*. Magiter, Mentouri, Constantine.
- Alilou, H. (2012). *Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc: Asteriscus graveolens subsp. odoratus (Schousb.) Greuter et Asteriscus imbricatus (Cav.) DC*. doctorat, Ibn Zohr, Agadir.
- Alilou, H., Rouhi, R., Idrissi, H., Lalla, M., & Akssira, M. (2007). Activité antifongique de Bubonium odorum (Asteracées) sur des champignons pathogènes d'agrumes. *Review in biology and biotechnologie*, 20.
- Attou, A. (2010). *Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante Ruta chalepensis (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent*. magester, Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Badiaga, M. (2011a). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activites biologiques de Nauclea latifolia smith une plante medicinale africaine recoltee au Mali*. Doctorat, Bamako.
- Badiaga, M. (2011b). *Etude ethnobotanique, phytochimique et activites biologiques de Nauclea latifolia smith une plante medicinale africaine recoltee au Mali*. Doctorat, Bamako.
- Bedou, F. (2015). *Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes Rumex vesicarius L. et Anvillea radiata Coss. & Dur*. Doctorat, Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Belmessikh, A. (2011). *Optimisation de la production de la protéase neutre par Aspergillus oryzae sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide*. magester, Mentouri, Constantine.
- Benayache, F. *Recherche et determination structurale des metabolites secondaires du genre Centaurea : C. africana, C. nicaensis* doctorat, Mentouri, constantine.
- Benhas, D., & Benayache, A. (2015). *Extraction et identification de mycotoxines de Penicillium chrysogenum*. master, Mentouri, Constantine.
- Benserradj, O. (2014). *Evaluation de Metarhizium anisopliae à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques*. doctorat, Constantine 1.
- Berregioua, A. (2016). *Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae medicinales du sud algerien: Moricandia arvensis et Zilla macroptera*. Doctorat, Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Bouderdara, N. (2013). *Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de Cachrys libanotis L*. doctorat, Mentouri, constantine.
- Boudih, S. (2011). *Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro*. Doctorat, Paris-EST.
- Bougherara, C., & Aliani, M. (2017). *Etude de l'effet d'un extrait enzymatique protéolytique d'aspergillus niger sur la gliandine (gluten)*. master, Larbi Tébessi, Tébessa.
- Bouheroum, M. (2007). *Etude phytochimique des plantes medicinales algeriennes Rhantherium adpressum et Ononis angustissima*. Doctorat, Mentouri, Constantine.
- Briki, K., & Zitouni, N. (2013). *Production d'acide citrique par Aspergillus niger cultivée sur milieu à base de dattes "variété Ghars"*. Master Kasdi Merbah, Ouargla.
- Cabarrocas, R., Nguyen-Tran, T., Djeridane, Y., Abramov, A., Johnson, E., & Patriarche, G. (2007). Synthesis of silicon nanocrystals in silane plasmas for nanoelectronics and large area electronic devices. *Physics* 2258. doi: 10.1088/0022-3727/40/8/S04

