

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ Saad Dahlab -BLIDA 1-

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie Industrielle

Intitulé du mémoire :

**Screening phytochimique et élaboration d'une
formulation semi-solide anti-inflammatoire à base de
Crassula ovata "Arbre de Jade"**

Présenté par : M^{lle} ZEMOULI Yousra Encadré par : Mr BOUTOUMI Hocine

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Avant tout grâce à Allah miséricordieux tout puissant qui m'a éclairé le chemin vers cette réussite.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr **BOUTOUMI** Hocine, je le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel.

J'exprime ma profonde gratitude aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail, et de l'enrichir par leurs propositions.

Je remercie vivement toute l'équipe du Laboratoire de Recherche Génie Chimique.

Des remerciements particuliers vont également à Mr **METTAI** Muhamed, et Mme **LARBI** Chafika pour leur aide pratique, et leurs encouragements.

Et enfin un grand merci à l'ensemble des enseignants de la spécialité Pharmacie industrielle ; qui ont contribué à notre formation durant nos années d'études, et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À mes chers parents, « Noureddine & Noura », qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir, de m'épauler et de m'encourager pour que je puisse atteindre mes objectifs, ainsi pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné ; aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être. Puisse Dieu leur accorder santé, bonheur et prospérité et longue vie incha'Allah à fin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours. Merci d'être mes parents.

À mes chers frères « Abdelaziz », « Oussama » et « Abdelmalek », et mes chères sœurs « Hafsa » et « Kawthar », pour votre confiance en moi, vos encouragements, vos prières et pour vos encouragements permanents et le soutien moral, ces derniers qui m'ont poussé et me poussent toujours à suivre la voie de l'excellence, à rêver et à réaliser mes rêves.

A ma très adorable amie « Sarah » et ma chère petite nièce « Hasnaa ».

À tous mes enseignants depuis le primaire jusqu'à l'université.

À tous ceux qui font parties de ma vie et tous mes amis.

Résumé

Introduction : Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des composés bioactifs. *Crassula ovata* est utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne pour le traitement des aphtes et ulcérations buccales. **Objectif :** L'objectif de cette étude est la valorisation de la plante *C. ovata*, d'évaluer les activités biologiques de l'extrait méthanolique des feuilles et la formulation d'un gel buccal à base de cette plante. **Méthodes :** L'étude de *C. ovata* a porté sur un screening phytochimique. Un dosage de la teneur en composés phénoliques totaux, et l'évaluation de l'activité antioxydante, anti-microbienne, anti-acide, anti-reflux et anti-inflammatoire. Ensuite, l'élaboration d'une formulation de gel buccal. **Résultats :** Le test de screening phyto-chimique l'extrait méthanolique des feuilles a mis en évidence la présence des polyphénols, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponines, terpénoïdes et quinones libres. Les résultats obtenus ont montré que les extraits possèdent une activité antioxydante (IC₅₀= 0,4 mg/ml), et anti-reflux. Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'extrait méthanolique a montré un pourcentage d'inhibition de la BSA, soit 50% et de l'albumine d'œuf, soit 35 % à la concentration de 125 µg/ml. Ainsi, ces résultats indiquent que l'extrait présente une activité anti-dénaturation significativement bonne en comparaison avec le Diclofénac. **Conclusion :** Cette étude a prouvé qu'il existe des composés actifs dans la plante *Crassula ovata*, et que cette plante possède une activité antioxydante, et une propriété anti-dénaturation.

Mots clés : *Crassula ovata*, Screening Phytochimique, Dosage Polyphénols, Anti-inflammatoire.

ABSTRACT

Introduction : Medicinal plants are an inexhaustible source of bioactive compounds. *Crassula ovata* is used in traditional Algerian medicine for the treatment of mouth ulcers. **Objective:** The objective of this study is the valuation of the plant *C. ovata*, to evaluate the biological activities of the methanol extract of the leaves and the formulation of an oral gel based on this plant. **Methods:** The study of *C. ovata* involves phytochemical screening. A determination of the total phenolic compound content and the evaluation of antioxidant, anti-microbial, anti-acid, anti-reflux and anti-inflammatory activities. After that, the stage of the development of an oral gel formulation. **Results:** the phytochemical screening test of the methanol extract of the leaves showed the presence of polyphenols, alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, terpenoids, and free quinones. The results obtained showed that the extracts have an anti-oxidant activity ($IC_{50} = 0.4$ mg/ml), and anti-reflux effect. For the anti-inflammatory activity, the methanol extract showed a 50% inhibition percentage of BSA and egg albumin, or 35% at 125 μ g/ml. These results indicate that the extract has a anti-denaturation activity in comparison with Diclofenac. **Conclusion:** This study proved that there are active compounds in the plant *Crassula ovata*, and this plant has an antioxidant activity and an anti-denaturation properties.

Keywords : *Crassula ovata*, Phytochemical Polyphenols Dosage, Anti-inflammatory.

ملخص

مقدمة: النباتات الطبية هي مصدر لا ينضب للمركبات النشطة بيولوجيًا. تستخدم *Crassula ovata* في الطب الجزائري التقليدي لعلاج تقرحات الفم. الهدف: الهدف من هذه الدراسة تثمين النبات *C. ovata* ، لتقييم الأنشطة

البيولوجية لمستخلص الميثانول من الأوراق، وتكوين هلام عن طريق الفم يستند إلى هذا النبات. **الطرق:** ركزت دراسة *C. ovata* على الفحص الكيميائي النباتي. تحديد إجمالي محتوى المركب متعدد الفينولات، وتقييم النشاط المضاد للأكسدة ومضادات الميكروبات ومضادات الحموضة ومضاد الارتجاع ومضاد الالتهابات. ثم تطوير تركيبة جل عن طريق الفم. **النتائج:** أظهر اختبار الفحص الكيميائي النباتي لمستخلص الميثانول للأوراق وجود البوليفينول والقلويدات والفلافونويد والعفص والصابونين و التربينويدات والكينونات الحرة. أظهرت النتائج أن المستخلصات لها نشاط مضاد للأكسدة ($IC_{50} = 0,4 \text{ mg/ml}$)، ومضاد الارتجاع. بالنسبة للنشاط المضاد للالتهابات، أظهر مستخلص الميثانول نسبة تثبيط 50% من BSA و 35% من ألبومين البيض، عند $125 \mu\text{g/ml}$. وبالتالي، تشير هذه النتائج إلى أن المستخلص له نشاط جيد للغاية مضاد للتشنج مقارنة بديكلوفيناك. **خلاصة:** أثبتت هذه الدراسة أن هناك مركبات نشطة في نبات *Crassula ovata* ، وأن هذا النبات له نشاط مضاد للأكسدة وخاصية مضادة للتشنج.

الكلمات المفتاحية: *Crassula ovata*، الفحص الكيميائي النباتي، جرعة البوليفينول، مضاد للالتهابات.

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES

Partie Bibliographique

Figure 1.1 : Les principales classes de flavonoïdes.

Figure 2.1 : Photos de l'espèce *C. ovata*.

Figure2.2 : Photo représentative de la plante, et ses fleurs *C. ovata*.

Figure 2.3 : Distribution géographique de la plante *C. ovata*.

Figure 3.1 : Photographie illustrant un aphte au niveau du bord antérieur de la langue.

Partie Expérimentale

Figure1.1 : les échantillons de la plante *C. ovata* récoltée.

Figure1.2 : Démarche méthodologique global.

Figure1.3 : Les feuilles sèches de la plante *C. ovata*.

Figure1.4 : l'extraction à bain ultrason.

Figure1.5 : L'extrait brut des feuilles fraîches.

Figure 1.6 : l'extrait méthanolique de la plante *C. ovata*.

Figure1.7 : Réaction d'un antioxydant avec le DPPH.

Figure2.1 : la teneur en eau de la plante *C.ovata*.

Figure2.2 : Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique.

Figure2.3 : Courbe d'étalonnage de Quercétine.

Figure2.4 : Courbe d'étalonnage de Catéchine.

Figure2.5 : Le spectre IRTF de l'extrait méthanolique de la plante.

Figure2.6 : La variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait méthanolique.

Figure2.7 : Formation de radeau (A) après 5min, (B) après 10min, (C) après 30min, et (D) après 45min.

Figure2.8 : Concentration et inhibition de BSA (l'extrait méthanolique série 1), (diclofénac série 2).

Figure 2.9 : Concentration et inhibition de l'albumine d'œuf (l'extrait méthanolique série1), (diclofénac série2).

Figure 2.10 : Variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement de gel de la résine en fonction de taux de cisaillement.

Figure 2.11 : Variation du module de conservation (élastique) G' et du module de perte (visqueux) G'' de l'émulgel de résine.

LISTE DES TABLEAUX

Partie Bibliographie

Tableau 2.1 : Les composées isolées de la plante *C. ovata*.

Partie Expérimentale

Tableau 1.1: Les instruments et les appareils utilisés.

Tableau 1.2 : Les solvants utilisés.

Tableau 1.3 : Les produits chimiques utilisés pour le screening phyto-chimique.

Tableau 1.4 : Les produits chimiques utilisés pour les tests in vitro.

Tableau 1.5 : Les matières premières pour la formulation du gel.

Tableau 1.6 : Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.

Tableau 1.7 : l'extrait utilisé pour chaque étude.

Tableau2.1 : Rendements d'extractions par Ultrason.

Tableau2.2 : Screening chimique de la plante *C.ovata*.

Tableau2.3 : La teneur en polyphénols; flavonoïdes ; tanins condensés.

Tableau2.4 : Pourcentage d'inhibition d'extrait méthanolique selon les différentes concentrations.

Tableau 2.5 : Observations de la culture bactérienne pour les deux extraits de feuilles de plantes.

Tableau2.6 : Observation de la formulation de trouble.

Tableau 2.7 : Les caractéristiques de la formulation du gel à base des feuilles de *C. ovata*.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE BIBIOGRAPHIE

INTRODUCTION GENERALE

CHAPTRE I : LA PHYTOTHERAPIE

1. La Médecine Traditionnelle (MT).....	01
2. La Phytothérapie.....	01
3. Drogue végétale.....	02
4. Les métabolites secondaires.....	02
5. Classification de métabolites secondaires.....	02

CHAPITRE II : MONOGRAPIR DE *CRASSULA OVATA*.

1. Généralité sur la famille Crassulacée.....	07
2. Le genre <i>Crassula</i>	07
3. Arbre taxonomique de la plante <i>C. ovata</i>	07
4. La nomenclature de <i>C. ovata</i>	08
5. Description botanique de l'espèce <i>Crassula ovata</i>	08
6. Distribution géographique.....	10
7. Utilisation de la plante <i>C. ovata</i> en médecine traditionnel.....	10
8. Études antérieures sur l'espèce <i>C.ovata</i>	11

CAPITRE III : LES APHTES ET LA FORME PHARMACEUTIQUE GEL.

1. Définition et généralité sur les aphtes.....	13
2. Les types cliniques de la stomatite aphteuse récurrent.....	13
3. Les Causes.....	14
4. Le traitement des aphtes.....	15
5. Les formes pharmaceutiques pour le traitement des aphtes.....	15
6. Les gels.....	16

Partie Expérimentale

CHAPITRE I : MATRERIEL ET METHODES

1. Objectif.....	18
2. Le milieu de travail.....	18
3. Matériel.....	18
4. La démarche globale.....	22
5. Séchage de la matière végétale.....	24
6. Perte à la dessiccation.....	24

7. Méthodes d'extraction.....	25
8. Le rendement de l'extraction.....	26
9. Méthodes utilisés pour l'étude phyto-chimique.....	26
10. Quantification des composés phénoliques.....	28
11. Test Infrarouge.....	31
12. Evaluation des activités biologique de <i>Crassula ovata</i>	31
13. Formulation de gel buccale à base de <i>C.ovata</i>	37
14. Contrôle de produit fini	38

CHAPITRE II : RESULTAT ET DISCUSSION

1. Perte à la dessiccation.....	40
2. Rendement d'extraction.....	40
3. Résultats de screening phytochimique de la plante.....	41
4. Résultats de l'étude Quantitative.....	41
5. Résultats Infrarouge.....	44
6. Résultat Activité antioxydante.....	45
7. Résultat d'activité antimicrobienne.....	46
8. Résultats d'activité anti-reflux.....	47
9. Résultats d'activité antiacide.....	47
10. Résultat d'activité anti-inflammatoire	47
11. Contrôle de produit fini.....	50

CONCLUSION GENERALE

APPENDICES

REFERENCES

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisait les plantes trouvées dans la nature, pour traiter, et soigner des maladies [1]. Il a développé des vertus médicinales extraordinaires qui recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique sont basées sur l'analyse et l'observation connues sous le nom de la Phytothérapie [2].

À travers le monde, la médecine traditionnelle forme le mode principal de prestation de soin de santé ou un complément à ce dernier. En effet, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% de la population africaine dépend encore de la médecine traditionnelle en réponse à leurs besoins de santé. Alors que, dans les pays industrialisés, c'est sous forme de thérapies complémentaires que les plantes sont utilisées. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 50% de la population ont eu recours au moins une fois à des compléments alimentaires à base de plantes.

Et malgré les remarquables progrès en chimie organique de synthèse du vingtième siècle, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes [3].

Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires, et constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques. C'est le cas par exemple des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme antimicrobiens, et antioxydants. C'est pour cela que ces produits naturels sont très demandés dans le monde. D'autre part, l'industrie pharmaceutique s'appuie amplement sur les métabolites secondaires végétaux pour l'élaboration de nouveaux médicaments [4].

Parmi les plantes médicinales traditionnelles, la plante *crassula ovata* de la famille Crassulacée est employée dans la médecine traditionnelle Algérienne pour le traitement des aphtes et l'ulcération buccale.

L'aphte est une maladie bucco-dentaire caractérisée par un ou plusieurs ulcères récurrents sur la muqueuse buccale. L'étiologie de la maladie est inconnue et elle est principalement traitée de manière symptomatique et le but du traitement est de diminuer la période des ulcères [5].

Les médicaments les plus fréquemment utilisés pour le traitement des aphtes sont les stéroïdes topiques qui peuvent provoquer plusieurs effets secondaires en cas d'application continue. Les médicaments à base de plantes ont été largement utilisés pour différentes maladies bucco-dentaires [5].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés dans le présent travail à l'étude du profil phytochimique de *C. ovata*, ainsi que les activités biologiques des extraits de cette plante, et l'élaboration d'un gel buccal à base de cette plante

Notre travail sera présenté comme suit:

- Une première partie qui est une synthèse bibliographique. Le premier chapitre est consacré à la phytothérapie et la classification des métabolismes secondaires. Nous avons ensuite abordé un deuxième chapitre sur la monographie de la plante *Crassula ovata*. Enfin dans le troisième chapitre, nous avons abordé généralités sur les aphtes et la forme pharmaceutique gel.
- La deuxième partie qui est la partie expérimentale. Le premier et le deuxième chapitre décrivent le matériel et les méthodes utilisées lors du travail expérimental. Le troisième chapitre de cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus et la discussion.

CHAPTRE I : LA PHYTOTHERAPIE

1. La Médecine Traditionnelle (MT) :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé la MT est « l'ensemble de toutes les connaissances et de toutes les pratiques, explicables ou non, transmises de génération en génération, oralement ou par écrit, utilisées dans une société humaine pour diagnostiquer, prévenir ou éliminer un déséquilibre du bien-être physique, mental, social, moral et spirituel». Même si la médecine traditionnelle ne peut pas se réduire à la seule phytothérapie, la grande majorité des recettes traditionnelles et des traitements traditionnels sont à base de plantes médicinales [1].

2. La Phytothérapie :

Etymologiquement, le terme « phytothérapie » se décompose en deux termes distincts qui sont « phuton » et « therapeia » et qui signifient respectivement « plante » et « traitement » de par leur racine grecque. La phytothérapie est donc une thérapeutique destinée à traiter certains troubles fonctionnels et certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes et de préparations à base de plantes. C'est une thérapeutique inspirée de la médecine traditionnelle basée sur un savoir empirique enrichi au fil des générations. C'est ce qu'on appelle la « phytothérapie traditionnelle », qui est toujours grandement utilisée dans certains pays qui perpétuent les usages de leurs ancêtres [6].

Ce savoir empirique s'est ensuite transformé en analyse botanique pour déterminer par quel mécanisme d'action les plantes pouvaient agir, et quelles étaient les molécules ou les constituants responsables de cet effet thérapeutique. Les principes actifs des plantes n'ont commencé à être isolés qu'à partir du XXème siècle, et une fois ces extraits actifs isolés et standardisés, ont pu émerger les phyto-médicaments, produits soumis à une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), et à des réglementations sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP) pour les préparations magistrales à base de plantes médicinales délivrées exclusivement en officine. C'est donc la pharmacognosie, c'est-à-dire l'étude botanique de la plante et de ses principes actifs, qui a permis de faire passer la phytothérapie d'une thérapie basée sur des connaissances empiriques à une thérapie à part entière, basée sur des données scientifiques vérifiées et contrôlées [7].

Alors qu'au départ les plantes étaient transformées grâce à des techniques plutôt rudimentaires (broyées, macérées ou infusées en entier), mais qui permettaient déjà d'extraire une bonne partie des substances actives, aujourd'hui la phytothérapie se décline sous plusieurs formes en fonction de la méthode d'extraction de la drogue végétale :

- Les tisanes.
- Les formes sèches : gélules, et comprimés à avaler.
- Les formes liquides : macérations, teintures, et extraits fluides.
- Les formes semi-solides : pommades, crèmes, gel, et onguents [7].

3. Drogue végétale :

La drogue végétale correspond à la partie de la plante possédant les propriétés thérapeutiques. C'est elle qui possède la plus grande concentration en principe(s) actif(s) auquel(s) on attribue les vertus médicinales. Ces drogues végétales peuvent être des bourgeons, sommités floraux, racines, tige, graine, feuille, fruit, exsudats mais peuvent aussi être la plante entière dans certains cas [8].

4. Les métabolites secondaires :

Les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent être considérées comme des substances indirectement essentielles à la vie des plantes [9].

5. Classification des métabolites secondaires :

On distingue classiquement trois grandes catégories des métabolites secondaires Chez les végétaux [10] :

- 1) Les alcaloïdes.
- 2) Les composés phénoliques.
- 3) Les composés terpéniques.

5.1. Les alcaloïdes :

Un alcaloïde est une substance organique azotée relativement stable d'origine végétale [11]. Ils précipitent généralement avec des réactifs monométalliques (réactif de Dragendorff) et sont très souvent biologiquement actifs [10].

La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale (il existe des exceptions dans le monde animal), Cette famille de métabolites secondaires a été particulièrement étudiée

du fait des enjeux économiques qui y sont associés. Leurs actions biologiques les place également au cœur de phénomènes d'interactions de défense face aux pressions biotiques (herbivores, microorganismes) [10].

On estime que les plantes produisent environ 12 000 alcaloïdes différents [12], qui peuvent être organisés en groupes.

5.1.1. Classification des alcaloïdes :

On distingue généralement 3 types :

- a) Les proto-alcaloïdes : l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils sont élaborés à partir d'acides aminés. Exemple : Colchicine.
- b) Les pseudo-alcaloïdes : Ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés. Exemple : Caféine.
- c) Les alcaloïdes vrais : Ils comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique et sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé. Ils possèdent une activité pharmacologique marquée [13].

5.2. Les composés phénoliques :

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [14].

Les polyphénols sont les antioxydants les plus présents dans la nature et aussi dans nos assiettes. Ils permettent aux plantes de se défendre contre les phénomènes d'oxydation, certaines agressions extérieures et contre le pourrissement [15].

5.2.1 Classification des composés phénoliques :

Les composés phénoliques (ou polyphénols) représentent un groupe de métabolites secondaires complexe comportant plusieurs familles : Dérivés des acides benzoïque et cinnamique, flavonols, flavones, isoflavanones, flavanes, flavanones, chalcones, aurones et stilbène. Certains sont des précurseurs de polymères pariétaux, comme la lignine et la subérine. D'autres sont des polymères intracellulaires tels que les tanins condensés et les tanins hydrolysables [16].

a) Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (sauf exceptions dont les anthocyanes). La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène [10].

Les flavonoïdes sont désormais considérés comme un ingrédient indispensable dans une variété d'applications nutritionnelles, pharmaceutiques, médicales et cosmétiques. Ceci est attribué à ses propriétés antioxydants, anti-inflammatoires, antiallergiques, antiulcérogènes, antibactériennes, antivirales, antimutagènes et anti-cancérigènes ainsi qu'à sa capacité à moduler la fonction enzymatique cellulaire clé. Ils ont également des actions positives sur le diabète et les maladies d'Alzheimer [17].

i) Classification des flavonoïdes :

Les flavonoïdes peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- α -pyrone [18].

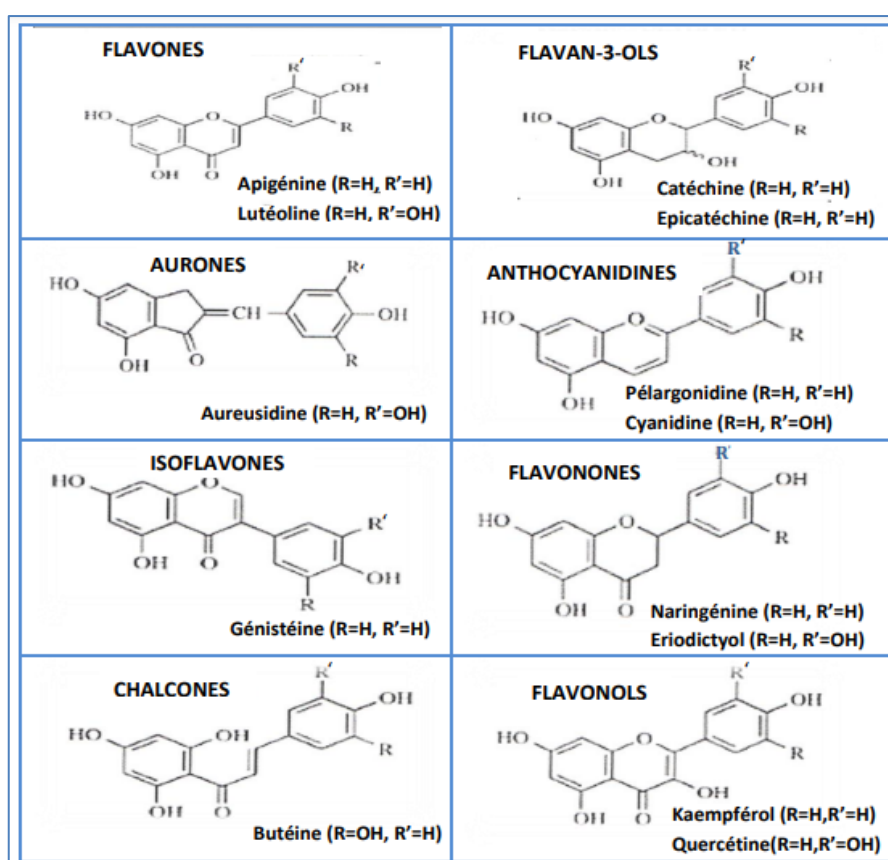


Figure 1.1 : Les principales classes de flavonoïdes.

b) Les tanins :

Les tanins sont des substances d'origine végétale non azotées à structure amorphe, mais comportent toujours une partie polyphénolique. Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules (comme les protéines) et des liaisons entre les fibres de collagène ; d'où viennent la plupart de leurs propriétés [19].

Elles possèdent des propriétés antiseptiques mais également antibiotiques, astringentes, anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, hémostatiques, vaso-constrictrices et aussi anti-oxydantes [20].

5.3 Les terpénoïdes (isoprénoïdes) :

Les terpénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes ; l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes. De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles et des molécules hautement polymérisées [10].