Références bibliographiques

- Chaabane, F., Pinon, A., Simon, A., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2014). Chloroform leaf extract of *Daphne gnidium* inhibits growth of melanoma cells and enhances melanogenesis of B16-F0 melanoma. *South African Journal of Botany*, 80. doi: 10.1016/j.sajb.2013.10.009
- Chibani, S. (2012). *Etude phytochimique et biologique de six plantes médicinales de l'est Algérien*. Doctorat, Constantine 1.
- Daoui, A., Bammou, M., Haloui, Z., Ibijbijen, J., & Nassiri, L. (2017). Activite antifongique des extraits aqueux de *calendula officinalis* L, *Urginea Maritima* (L.) Baker et *Chenopodium Ambrosioides* L. *European Scientific Journal*, 15. doi: 10.19044/esj.2017.v13n24p483
- Denis, S. (1996). *Degradation de la cafeine par aspergillus sp. et penicillium sp. etude physiologique et biochimique*. Doctorat, Montpellier 2.
- Djabali, S. (2011). *Effets des polyphénols sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot sec*. Master.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J., & Stocker, P. (2006). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol*, 809. doi: 10.1007/s00217-006-0361-6
- Djeridane, Y., Abramov, A., & Roca i Cabarrocas, P. (2007). Silane versus silicon tetrafluoride in the growth of microcrystalline silicon films by standard radio frequency glow discharge. *Science direct*, 7454. doi: 10.1016/j.tsf.2006.11.112
- Djeugap Fovo, J., Akoula Nzong, C., kylo, M., Njukeng Achiangia, P., Galani Yamdeu, J., Kuate, J., & Ghimire, S. (2017). Morphological and molecular identification of pathogenic fungi of *Monodora myristica* Dunal kernels and their response to different phytoextracts. *International journal of advance agricultural research*, 66.
- Donatien, K. (2008). *Enquete ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes- extraction, identification d'alcaloïdes- caractérisation , quantification de poly*. Doctorat, Paul Verlaine de Metz, France.
- El Fennouni, M. (2012). *Les plantes réputées abortives dans les pratiques traditionnelles d'AVORTEMENT AU MAROC*. Doctorat, Mohammed V, Rabat.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Science direct*, 379. doi: 10.1016/j.crv.2008.02.008
- Ferrari, J. (2002). *Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich.* doctorat, Lausanne.
- Ghnimi, W. (2015). *Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: Ricinus communis et Jaatropha curcas. Evaluatio de leur propriété anti-oxydante et de leur action anhibitrice sur l'activié de l'acetylcholinestérase*. Doctorat, Lorraine, France et Carthage, Tunisie.
- Goncalves, S., Gomes, D., Costa, P., & Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 465. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.066
- Guemmoula, K., & Ben Hamida, N. (2016). *Essai de caractérisation de la biomasse fongique sous palmier dattier*. Kasdi Merbah, Ourgla
- Hadjaj, S. (2017). *Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est Algérien*. doctorat, kasdi Merbah, Ourgla.
- Hajji, H., El Makhfi, F., Tallal, I., Abdennebi, E., Alaoui Faris, F., Ouffak, L., & El Aissami, A. (2000). *In Vitro* Evaluation of Antifungal Activity of *Daphne Gnidium* Extracts against Six Human Pathogenic Fungi. *Journal of chemical and pharmaceutical sciences*, 6.
- Harfouche, N. (2016). *Electrodéposition de revêtements composites à base de polyaniline pour des applications de batterie Lithium-ion et de protection contre la corrosion*. Doctorat, Toulon.
- Herzi, N. (2013). *Extraction et purification de substance naturelle : comparaison de l'extraction au CO₂ supercritique et des techniques conventionnelles*. Doctorat, Toulouse.

Références bibliographiques

- Kadri, N. (2014). *Graine de pinus sp : caractérisation physico-chimique et activité anticancéreuse*. Doctorat, Abderrahmane mira, Bejaia.
- Kala, A. (2012). *Etude et valorisation des principales actifs de quelques plantes du sud algérien: Pituranthos scoparius, Rantherium adpressum et Traganum nudatum*. Doctorat, Mentouri, Constantine.
- Ladhari, A., Omezzine, F., Rinez, A., & Haouala, R. (2011). Phytotoxicity of Daphne Gnidium L. Occurring in Tunisia. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 59.
- Laib, I. (2011a). *Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de Lavandula officinalis sur les moisissures des légumes secs*. Master Mentouri, constantine.
- Laib, I. (2011b). *Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de Lavandula officinalis sur les moisissures des légumes secs*. magister, Mentouri, constantine.
- Mahmoud DIF, M., Benali, F., Benyahia, M., & Mekhfi, N. (2014). Optimization of extraction in *Daphne gnidium* L. leaves. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 7.
- Mansour, M., & Mazzi, Y. (2017). *Recherche de l'activité antibactérienne des souches du genre Aspergillus*. Master, Mentouri, Constantine.
- Michel, T. (2011). *Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë rhamnoides)*. Doctorat, Orléans.
- Minh Tri, N. (2007). *Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines*. doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.
- Mohammedi, Z. (2012). *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie*. doctorat, Abou Bekr Belkaid, Telemcen.
- Morel, S. (2011). *Etude phytochimique et évaluation biologique de Derris ferruginea Benth*. Doctorat, Angers.
- Obame Engonga, L. (2009). *Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines*. doctorat, Ouagadougou.
- Ouis, N. (2015). *Etude chimique et biologique de huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil*. doctorat, Oran 1.
- Ouzlifi, D. (2015). *Contribution à une étude morphométrique de daphne gnidium L (thymelaeaceae) dans la région de Tlemcen*. Master Abou Bekr Belkaid, Telemcen.
- Ramdani, M., Lograda, T., Chalard, P., & Figueredo, G. (2015). Phytochemistry, Antibacterial activity and Chromosome number of two species of *Daphne* from Algeria. *International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry*, 11.
- Remila, S. (2015). *Evaluation des activités biologique in vitro et in vivo des extrait de Pistacia lentiscus*. Doctorat, Abderrahmane Mira, Bejaia.
- Roccoliello, E., Casazza, G., Galli, L., Cornara, L., Moncalvo, A., & Minuto, L. (2009). The flower biology of *Daphne gnidium* L. (Thymelaeaceae). *plant systeme evolution*, 41. doi: 10.1007/s00606-009-0144-1
- Sakhri, A. (2012). *Isolement des mycètes producteurs de la stérigmatocystine à partir d'aliment (maïs) et étude de son effet toxique sur Wistar albinos*. master, Mentouri, Constantine.
- Tona, L., Kambu, K., Ngimbi, N., Cimanga, K., & Vlietinck, A. J. (1998). Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 65.
- Touafek, O. (2010). *Etude pytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens*. doctorat, Mentouri, Constantine.
- Wang, J., Del Valle, L., Gordon, J., Rubini, M., Romano, G., Croul, S., . . . Reiss, K. (2001). Activation of the IGF-IR system contributes to malignant growth of human and mouse medulloblastomas. *Nature publishing*, 3857.