Les terpénoïdes sont responsable de l'odeur typique de nombreuses plantes et ils interviennent dans la stabilisation des membranes cellulaires, régulateurs de la perméabilité et des réactions enzymatiques. Aussi, ils ont démontré leur efficacité dans la chimioprévention et la chimiothérapie du cancer et expriment des activités antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antihyperglycémiques, anti-inflammatoires et antiparasitaires [10].

CHAPITRE II : MONOGRAPHIE DE *CRASSULA OVATA*

1. Généralités sur la famille Crassulacée :

Les Crassulacées sont une famille de plantes à fleurs dicotylédones, composée de 34 ou 35 genres avec environ 1400 espèces, généralement herbacées, parfois sous-arbustes ou arbustes, distribués dans le monde entier, se produisant principalement dans l'hémisphère nord et en Afrique australe. Les tiges sont pour la plupart succulentes. Les feuilles sont généralement simples, alternes, opposées ou verticillées [21].

Les études pharmacologiques ont montré de nombreuses activités biologiques comme : antioxydant, anti-hyperglycémiant, antimicrobien, cytotoxique/anticancéreux, anti-inflammatoire et anti-nociceptif, hépato protecteur, analgésique, antiarthritique, antipaludéen, insecticide et anti-hypertensive [22].

2. Le genre Crassula :

Le genre *Crassula* est l'un des genres succulents les plus diversifiés, variant morphologiquement. Il existe plus de 300 espèces dans le genre, dont environ 150 se trouvent en Afrique australe. Les classifications précédentes incluait la famille des

Crassulaceae dans les Rosales, mais maintenant cette famille est incluse dans l'ordre des Saxifragales.

Crassula est l'un des plus grands genres de famille Crassulaceae qui comprend environ 150 espèces [23].

3. Arbre taxonomique de la plante *C. ovata* :

D'après, [23] la plante *C. Ovata* est classée comme suite :

- ❖ **Royaume** : Plantes.
- ❖ **Classe** : Dicotylédones.
- ❖ **Famille** : Crassulacées.
- ❖ **Genre** : Crassule.
- ❖ **Espèces** : *Crassule ovale*.
- ❖ **Nom scientifique** : *Crassula ovata* (Mill.) Druce.

4. La nomenclature de *C. ovata* :

Le nom Crassula est diminutif du latin « crassus », qui signifie épais ou gras, en référence à la nature charnue du genre dans son ensemble, Le nom d'espèce Ovata signifie en forme d'œuf, en référence à la forme des feuilles [23].

4.1. D'autres Synonymes de l'espèce :

- *Cotyledon ovata*.
- *Toelkenia ovata*.
- *Crassula argentea*.
- *Crassula portulacea*.
- *Crassula obliqua*.
- *Crassule articulée*.
- *Crassula nitida*.
- *Crassula lucens* [23].

5. Description botanique de l'espèce *Crassula ovata* :

Dans son habitat d'origine, *C. ovata* est un grand arbuste à feuillage persistant compact, très ramifié, mesurant généralement 1 à 1,5 m de haut, parfois jusqu'à 5 m, avec des feuilles brillantes, gris-vert foncé, ovales, succulentes et arrondies (Figure 2.1). Têtes de fleurs roses en hiver-printemps [23].



Figure 2.1 : Photos de l'espèce *C. ovata*.

Les tiges sont épaisses, ramifiées, charnu et juteux, jusqu'à 30-45 cm de haut [24]. L'écorce jeune est lisse et argentée; chez les plantes plus âgées, l'écorce s'exfolie en bandes horizontales brunâtres. Les branches sont courtes, succulentes, de couleur gris-vert, devenant brunes et ligneuses à mesure qu'elles mûrissent.

Les feuilles sont caulinaires, sessiles, longues de 30 à 90 mm, et larges de 18 à 40 mm, obovale à elliptiques, à marge entière, souvent bordées de rouge corné ; ils ont un sommet arrondi avec une pointe pointue distincte. Elles sont généralement regroupées en 4 paires ou plus, opposées, avec une paire disposée à angle droit par rapport à la suivante, et ils sont regroupés vers les extrémités des branches. Les vieilles feuilles inférieures sont naturellement caduques.

La plante est couverte de masses de fleurs en forme d'étoiles roses teintées de blanc parfumées (Figure2.2) en grappes serrées, et arrondies pendant les mois d'hiver frais (juin-août), produites en réponse aux longues nuits [24].



Figure 2.2 : Photo représentative de la plante, et ses fleurs *C. ovata* [25].

6. Distribution géographique :

C. ovata est originaire d'Afrique du Sud, où il pousse dans la province du Cap, au KwaZulu-Natal, et dans le Transvaal. Dans l'Eastern Cape, il est assez commun de Willowmore à East London, et vers le nord jusqu'à Queenstown. On le trouve également au Mozambique, et au Swaziland. *C. ovata* est cultivée comme plante ornementale d'intérieur en Europe, en Amérique du Nord, en Asie de l'Est depuis plus de cent ans [23].

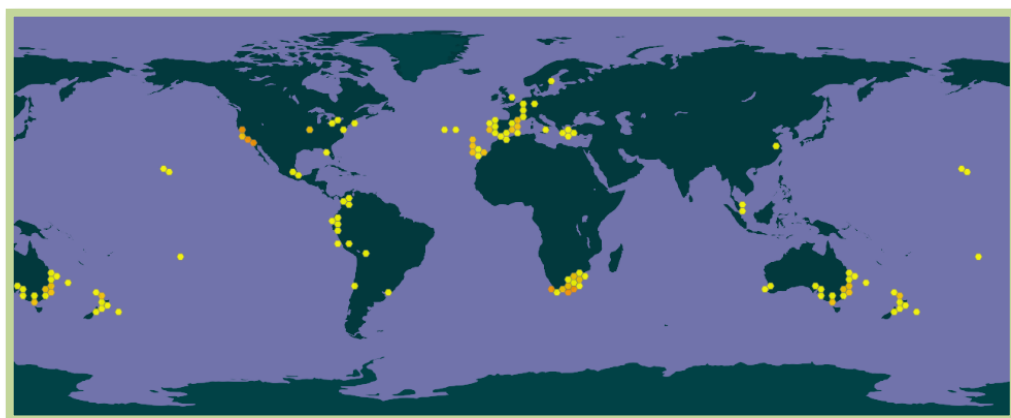


Figure 2.3 : Distribution géographique de la plante *C. ovata* [26].

7. Utilisation de la plante *C. ovata* en médecine traditionnelle :

Traditionnellement, de nombreuses communautés ont développé une habitude d'utiliser l'extrait fluide des feuilles pour traiter les verrues. La feuille de *Crassula ovata* a été coupée en deux et la face intérieure humide est appliquée sur la verrue pendant quelques heures, ou pendant la nuit. La croissance disgracieuse tomberait avec seulement trois applications [27].

En Afrique australe, les racines de *C. ovata* sont une source de nourriture traditionnelle des Khoi et d'autres tribus; les racines sont râpées, cuites et mangées avec du lait épais. Les feuilles sont également utilisées en médecine : bouillies dans du lait, elles sont un remède contre les diarrhées et aussi utilisées pour traiter l'épilepsie et l'enlèvement des cors et utilisé comme purgatif [23].

Dans les cultures asiatiques, en particulier en Chine, le thé de cette plante est utilisé pour traiter les symptômes du diabète [28].

Au Kenya la plante *C. ovata* est principalement cultivée dans les fermes locales pour son effet ornemental. Cependant certaines personnes gardent aussi cette plante pour ses valeurs médicales. La communauté Kamba croit que le jus extrait de cette plante aide à guérir les brûlures de la peau. D'autres communautés comme les Maasai l'utilisent comme un soulagement pour les maux d'estomac [29].

De l'utilisation traditionnelle de nombreuses communautés Nord-est de l'Inde (en particulier à Manipur), il est révélé que *C. ovata* est principalement utilisée dans le traitement du diabète et pour guérir certaines infections. Ils buvaient ainsi le jus des feuilles de la plante [30].

8. Études antérieures sur l'espèce *C.ovata* :

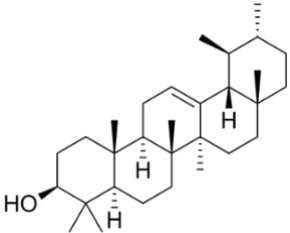
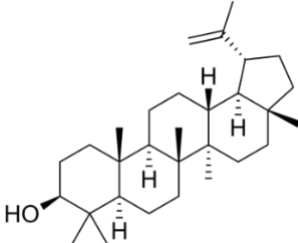
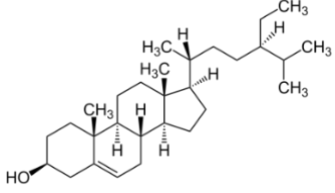
8.1. Screening phytochimique :

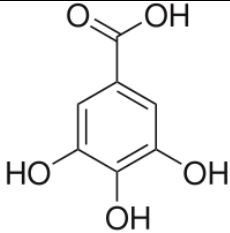
Le screening phytochimique des feuilles de *Crassula ovata* a révélé la présence de plusieurs composés bioactifs qui pourraient être responsables des diverses propriétés médicinales de cette plante. La présence de saponines, phytostérols, phénols, stéroïdes, terpénoïdes, flavonoïdes, glucides et protéines ont été vus dans les extraits de la plante [30].

8.2. Isolement, et identification des principaux constituants isolés de *C. ovata* :

4 composés isolés de *Crassula ovata* lors de la première tentative enregistrée sont présentés dans le tableau (tableau 2.1).

Tableau 2.1 : les composés isolés de la plante *C. ovata*.

Le composé	Structure chimique	Activité pharmacologique
α -amyrine [37]		Notamment des effets antitumoraux [31], anti-inflammatoires [32], anxiolytiques, [33] et hépatoprotecteurs [34].
Lupéol [37]		Anti-inflammatoires, antioxydantes, anticancéreux, antimicrobiens et autres effets pharmacologiques [35].
β -sitostérol [37]		Une action inflammatoire a été démontrée pour le β -sitostérol [36].

Acide gallique [38]		Activité antibactérienne, Antioxydante.
---------------------------	---	---

8.3. Étude de toxicité :

Les études de toxicité aiguë ont été réalisées sur des souris avec poids uniformes. Les animaux ont été soumis à des conditions de jeûne la nuit avec seulement un accès à l'eau potable. Différentes doses des extraits alcooliques ont été données et les animaux ont été maintenus sous observation pendant 24h pour voir la mortalité. La période de suivi s'étalait sur une période de 14 jours et donc aucune mortalité n'a été observée lors de la prise de doses allant jusqu'à 2000 mg/Kg. Par conséquent, 200 mg/kg ont été choisie comme dose maximale de sécurité [37].

CHAPITRE III : LES APHTES ET LA FORME PHARMACEUTIQUE GEL

1. Définition et généralités sur les aphtes :

L'aphte est un aspect sémiologique particulier d'ulcération de la muqueuse ; particulièrement douloureuse, inflammatoire et récidivante. C'est la forme la plus fréquente d'ulcération buccale. Les aphtes sont provoqués par une vascularite leucocytoclasique. Celle-ci induit une nécrose tissulaire à l'origine d'une ulcération primaire, dont le diamètre et la profondeur varient en fonction de la taille du vaisseau atteint. L'aphtose est définie par des poussées récidivantes d'au moins 4 fois par an [38].

La prévalence de la maladie a été rapportée différemment dans les études ; par exemple, dans certaines enquêtes, sa prévalence dans la population générale serait comprise entre 5 et 50 % et dans des populations spécifiques telles que les étudiants et les militaires, elle serait d'environ 50 à 60 % en raison de tâches stressantes quotidiennes comme les examens, etc. [39].

Les aphtes se forment la plupart du temps au niveau de la muqueuse buccale et en particulier sur la face interne des joues et des lèvres, sur la langue, les gencives, le palais ou la gorge (Figure 3.1). Les aphtes peuvent se retrouver dans toute la cavité buccale mais le plus souvent dans la partie antérieure de la bouche [40].



Figure 3.1 : Photographie illustrant un aphte au niveau du bord antérieur de la langue [41].

2. Les types cliniques de la stomatite aphteuse récurrente :

La présentation la plus fréquente est la stomatite aphteuse récurrente mineure : petits ulcères douloureux récurrents, ronds, clairement définis, qui guérissent en 10 à 14 jours sans laisser des cicatrices.

Les lésions majeures de SAR sont plus grandes (supérieures à 5 mm), peuvent durer 6 semaines ou plus et sont souvent cicatricielles.

La troisième variété de SAR est constituée d'ulcères herpétiformes, qui se présentent sous la forme de multiples petits groupes de lésions ponctuelles qui peuvent fusionner pour former de grands ulcères irréguliers et peuvent durer de 7 à 10 jours [42].

3. Les Causes :

Il n'y a pas d'étiologie définie connue pour l'aphtose, bien que certains facteurs soient considérés comme importants tels que [43] :

- Des irritations ou petites blessures dans la cavité buccale.
- Le stress, et la fatigue.
- Des virus (herpès, virus à l'origine du syndrome mains-pieds-bouche chez l'enfant ou entérovirus). Chez les petits enfants, de moins de 3 ans, les virus sont souvent à l'origine des aphtes.

- Les drogues et le tabac.
- Les carences nutritionnelles.
- Les changements hormonaux.
- Les facteurs génétiques.
- La consommation de certains aliments (noix, gruyère, fraises, tomates...).

L'aphtose est parfois associée à des affections gastro-intestinales (maladie cœliaque, rectocolite hémorragique et maladie de Crohn), des déficiences nutritionnelles (fer, folates...), des désordres immunitaires (infection par le virus de l'immunodéficience acquise, neutropénies) et des syndromes rares. La maladie de Behçet est une vasculite inflammatoire, chronique, dont l'expression principale est une aphtose bipolaire récidivante. Les ulcérations buccales, qui peuvent être liées à des causes variées, constituent les principaux diagnostics différentiels d'une aphtose [39].

On a récemment suggéré que les radicaux libres jouent un rôle important dans l'étiologie de l'aphtose. Une augmentation de la production de radicaux libres ou l'affaiblissement des systèmes de défense anti-oxydants provoquent une condition appelée le stress oxydatif qui peut entraîner des lésions tissulaires. En raison du rôle établi du stress oxydatif dans l'inflammation et du caractère inflammatoire de la stomatite aphteuse récurrente, ce stress oxydatif semble être l'un des facteurs à l'origine de cette affection. Selon cette découverte, l'utilisation d'antioxydants pourrait être efficace dans la guérison des aphtes [44].

4. Le traitement des aphtes :

Le traitement des aphtes est symptomatique [39] :

- Les traitements locaux anesthésiques.
- Les antalgiques.
- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens
- Corticoïdes locaux
- Sucralfate (utilisé pour traiter les ulcères d'estomac, le reflux gastro-œsophagien, la rectite radique et l'inflammation de l'estomac et pour prévenir les ulcères de stress) sont utilisés en première intention.
- Les pansements isolants : la simple application de bioadhésif protecteur (carboxyméthylcellulose, polymères synthétiques, cyanoacrylate) pourrait aider à

diminuer les douleurs. Cela pourrait être une des explications de l'efficacité supplémentaire des dermocorticoïdes dans une pâte adhésive.

5. Les formes pharmaceutiques pour le traitement des aphtes :

Les pommades, les crèmes, les pâtes, les émulsions et les gels sont des formulations topiques pour des maladies telles que les aphtes. L'observance et l'acceptation des patients sont extrêmement importantes pour les produits topiques oraux. Les pommades, les crèmes et certaines émulsions sont rarement utilisées pour le traitement topique oral, tandis que les patients acceptent moins bien l'application de pommades dans la bouche. La base de formulation doit avoir une mucoadhésion acceptable afin que le médicament reste plus longtemps sur le lieu d'application. Les émulsions ont une faible mucoadhésion, et sont rapidement éliminées par la salive. Les pâtes et les gels permettent une adhérence plus longue et permettent à la fois la protection de la lésion et la libération du médicament [44].

6. Les gels :

6.1. Définition :

C'est une préparation semi-solide pour application cutanée, destinée à être appliquée sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique. Elles présentent un aspect homogène. Elles sont constituées d'un excipient simple ou composé, dans lequel sont habituellement dissous ou dispersés un ou plusieurs principes actifs [45].

6.2. Types de gels :

- a) Gels Lipophiles: c'est des oléo gels dont l'excipient (substance qui donne une consistance donnée physique ou gustative) est la paraffine ou l'huile grasse gélifiées par de la silice colloïdale.
- b) Gels Hydrophiles : c'est un hydrogel dont l'excipient est l'eau, glycérol, gélifiés par l'amidon, dérivés de cellulose ou des carbomères [45].

6.3. Constituants du gel hydrophile :

- a) **Le polymère:** Il se présente sous forme de poudre. Dispersés dans l'eau, les polymères se déploient graduellement jusqu'à atteindre mille fois leur volume après neutralisation. Ce gonflement des structures polymériques donne naissance à des micros-gels ; c'est le contact entre les micro-gels qui est responsable des propriétés gélifiantes.

Le carbopol se présente comme une poudre blanchâtre farineuse très légère. Il est soluble dans l'eau et l'alcool et gonfle fortement en contact d'une base.

- b) **Agent neutralisant** : Le triéthanolamine qui est un composé chimique organique. Il agit comme une faible base pour neutraliser le pH de la préparation galénique, en même temps c'est un agent de viscosité. Le nom commercial est la trolamine. Son apparence est liquide incolore, très visqueux, miscible dans l'eau mais il est inflammable et c'est ce qui nécessite une très grande sécurité au cours de sa manipulation.
- c) **Le conservateur** : Les conservateurs sont des substances d'origine naturelle ou synthétique dont le rôle principal est de prévenir le développement des microbes (bactéries et champignons).
- d) **La glycérine (glycérol)** : La glycérine est un liquide visqueux transparent et inodore, miscible dans l'eau et l'alcool, et même si elle n'est pas miscible dans l'huile, elle peut être intégrée à des produits gras solides comme les baumes. La glycérine est également émolliente, et on l'utilise même dans le domaine médical pour accélérer la cicatrisation grâce à son action sur la synthèse de collagène. Sa texture sirupeuse lui permet d'être utilisée en tant que stabilisant et épaississant.
- e) **Le véhicule** : L'eau est un élément essentiel à la formation du gel pour favoriser la dispersion du carbopol.

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATRERIEL ET METHODES

1. Objectif :

L'objectif de notre étude est la valorisation de *crassula ovata*, à savoir le screening phytochimique, le dosage des polyphénols, de tanins condensés, et le dosage des flavonoïdes, ainsi que l'évaluation in vitro de leurs activités biologiques. De plus, nous allons faire la formulation d'un gel buccal à base d'extrait de cette plante.

2. Le milieu de travail :

Ce travail a été réalisé en quatre mois au sein de différents laboratoires :

- ✓ Laboratoire de Recherche Génie Chimique du Département des Génies des Procèdes à l'université Saad Dahleb-Blida1.
- ✓ Laboratoire de Contrôles Microbiologiques de Saidal à El Harrach pour la réalisation de l'activité anti-microbienne.

3. Matériel :

3.1. Les instruments :

Le tableau (1.1) représente les instruments et les appareils utilisés au cours de ce travail.

Tableau 1.1: Les instruments et les appareils utilisés.

Instrument	Marque
Balance	OHAUS ADVENTURER
Bain à ultrason	X-tra 30H Elmasonic
Evaporateur Rotatif (Rota-vap)	Heidilph Laborota 4001
PH mètre	HANNA Instruments HI2211
Infrarouge	SHIMADZU FTIR-8900
Spectrophotomètre UV/Visible	SHIMADZU UV-1800
Homogénéisateur	IKA ULTRATURRAX T25
Centrifugeuse	Hettich EBA 20

3.2. Les produits chimiques :

- Les solvants utilisés dans cette étude dans le tableau (1.2).

Tableau 1.2 : les solvants utilisés.

Solvant	Marque
Méthanol (99%)	BIOCHEM
Ethanol (96%)	SPECILAB
Diméthyle Sulfoxyde DMSO (99%)	BIOCHEM

- Les produits chimiques utilisés pour le screening phytochimique sont cités dans le tableau suivant:

Tableau 1.3 : Les produits chimiques utilisés pour le screening phyto-chimique.

Produits chimiques
Acide chlorhydrique
Réactifs de Mayer
Réactifs de Wagner
Chlorure ferrique
Copeaux de magnésium
Chloroforme
Acide sulfurique
Hydroxyde de sodium
Carbonate de sodium
Folin-Ciocalteu
Chlorure d'aluminium
Vanilline
Acétate de sodium

- D'autre produite chimique utilisées (tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Les produits chimiques utilisés pour les tests in vitro.

	produite chimique
Infrarouge	KBr
Activité anti-oxydante	DPPH
Activité anti-inflammatoire in vitro	Sérum Bovin d'Albumine BSA, Albumine de l'œuf, et Diclofénac Sodique.

3.3. Matière première pour la formulation du gel buccal :

Les matières premières ainsi que les concentrations utilisées dans la formulation sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 1.5 : Les matières premières pour la formulation du gel.

Matière	Quantité
Carbopol 940	1 g
Glycérol	4 g
Thrithanolamine	Qts
Eau distillée	Qts pour 100g

3.4. Matériel végétal :

Les échantillons destinés à l'expérimentation comprennent les feuilles fraîches de la plante *Crassula ovata*. Ses feuilles ont été cueillies manuellement dans la région de Blida (Nord de l'Algérie) durant le mois d'Avril 2023 et conservées moins de deux heures avant l'extraction (figure1.1).

L'espèce récoltée a été identifiée par le botaniste : Mr METTAI Mhamed du Laboratoire de botanique médicale et cryptogamie, Département de pharmacie, Faculté de médecine, Université Saad Dahlab -1-, Blida, Algérie.



Figure 1.1 : les échantillons de la plante *C. ovata* récoltée.

3.5. Matériel microbiologique:

Pour évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons testé cette dernière sur 5 micro-organismes (3 bactéries pathogènes et 2 levures), qui sont des souches internationales ATCC (American type culture collection). Le tableau (1.6) fournit les caractéristiques des souches microbiennes testées.

Tableau 1.6 : Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées.

Nom de souche	N° ATC C	Gram	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	<i>Micrococcaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Escherichiacoli</i>	4157	-	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Aspergillus Bacillus</i>	1460 4	/	<i>Bacillaceae</i>
<i>Candida albicans</i>	2443 3	/	<i>Saccharomyceta ceae</i>

3.6. Les milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés pour réaliser les tests microbiens sont les suivants :

- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries vis-à-vis les extraits.
- La gélose Saboraud pour l'isolement et l'entretien des levures.

4. La démarche globale :

La démarche globale de ce travail (Figure 1.2) s'articule autour de quatre produits issus de la plante *C. ovata* : l'extrait méthanolique des feuilles fraîches EMF et sèches EMS, l'extrait éthanolique des feuilles fraîches, l'extrait méthanolique des feuilles sèches et l'extrait brut des feuilles fraîches.

L'utilisation de chaque extrait pour les différentes études montrées dans le tableau (1.7).

Tableau 1.7 : l'extrait utilisé pour chaque étude.