Références bibliographiques

Annexes

Tableau 01 : Appareillage et matériel utilisé au laboratoire

Equipements et appareils	Verreries et petits matériels
Agitateur magnétique	Anse de platine
Autoclave	Béchers
Balance de précision	Boîtes de Pétri
Bec bunsène	Cuvette de spectrophotométrie
Etuve	Entonnoir
Micropipette	Eprouvettes graduées
Plaque chauffante	Erlenmeyer
Réfrigérateur	Flacon en verre
Evaporateur rotatif	Verre de montre
Spectrophotométrie	Tubes à essai

Tableau 02 : Réactifs et produits chimiques

réactifs et produits chimiques
Acide acétique : $C_2H_4O_2$
Acide sulfurique : H_2SO_4
Acide chloroformique : HCl
Ammoniaque : NH_4OH
Carbonate de sodium : Na_2CO_3
Chlorure ferrique : $FeCl_3$
Chloroforme : $CHCl_3$
Ethanol : C_2H_5OH
Méthanol : CH_3OH

Annexes

Tableau 03 : composition de milieu de culture PDA

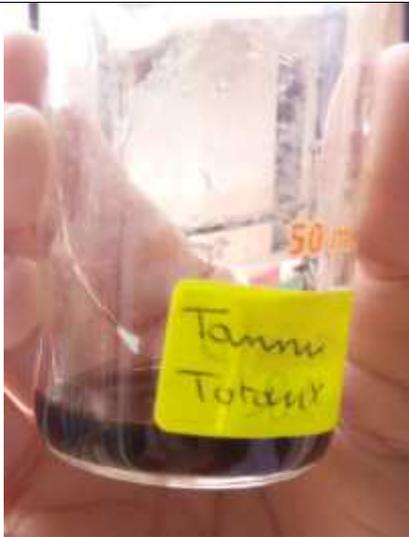
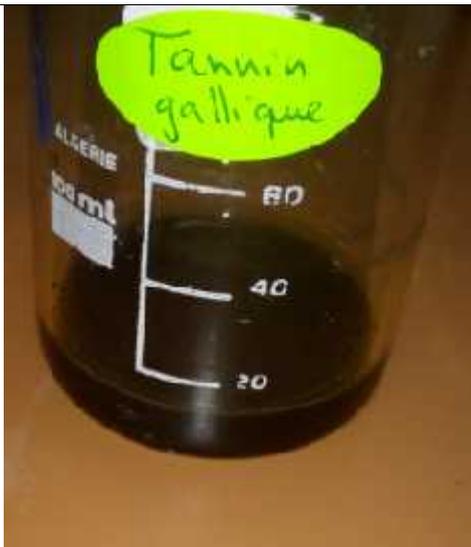
Pomme de terre **200mg**

Dextrose **20mg**

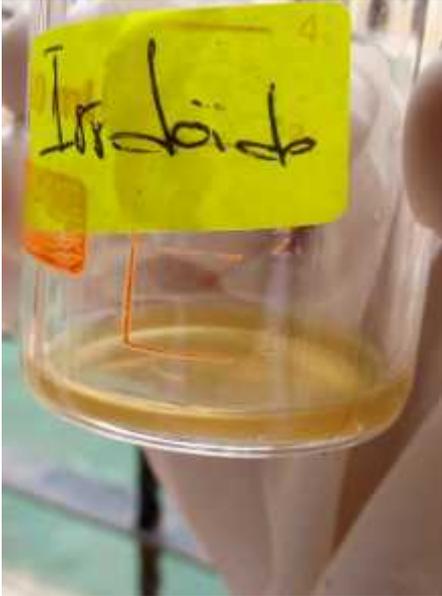
Agar **20mg**

Eau distillée **1 litre**

Tableau 04 : quelque photo de test screening phytochimique

Composes chimiques	Résultats positifs	Résultats obtenus
Tanin totaux	Coloration bleue noire	
Tanin gallique	Coloration bleue foncée	