L'étude	L'extrait	
Screening phytochimique	Extrait méthanolique des feuilles fraîches	Extrait méthanolique des feuilles sèches
Quantification des composés phénoliques	Extrait méthanolique des feuilles fraîches	
Test Infrarouge	Extrait méthanolique des feuilles fraîches	
Activité antioxydants	Extrait méthanolique des feuilles fraîches	Extrait brut des feuilles fraîches
Activité anti-reflux\ anti-acide\ anti-inflammatoire	Extrait méthanolique des feuilles fraîches	

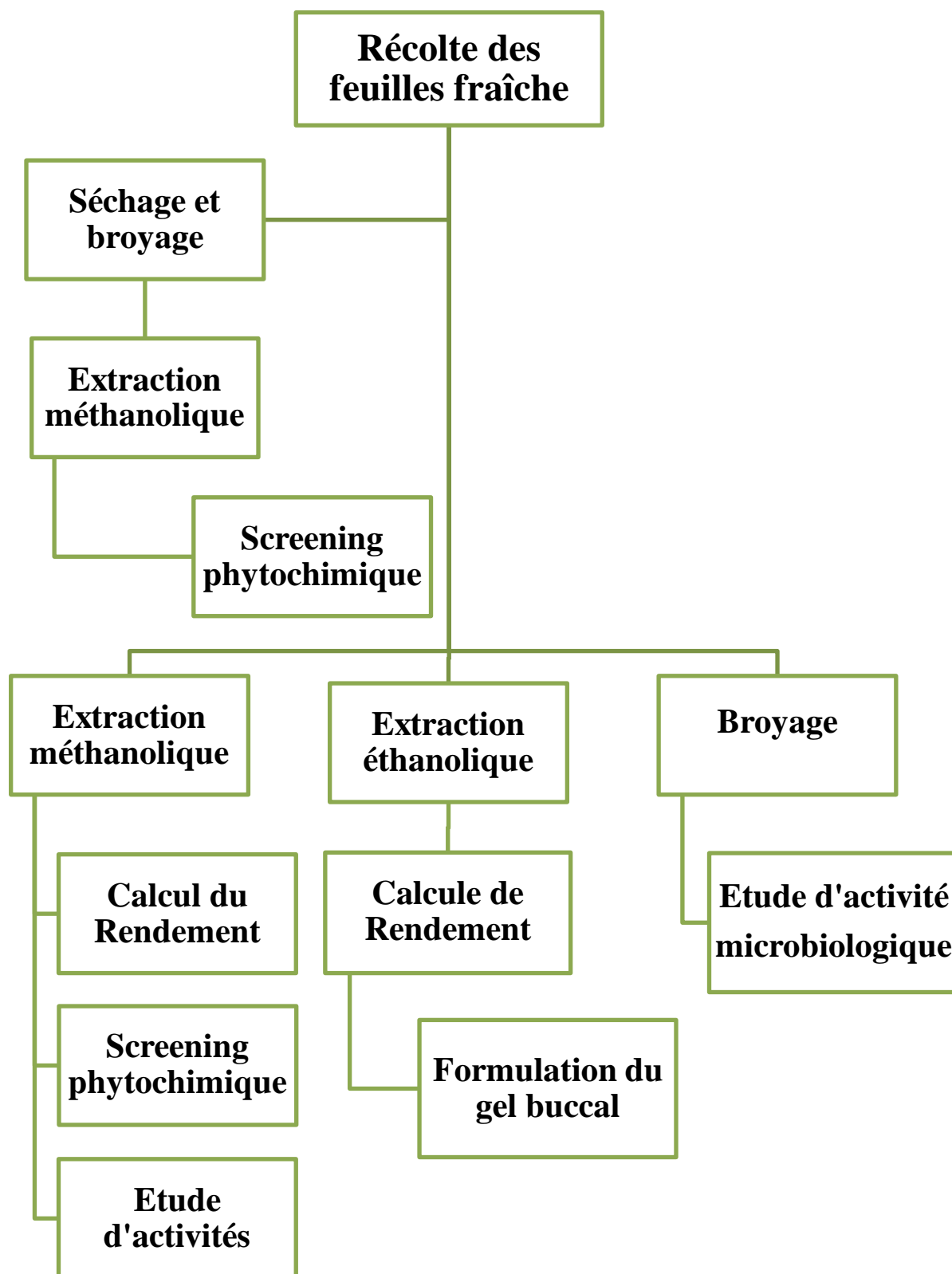


Figure1.2 : Démarche méthodologique global.

5. Séchage de la matière végétale :

La technique de séchage des plantes consiste à extraire l'eau contenue dans la plante. Généralement, le séchage se fait par évaporation de l'eau de la plante dans l'air libre pour obtention d'un produit stabilisé dans l'air et sans risque de dégradation.

Dans notre cas, le séchage de la plante a été très difficile en raison de sa structure anatomique. La plante récoltée est séchée dans un étuve à 50°C pendant 3j (figure 1.3).



Figure1.3 : Les feuilles sèches de la plante *C. ovata*.

6. Perte à la dessiccation :

Il s'agit de la détermination de la quantité d'eau présente dans la matière végétale.

Pour la détermination du taux d'humidité du matériel végétal (Pharmacopée Européenne 2020), il a été établis une prise d'essai d'un poids de 4,103g (pesée avec précision), cette dernière a été séchée dans une étuve réglée à une température de 105° C jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H(\%) = 100 \times (M0 - M1) / M0$$

H(%) : Taux d'humidité.

M0 : Prise d'essai de la plante avant le séchage, exprimée en g.

M1 : Prise d'essai de la plante après le séchage, exprimée en g.

7. Méthodes d'extraction :

L'extraction a été effectuée par la méthode de sonication à l'aide d'un bain à ultrason ; plusieurs études effectuées ont montré une grande efficacité de la sonication vis-à-vis d'autres méthodes d'extraction classique.

7.1.Extraction méthanolique des feuilles fraîches EMF :

Les feuilles fraîches sont rincées soigneusement avec de l'eau distillée puis coupées en petits morceaux. Le matériel végétal est pesé, placé dans un bécher, puis on ajoute une quantité suffisante de solvant méthanol, le tout est introduit dans un bain à ultrason (X-tra 30H Elmasonic) à une température de 20°C pendant 50 min (Figure 1.4).



Figure 1.4 : l'extraction à bain ultrason.

Le mélange est filtré afin d'obtenir un extrait méthanolique (EMF). Le filtrat est ensuite concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidilph Laborota 4001) dans des paramètres de 50°C à 60°C et d'une rotation de 90 tr/min pour éliminer le solvant et récupérer l'extrait sec avec une filtration sous vide.

7.2.Extraction éthanolique des feuilles fraîches :

En procédant aux mêmes étapes précédentes mais en utilisant l'éthanol comme solvant. Le filtrat est ensuite concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidilph Laborota 4001) réglé à 90°C et la rotation de 90 tr/min pour éliminer le solvant et ainsi récupérer l'extrait sec avec une filtration sous vide.

7.3.Extraction méthanolique des feuilles sèches EMS :

Après séchage, une quantité de 100 g du matériel sec a été broyée. Dès lors, on applique les mêmes étapes d'extraction méthanolique.

7.4.Extraction brut des feuilles fraîches :

On obtient cet extrait en broyant les feuilles fraîches de la plante, puis en filtrant le mélange afin de récupérer le filtrat (figure1.5). On l'utilise ainsi pour l'étude de l'activité anti-microbienne de la plante.



Figure1.5 : L'extrait brut des feuilles fraîches.

8. Le rendement de l'extraction :

Le rendement de l'extraction est calculé en pourcentage du rapport de la masse d'extrait obtenu sur la masse totale de la plante utilisée dans l'extraction.

$$\text{Rendement(\%)} = (M_0 / M_1) \times 100$$

M₀ : Masse en gramme de l'extrait brut évaporé.

M₁ : Masse en gramme de la matière végétale.

9. Méthodes utilisées pour l'étude phytochimique :

Le screening phytochimique est un moyen pour mettre en évidence la présence des groupes des familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Cette étude effectuée sur deux extraits méthanoliques de la plante (EMF, EMS) sans l'évaporation de solvant. Les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation des complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation des complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration [46].

9.1. Identification des polyphénols :

0.2ml d'extraits sont ajoutés à 0.8ml de la solution de carbonate de sodium (7,5%), après l'agitation, 1ml de la solution de Folin-ciocalteu est ajoutée à l'ensemble après 20minutes d'incubation à l'obscurité. L'apparition de la couleur bleue confirme la présence des polyphénols [47].

9.2. Identification des alcaloïdes :

Introduire 1 ml de chaque extrait dans un tube à essai en ajoutant 5 ml d'HCl 1% à chaque tube, puis chauffer les tubes au bain marie. L'un des tubes est traité par le réactif de Mayer, l'autre par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes [48].

Les réactifs de Mayer et de Wagner sont préparés comme suite :

- Réactif de Mayer : Dissoudre 1,358 g d'HgCl₂ dans 60ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- Réactif de Wagner : Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100ml avec l'eau distillée.

9.3. Identification des Flavonoïdes :

À 1 ml de chaque extrait on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl) concentré. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange [49].

9.4. Identification des Tanins :

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 2 ml de chaque extrait, 1 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ diluée à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins. L'apparition d'une coloration verte foncée indique la présence des tanins catéchiques. L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des tanins galliques [50].

9.5. Identification des Saponines :

À 5ml de chaque extrait on ajoute 10 ml d'eau distillée, le tout est agité avec énergie pendant 15 minutes. Ensuite, le mélange est laissé au repos pendant 15 min. La persistance de la mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence des saponines [51].

9.6. Identification des Terpénoïdes :

A 5ml d'extrait on ajoute 2 ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré, s'il y a une formation de 2 phases et un couleur marron à l'interphase indique la présence de terpénoïdes [52].

8.7. Identification des Quinones libres :

La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10 lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet [53].

10. Quantification des composés phénoliques :

10.1. Dosage des Polyphénols Totaux :

Principe :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par le réactif colorimétrique Folin-ciocalteu (FC) selon la méthode de Dewanto [54] cité par Chetoui [55]. L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-ciocalteu. Ce dernier, est de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques, et possède une absorbance maximale à environ 765 nm [56].

La réaction d'oxydation est accélérée en milieu alcalin (dans notre cas, par un ajout de carbonate de sodium) et pour réaliser les courbes de calibration, l'acide gallique est souvent pris comme référence [56].

Protocole :

Nous avons utilisé le protocole [57] avec quelques modifications.

À l'aide d'une micropipette, on introduit un volume de 200µl d'extraits dissous dans le méthanol à une concentration de 2mg/10ml dans des tubes à essai avec 1000 µl de réactif de Folin-Ciocalteau 1%. On mélange bien et on laisse reposer pendant 4 min. On ajoute au mélange précédent 800µl d'une solution de carbonate de sodium 7.5% agité manuellement et on laisse incuber durant 2h à la température ambiante. L'absorbance de la solution est mesurée à 765nm contre un blanc à l'aide d'une UV-visible. La courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide gallique comme un standard par la même méthode et dans les mêmes conditions opératoires.

Expression des résultats :

La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire $y = a x + b$ réalisée par un standard étalon « acide gallique » à différentes concentrations (0-100 µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (µg EAG/g).

10.2. Dosage des Flavonoïdes totaux :

Principe :

La méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) a été utilisée pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre qui forme une liaison covalente avec le trichlorure d'aluminium (figure II.4) ce qui donne des complexes jaunâtres, ceci se traduit par le fait que le métal (Al) a perdu deux électrons pour s'unir à deux oxygènes de la molécule phénolique agissant comme donneurs d'électrons.

Le complexe jaune présente une absorbance maximale à 430 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présents dans l'échantillon [58].

Protocole :

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode décrite par [59]

æ quelques modifications. Dans un tube à essai, 1,5ml d'extrait dissous dans le méthanol à une concentration 10mg/ml ont été ajoutés à un volume égal d'une solution de 2 % d' AlCl_3 , le mélange a été vigoureusement agité et on laisse incuber durant 30minutes à la température ambiante. L'absorbance est lue immédiatement à 430 nm.

Courbe d'étalonnage de dosage des Flavonoïdes :

Une solution méthanolique de quercétine a été préparée, des solutions filles préparées à partir de la solution mère à différentes concentrations comprises entre 0 et 100 $\mu\text{g/ml}$ permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

10.3. Dosage des Tanins condensés :

Principe :

Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupe aldéhydique de la vanilline sur le carbone en position 6 du cycle A des tanins condensés qui entraînent une coloration verte de la solution qui absorbe à 550 nm.

Protocole :

Un volume de 50 μl d'extrait a été ajouté à 1500 μl de la solution vanilline/méthanol à 4%, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 μl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc [60].

Courbe d'étalonnage de dosage des Tanins condensés :

Différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

11. Test Infrarouge :

Le principe :

Les spectres infrarouges ont été réalisés avec un appareil Perkin Elmer dans le domaine situé entre 4000-400 cm^{-1} .

Cette technique est très puissante pour mettre en évidence les bandes de vibrations des liaisons formant le matériau lamellaire, elle nous a permis aussi de détecter la présence d'anions carbonates, via la bande de vibration caractéristique $(\text{CO}_3)^{2-}$ aux alentours de 1360cm^{-1} [61].

Protocole :

- Réduire en poudre 2 mg d'un échantillon avec 20 mg de bromure de potassium KBr dans un mortier en Agathe.
- Mettre le mélange dans le moule pour obtenir une pastille translucide.
- Mettre le moule dans la presse à pastille et presser l'échantillon jusqu'à 5 tonnes maximum. Démouler la pastille de KBr avec l'échantillon.
- Placer la pastille dans le support et analyse dans l'appareil IR.

12. Evaluation des activités biologiques de *Crassula ovata* :

Les différentes études des activités biologiques sont effectuées sur l'extrait méthanolique de la plante (figure1.6).

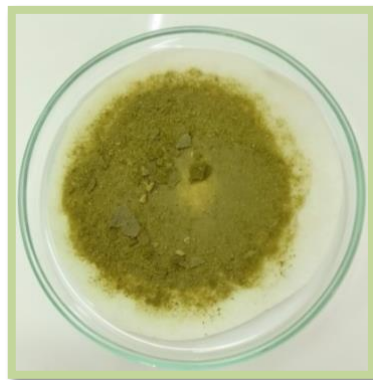


Figure 1.6 : l'extrait méthanolique de la plante *C. ovata*.

12.1 Activité antioxydants :

Principe :

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) mesure l'activité antioxydant des composés capables de transférer des atomes d'hydrogène.

Le DPPH est un composé libre et stable avec une luminosité violette à 517 nm. La réduction du radical par un donneur d'atome d'hydrogène entraîne la formation de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine jaune (Figure1.7). La couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [62].

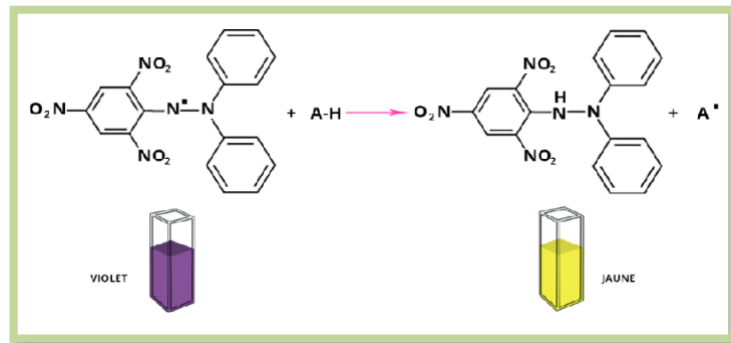


Figure1.7 : Réaction d'un antioxydant avec le DPPH [63].

Préparation de la DPPH :

Dissoudre 3 mg de DPPH dans un volume de 100 ml d'éthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol. L'absorbance est environs (0,7-0,9) nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

Protocole :

- Une solution mère d'extrait a été préparée dans le méthanol avec une concentration de 2 mg/ml, des solutions filles préparées à partir de la solution mère à différentes concentrations (1 ; 0,5 ; 0,3 ; 0,1 ; 0,05 mg/ml).
- Ensuite, dans les tubes on a rempli 400µl de chacun de ces solutions qui ont été ajoutés à 1600µl de la solution de DPPH. Le contrôle négatif et préparé en parallèle en mélangeant 400µl de méthanol avec 1600µl de la solution du DPPH à la même concentration.
- Après 30 min d'incubation dans une chambre noire à température ambiante, la lecture de l'absorbance est effectuée à 517 nm par UV-visible spectrophotomètre.

L'expression des résultats :

En présence d'un antioxydant, l'absorption est diminuée et la décoloration résultante est stœchiométrique en ce qui concerne le nombre d'électrons captés.

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) en utilisant suivant :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A \text{ control} - A \text{ échantillon}) / A \text{ control}] \times 100$$

A control : Absorbance du control (1600µl de DPPH+ 400µl de méthanol).

A échantillon : Absorbance de l'échantillon ou standard.

La concentration efficace (IC 50) :

La concentration efficace (IC50) est inversement liée à la capacité antioxydant d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre à 50 %. Ainsi, plus la valeur d'IC50 est basse plus l'activité antioxydant du composé est grande [64].

12.2. Activité antimicrobienne :

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne de notre plante étudiée, Nous avons testés deux extraits :

- L'extrait méthanolique de la plante dissoute dans le DMSO avec une concentration de 1g/ml.
- L'extrait brut obtenu par broyage puis filtration des feuilles fraîches de la plante.

12.2.1. Préparation de L'inoculum :

A partir d'une culture jeune de 24h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on réalise des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. On réalise une première lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant la transmittance qui doit être comprise entre 22% et 32% pour les bactéries et entre 2% et 3% pour les levures, et cela à une longueur d'onde de 620 nm.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de 10^7 - 10^8 UFC/ml. Si une des valeurs trouvée à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on ajuste soit en ajoutant de l'eau physiologique (à 9%

de NaCl) si elle est inférieure à la valeur minimale ou en ajoutant des colonies si elle est supérieure à la valeur maximale. A chaque fois une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15mn suivant sa préparation.

12.2.2. Préparation de milieu de culture :

On fait fondre les milieux Mueller-Hinton et la gélose Sabouraud dans un bain marie à 95°C, après on verse les deux milieux dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 25 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

12.2.3. Ensemencement et dépôt des disques :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

12.2.4. Lecture des résultats :

- Zones claires autour du disque : présence d'une activité inhibitrice des extraits.
- Absence de zones claires autour du disque : pas d'effet inhibiteur des extraits.

12.3. Activité anti-reflux :

En vue de déterminer la capacité de formation du radeau de l'extrait. On introduit 150ml d'acide chlorhydrique (HCl) d'une concentration de 0.1M dans un bécher de 250ml ayant un diamètre interne de 60mm à 70mm, maintenu à une température de 36,5 à 37,5°C dans un bain-marie, en prenant la précaution d'ajuster le volume d'eau du bain au même niveau que celui de l'acide dans le bécher. En utilisant une seringue sans aiguille, une quantité

équivalente à 20ml de la solution d'extrait dissous dans l'éthanol à une concentration de 10mg/ml est prélevée et introduite rapidement au centre du bécher. L'épaisseur du radeau formé, et sa capacité à flotter sont analysés et notés après 5, 10, 30 minutes [65].

12.4. Activité anti-acide :

Pour étudier la capacité antiacide, nous avons suivi le protocole décrit dans le Drug Discovery and évaluation [66], ainsi que la monographie décrite pour l'oxyde d'aluminium dans la pharmacopée européenne 8eme édition [67].

Nous avons mis dans 30 ml d'acide chlorhydrique (HCl, 0.1M), 10 ml de la solution d'extrait dissous dans l'éthanol à une concentration de 10mg/ml chauffé au préalable à 37°C, et agité la solution sans interruption, et nous prenons la mesure du pH de la solution après 10 min, 15 min, 20 min , jusqu'à 100 minutes.

12.5. Activité anti-inflammatoire in vitro :

L'inflammation est un mécanisme de défense qui permet à l'organisme de se protéger contre les infections, les brûlures, les allergènes chimiques toxiques ou tout autre stimulus nocif. L'inflammation est une réaction substantielle à des dommages, à une maladie ou à une destruction représentée par la chaleur, la rougeur, la douleur, l'enflure et les fonctions physiologiques perturbées [68].

12.5.1. Principe :

La dénaturation des protéines est un processus par lequel les protéines perdent leur structure en raison de la présence d'autres composés, d'un stress externe ou de la chaleur, les amenant ainsi à perdre leur fonctionnalité biologique. Par conséquent, la dénaturation des protéines tissulaires est reconnue comme un marqueur de l'inflammation [69].

Dans cette étude, l'activité anti-inflammatoire in vitro d'extrait méthanolique de *C. ovata* a été mesurée pour l'activité inhibitrice contre la dénaturation des protéines. La technique est menée selon la méthode décrite par Deshpande et al [70]. Le Diclofénac a été utilisé comme médicament de référence.

12.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de dénaturation des BSA :

Préparation de réactifs à 0,5 % d'albumine de sérum bovin :

- 50 mg d'albumine de sérum bovin dissous dans 10 ml d'eau.

Préparation de Phosphate Buffer Saline pH 6,3 :

- Dissoudre 8 g de chlorure de sodium (NaCl), 0,2 g de chlorure de potassium (KCl), 1,44 g de phosphate d'hydrogène disodique (Na₂HPO₄), 0,24 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄) dans 800 ml d'eau distillée.
- Le pH a été ajusté à 6,3 en utilisant l'acide chlorhydrique 1N (HCl) et a volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Méthode :

- **La solution d'extrait :** est constituée de 450 µl d'BSA (0,5% solution aqueuse) et 50 µl de solution d'extrait dissous dans le DMSO et diluée avec de l'eau distillée à différentes concentrations (15,6 ; 31,25 ; 62,5 et 125 µg/ml).
- **La solution de contrôle :** est constituée de 450 µl d'BSA (solution aqueuse à 0,5 %) et 50µl d'eau distillée.
- **Le contrôle du produit :** comprend 450 µl d'eau distillée et 50µl de solution d'extrait à différentes concentrations étaient prises respectivement.
- **Solution standard :** composée de 450 µl d'BSA (0,5 %), et 50 µl de diverses concentrations (15,6 ; 31,25 ; 62,5 et 125 µg/ml) de diclofénac.

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite à température de 70°C pendant 15 min. Après refroidissement, 2,5mL de tampon phosphate sont ajoutés aux solutions ci-dessus. L'absorbance est mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (type SHIMADZU) à 660 nm. Le contrôle représente 100% de la dénaturation des protéines. L'inhibition de la dénaturation de la protéine est déterminée en % par rapport au contrôle, en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs de contrôle} - \text{Abs de l'extrait}) / \text{Abs de contrôle}] \times 100$$

Abs : Absorbance La moyenne retenue est obtenue sur trois répétitions.

12.5.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire par la méthode de dénaturation de l'albumine de l'œuf :**Préparation de réactifs à 0,5 % d'albumine d'œuf :**

- 50 mg d'albumine d'œuf dissous dans 10 ml d'eau.

Méthode :

- **La solution d'extrait:** est constituée de 450 µl d'albumine d'œuf (0,5% solution aqueuse), et 50 µl de solution d'extrait dissoudre dans le DMSO et diluée avec de l'eau distillée à différentes concentrations.
- **La solution de contrôle :** est constituée de 450 µl d'albumine d'œuf (solution aqueuse à 0,5 %) et 50µl d'eau distillée.
- **Le contrôle du produit :** comprend 450 µl d'eau distillée et 50µl de solution d'extrait à différentes concentrations (15,6 ; 31,25 ; 62,5 et 125 µg/ml) étaient prises respectivement.
- **Solution standard :** composée de 450 µl d'albumine d'œuf 0,5 %, et 50 µl de diverses concentrations (15,6 ; 31,25 ; 62,5 et 125 µg/ml) de diclofénac. Ce dernier a été utilisé comme médicament de référence

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite à température de 70°C pendant 15 min. Après refroidissement, 2,5 ml de tampon phosphate sont ajoutés aux solutions ci-dessus. L'absorbance est mesurée en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (type SHIMADZU) à 660 nm. Le contrôle représente 100% de la dénaturation des protéines. L'inhibition de la dénaturation de la protéine est déterminée en % par rapport au contrôle, en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(Abs \text{ de contrôle} - Abs \text{ de l'extrait}) / Abs \text{ de contrôle}] \times 100$$

Abs : Absorbance La moyenne retenue est obtenue sur trois répétitions.