Annexes

Coumarine	Formation d'un trouble	
Alcaloïde	Précipité rouge	
Iridoïde	Coloration bleue	

Annexes

Mucilage	Précipité floconneux	
----------	----------------------	--

Résumé

Ce travail a été consacré pour l'étude phytochimique, l'analyse qualitative par CCM et pour l'évaluation de l'activité antifongique de l'extrait alcaloïdique et polyphénolique de *Daphne gnidium*L., cette plante pousse à l'état spontané dans la région de Bouira. Des tests phytochimiques réalisés sur la poudre des feuilles après séchage ont permis de détecter la présence des différentes familles de composés chimiques.

L'extraction des alcaloïdes et des polyphénols est effectuée par macération cette technique a présenté respectivement des rendements de 2,45% et 8%. Ces extraits sont ensuite séparés par CCM, d'après les résultats nous avons choisis le système S1 contenant l'acétate d'éthyle-méthanol-eau distillée (100:13,5:10)(v/v/v) qui a permis une meilleure séparation des polyphénols et pour les alcaloïdes c'est le système S7 contenant Diéthyléther -Méthanol -Ammoniaque concentré (44:5:1)(v/v/v) qui a assuré cette séparation.

L'activité antifongique est évaluée *in vitro* par la méthode de contact direct sur milieu PDA et cela sur plusieurs espèces fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus niger*). Les extraits alcaloïdique et polyphénolique ont exhibé des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 50% à voir plus pour toutes les souches de moisissure testées.

Mots clés : *Daphne gnidium* L., étude phytochimique, CCM, activité antifongique.

Summary

This work was devoted to the phytochemical study, the qualitative analysis by CCM and for the evaluation of the antifungal activity of the alkaloidal and polyphenolic extract of *Daphne gnidium* L. growing spontaneously in the region of Bouira. Phytochemical tests carried out on the powder of the leaves after drying made it possible to detect the different families of chemical compounds existing in the leaves of this plant.

The extraction of the alkaloids and polyphenols was carried out by maceration with yields of 2.45% and 8%, respectively. These extracts were separated by CCM, according to the results we chose the S1 system containing ethyl acetate- methanol- distilled water (100:13.5:10)(v/v/v) which allows a better separation of polyphenols and for alkaloids the S7 system containing diethyl ether methanol concentrated ammonia (44: 5: 1) (v/v/v) ensured this separation.

The antifungal activity was valued *in vitro* by the method of direct contact on agar medium and on several fungal species (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*). The alkaloid and polyphenolic fractions exhibited inhibition percentages of up to 50% for all the mold strains tested.

Key words: phytochemical study, *Daphne gnidium* L., CCM, antifungal activity

تم تكريس هذا العمل الى الدراسة الكيميائية النباتية و تقييم نشاط مضادات الفطريات لمتعدد الفينولات و الالكالويدات *Daphne gnidium* L الذي يعيش بصفة عشوائية في منطقة البويرة. بحيث قمنا باجراء فحوصات كيميائية على مسحوق الاوراق بعد تجفيفها، مما سمح لنا بالكشف على مختلف مركبات العائلات الكيميائية. بعد استخراج الالكالويدات و متعدد الفينولات تم الحصول على نسبة تعادل 2.45% 8% على التوالي. و قد تم فصل هذه CCM S1 هو الذي يسمح بفصل افضل لمادة متعدد الفينولات اما بالنسبة

للالكالويدات فقد اخترنا نظام S7.

و قمنا بدراسة نشاط الفطريات في المختبر بطريقة الاتصال المباشر مع الوسط الجيلوزي، و على مختلف انواع الفطريات (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) اظهرت نتائج مستخلصات متعدد الفينولات و الالكالويدات تثبيط نسب تصل الى 50% لجميع انواع الفطريات.

الكلمات المفتاحية : *Daphne gnidium* L CCM، نشاط مضاد الفطريات، دراسة كيميائية حيوية.