13. Formulation de gel buccale à base de *C.ovata* :

- **Préparation de la solution principe actif :**

Dans un bécher on solubilise l'extrait éthanolique de la plante dans quelques ml d'éthanol.

- **Mode opératoire :**
 - Dans un bécher de 250 ml taille haute, disperser le carbopol dans 70 g d'eau distillée sous une forte homogénéisation (vitesse : 5).
 - Réduire l'homogénéisation au minimum et poursuivre l'homogénéisation jusqu'à dissipation complète de la mousse.
 - Mesurer le pH de la dispersion de carbopol.

- Ajouter 5 gouttes de la solution de triéthanolamine, et le glycérol. Continuer l'homogénéisation à une faible vitesse pendant 5 min.
- Arrêter l'homogénéisation et ajouter la solution principe actif sous une très faible agitation.
- Ajouter goutte à goutte la solution de triéthanolamine pour ajuster le pH de mélange.
- Compléter à 100 g avec l'eau distillée en tenant compte de la quantité de la solution de triéthanolamine ajoutée.

14. Contrôle de produit fini :

14.1. Caractères organoleptiques :

Les gels buccaux sont inspectés d'un point de vue couleur, consistance, homogénéité et Présence ou absence d'agrégats. Il est à préciser que la couleur a été vérifiée par examen visuel sur fond blanc. Le goût a également été apprécié en dégustant la formulation. De même, l'odeur a été contrôlée en sentant le produit. Enfin, la consistance a été évaluée en Appliquant le gel sur la peau.

14.2. Mesure du pH :

À l'aide d'un pH-mètre Hana, en plongeant complètement l'électrode dans le gel. Le Résultat est la moyenne de trois lectures. Rappelons que le pH de la cavité buccale est compris entre 6,2 et 7,4.

14.3. Essai de centrifugeuse :

Le gel a été centrifugé séparément dans un tube à essai de 10 cm de long et 1 cm de large pendant 5 à 3500 tr/min puis étudié pour la sédimentation et la stabilité du gel.

14.4. Etude de stabilité :

Un test de stabilité aux températures extrêmes 4 °C et 40 °C a été effectué pendant 48h.

14.5. Etude de comportement rhéologique :

Les mesures du comportement rhéologique sont importantes non seulement pour évaluer la stabilité physique mais elles sont en même temps des indicateurs des paramètres de type qualité du système et utilité.

Les études sur ces propriétés sont devenues un outil crucial dans l'analyse des produits pharmaceutiques, dans le but de produire des profils physiques et structurels stables.

Pour se faire, deux tests ont été effectués :

14.6. Le test de viscoélasticité :

Les propriétés viscoélastiques des crèmes ont été mesurées en mode dynamique par un test non destructif d'oscillations de faible amplitude.

Un balayage croissant en déformation, de 0,0001 à 1000 a été effectué à la fréquence de 1 Hz (mode logarithmique, 4 points/décade). Cette mesure a permis d'obtenir les valeurs des modules G' , G'' dans le domaine linéaire viscoélastique.

G' : le module de conservation, il représente le caractère élastique de la crème, l'énergie emmagasinée dans le matériau.

G'' : le module de perte, qui représente le caractère visqueux de la crème et correspond à l'énergie dissipée.

CHAPITRE II : RESULTAT ET DISCUSSION

1. Perte à la dessiccation :

Le calcul de ce paramètre permet à déterminer la teneur en eau de notre plante, Les résultats obtenus sont présentés dans le figure (2.1) , ces résultats désignent la richesse de l'espèce *C. ovata* en eau.

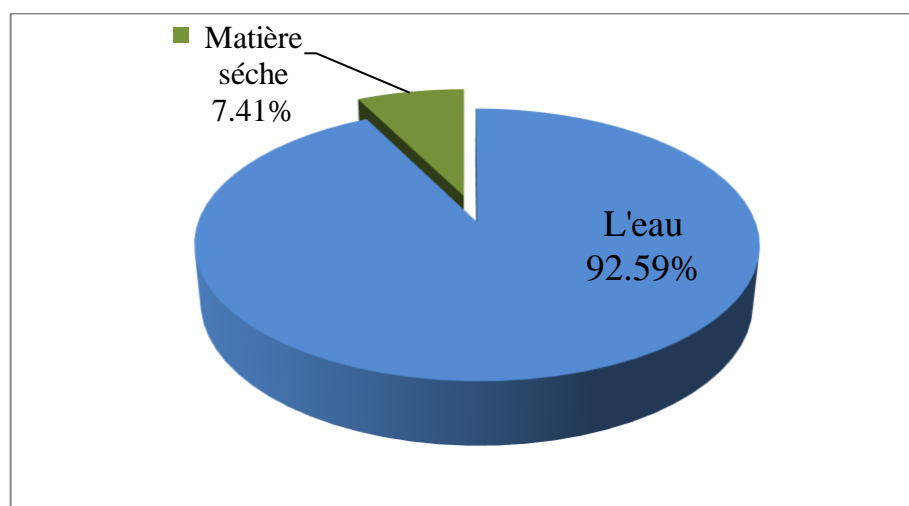


Figure2.1 : La teneur en eau de la plante *C.ovata*.

2. Rendement d'extraction :

Les rendements d'extractions méthanoliques et éthanoliques des feuilles fraîches sont données dans le tableau (2.1).

Tableau2.1 : Rendements d'extractions par sonication.

	Rendement %	Coloration
Extrait méthanolique	0,30	Vert clair
Extrait éthanolique	0,15	Vert foncé

3. Résultats de screening phytochimique de la plante :

Les résultats de screening phytochimique de la plante *C. ovata* sont présentés dans le tableau (2.2). (APPENDICE B) confirme ces résultats.

Tableau2.2 : Screening phytochimique de la plante *C.ovata*.

Les composés	EMF	EMS
Polyphénols	+	+
Alcaloïdes	+	-
Flavonoïdes	+	-
Tanins	+	+
Saponines	+	+
Terpénoïdes	+	-
Quinones Libres	+	+

Clé : + : positif; - : Négatif

D'après les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, nous avons noté que pour les deux extraits de la plante *C. ovata*, Ces derniers sont très riches en polyphénols, tanins et en quinones libres.

Pour les flavonoïdes le résultat est positif dans l'EMF et négatif dans l'EMS. La même chose a été enregistrée pour les alcaloïdes et les terpénoïdes.

Les saponines se trouvent avec une faible quantité dans la plante avec une mousse de 1,5cm.

4. Résultats de l'étude quantitative :

4.1 Dosage des Polyphénols :

Les résultats obtenus de dosage des Polyphénols sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait (mg EAG/g) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (figure2.2).

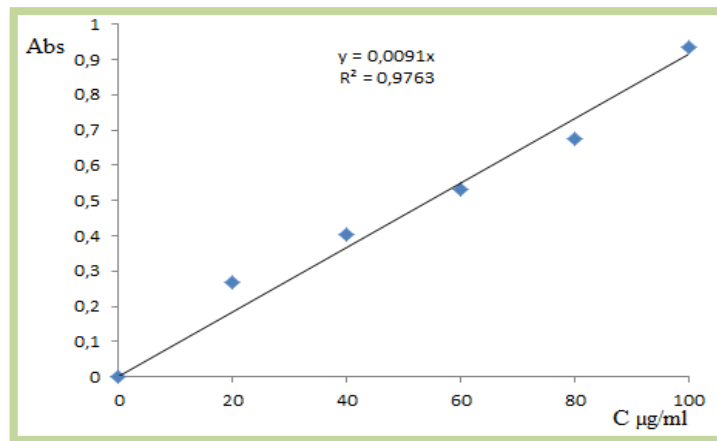


Figure2.2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Quantité des polyphénols : 89,08 mg EAG/g d'extrait.

4.2. Dosage des Flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 2.3) et exprimée en mg d'équivalents quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

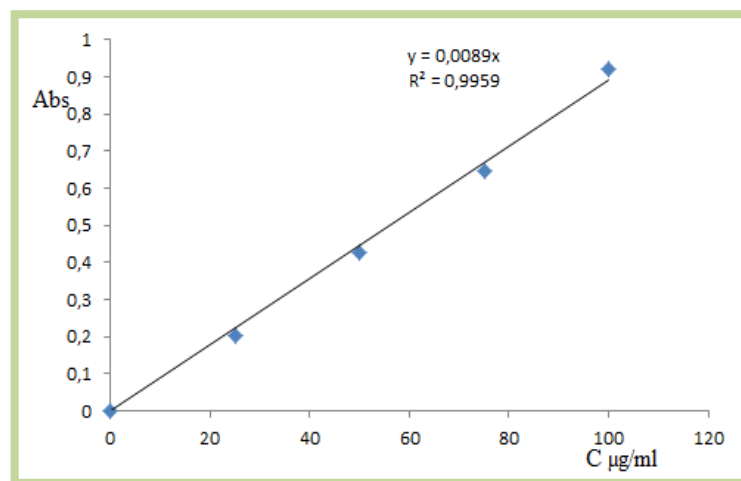
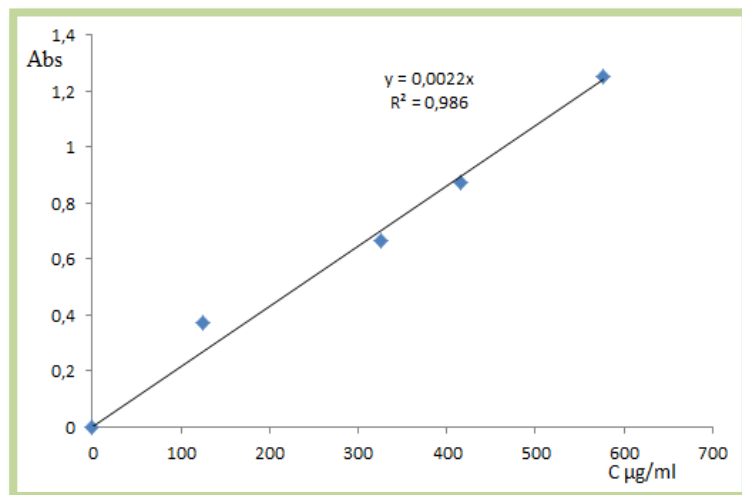


Figure2.3 : Courbe d'étalonnage de Quercétine.

Quantité des flavonoïdes : 22,16mg EQ/g d'extrait

4.3. Dosage des Tanins condensés :

Les résultats obtenus de dosage des Tanin condensés sont exprimés en milligramme d'équivalent de Catéchine par gramme d'extrait (mg EAG/g) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de Catéchine (figure2.4).

**Figure2.4 :** Courbe d'étalonnage de Catéchine.

Quantité des tanins condensés : 5,22mg EC/g d'extrait.

D'après les résultats présentés dans le tableau (2.3), les teneurs obtenues pour les polyphénols 89.08 mg EAG/g, les flavonoïdes 22,16 mg EQ/g ainsi que les tanins condensés 5,22 mg EC/g. Ces valeurs indiquent réellement la richesse, et la diversité de *C. ovata* par les composés phénoliques.

Tableau2.3 : la teneur en polyphénols; flavonoïdes ; tanins condensés.

Dosage	Equation de la courbe d'étalonnage	R ²

Polyphénols	$Y = 0,0091x$	0,97	89,08 mg EAG/g
Flavonoïdes	$Y = 0,0089x$	0,99	22,16 mg EQ/g
Tanins Condensés	$Y = 0,0022x$	0,98	5,22 mg EC/g

5. Résultats De Test Infrarouge :

Le spectre IRTF de l'extrait est représenté dans la figure (2.5).

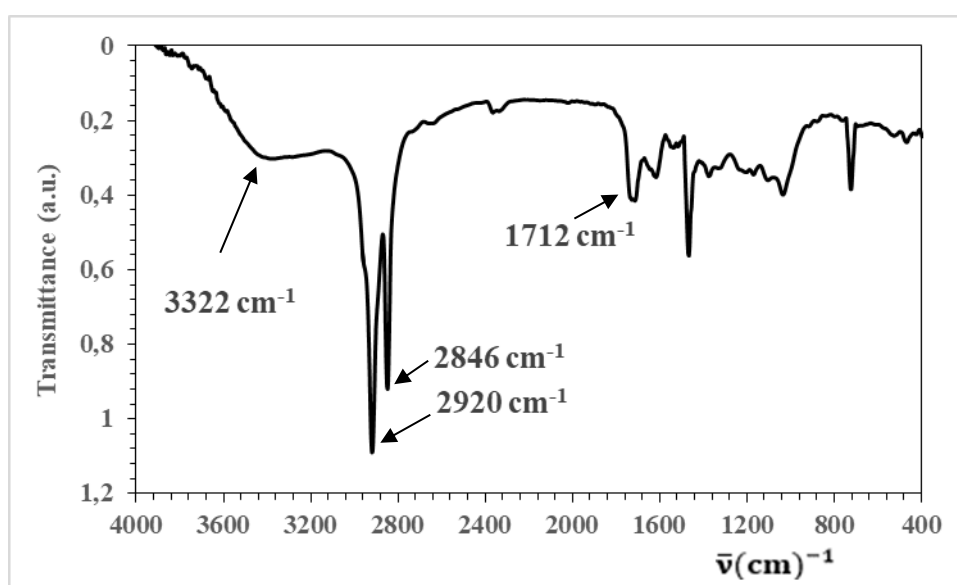


Figure2.5 : Le spectre IRTF de l'extrait méthanolique de la plante.

Le spectre IRTF de l'extrait méthanolique *Crassula ovata* contient les pics et une bande caractéristique de certaines fonctions chimiques présentes dans les polyphénols.

Sur le spectre en question, une bande large s'étalant de 3322 jusqu'à 2500 cm^{-1} attribuée à la vibration de la fonction O-H d'un acide carboxylique. En ensemble de pics d'intensité importante sont localisés entre 3000 et 2846 cm^{-1} et qui sont attribués aux vibrations de la liaison C-H des groupements méthylènes et méthyles. A 1712 cm^{-1} , la présence de la vibration de la liaison C=O de la fonction carbonyle présente au sein d'un acide et d'une cétone.

6. Résultats d'Activité Antioxydante :

L'activité antioxydante d'extrait méthanolique a été évaluée in vitro par la méthode de DPPH.

On remarque un changement de couleur du violet au jaune pour l'extrait en augmentant leur concentration, cela veut dire que le DPPH est réduit en présence d'une substance réductrice qui existe dans l'extrait.

Les résultats obtenus (Tableau2.4), ont permis de tracer les graphs de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration pour l'extrait méthanolique de l'espèce *C. ovata* (Figure2.6).

Le pourcentage de réduction augmente avec l'augmentation de la concentration d'extrait jusqu'à un seuil où le pourcentage d'inhibition se stabilise avec l'élévation de la concentration.

Tableau2.4 : Pourcentage d'inhibition d'extrait méthanolique selon les différentes concentrations.

Concentration (mg/ml)	2	1	0,5	0,3	0,1	0,05
Inhibition %	81,20	58,64	50,68	47,41	47,19	44,36

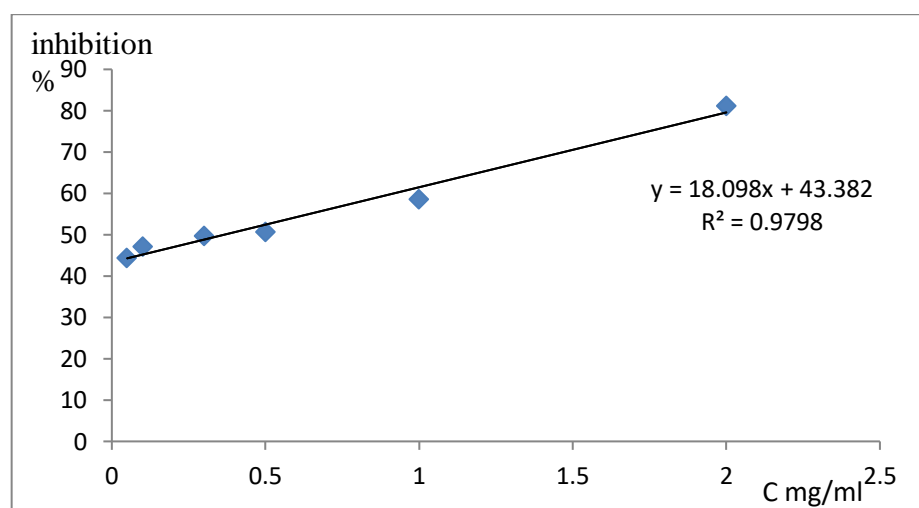


Figure2.6 : la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait méthanolique.

Ces résultats ont permis également de déterminer la valeur de l'IC₅₀ (0,4 mg/ml). L'activité

anti radicalaire de cet extrait pourrait s'expliquer par la présence des composés phénoliques qui sont détectés dans la plante.

7. Résultat d'activité antimicrobienne :

D'après les observations, il est évident que *Crassula ovata* n'a pas d'activité antimicrobienne.

Tableau 2.5 : Observations de la culture bactériennes pour les deux extraits de feuilles de plantes.

	Bactéries Inhibition en mm	
	EMF	EB
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0
<i>Candidaalbicans</i>	0	0

Ces résultats ressemblent à l'étude [71], qui ressort des résultats que les extraits de la plante *C. ovata*, sont seulement capables d'inhiber l'*Escherichia coli* bactéries.

8. Résultats d'activité anti-reflux :

D'après les résultats marqués dans le tableau (2.6), on peut conclure que l'extrait méthanolique de la plante *C. ovata* présent d'activité anti-reflux.

Tableau2.6 : l'observation de formulation de trouble.

Temps (min)	5 min	10	30	45
Flottabilité	Totale	Partielle	Partielle	Décantations
épaisseur (cm)	0,5	1	1	-

La figure (2.6) confirme ces résultats.

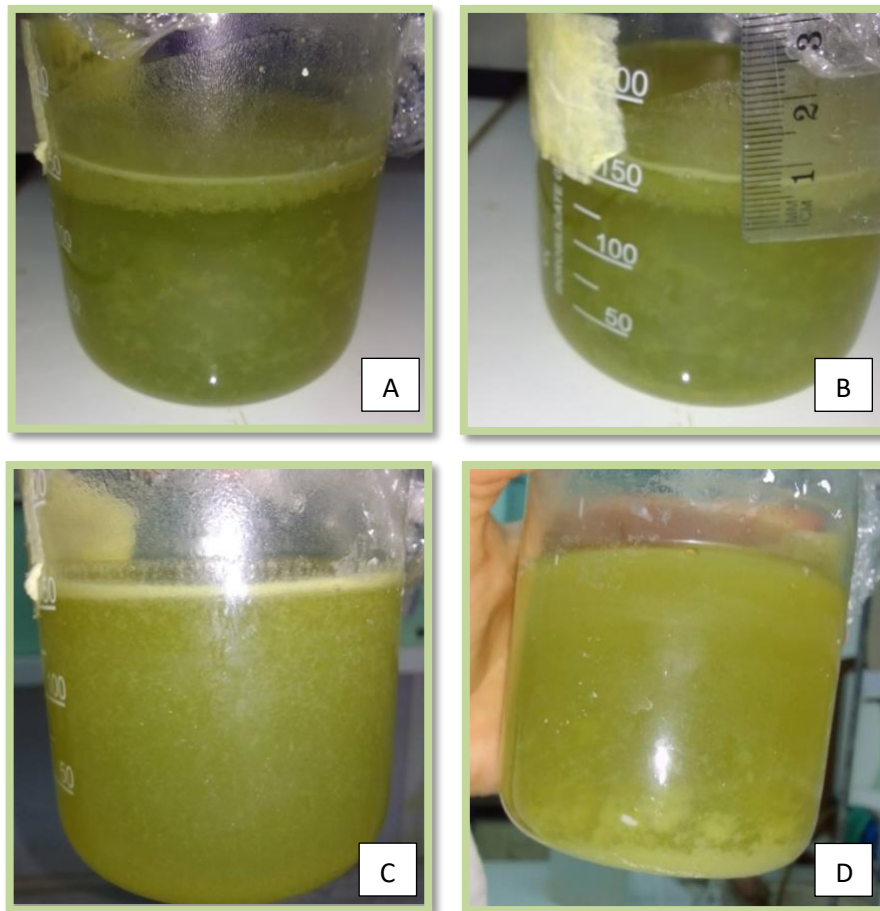


Figure 2.7 : formation de radeau (A) après 5min, (B) après 10min, (C) après 30min, et (D) après 45min.

9. Résultats d'activité antiacide :

Après la mesure de pH de la solution comme indiqué dans le chapitre 2, on remarque que la valeur du pH ne change pas (valeur de 1,40 à 37°C). On peut conclure que l'extrait méthanolique de notre plante ne présente pas d'activité antiacide.

10. Résultat anti-inflammatoire :

10.1. Activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de dénaturation des BSA :

La corrélation entre la concentration et le pourcentage d'inhibition a montré que la capacité d'inhibition de la dénaturation de la BSA dépend de la concentration de l'extrait (Figure 2.8)

; ceci est confirmé en comparant la CI50 de l'extrait méthanolique (CI50=125 µg/ml) avec le pourcentage d'inhibition de diclofénac (30 %) à une même concentration de 125 µg/ml.

Le paramètre de la CI50 a été utilisé pour classer l'extrait méthanolique avec le diclofénac, selon l'ordre suivant : Extrait méthanolique > Diclofénac.

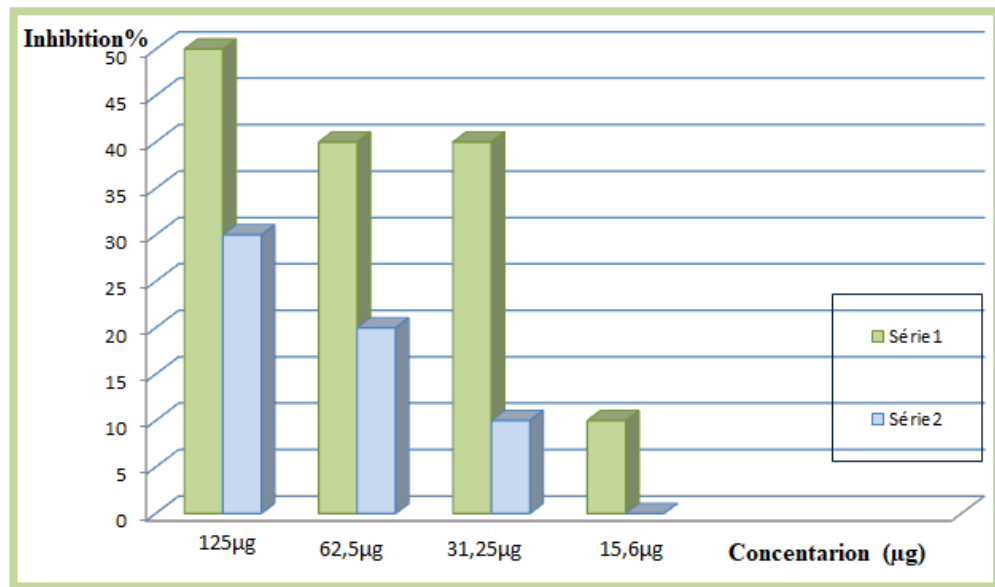


Figure2.8: Concentration et l'inhibition de l'BSA (l'extrait méthanolique série 1), (Diclofénac série 2).

10.2. Activité anti-inflammatoire par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf :

Pour l'activité anti-inflammatoire in vitro, par la méthode de dénaturation d'albumine d'œuf, l'extrait méthanolique à la concentration de 125 µg/ml était de 35% d'inhibition de la dénaturation de l'albumine d'œufs, alors que le diclofénac présentait un pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine d'œuf de 10% à une concentration de 125 µg/ml. Comme indiqué dans La figure (2.9), l'extrait de *C. ovata* a présenté une protection protéique significativement plus élevée que le Diclofénac, un anti-inflammatoire standard.

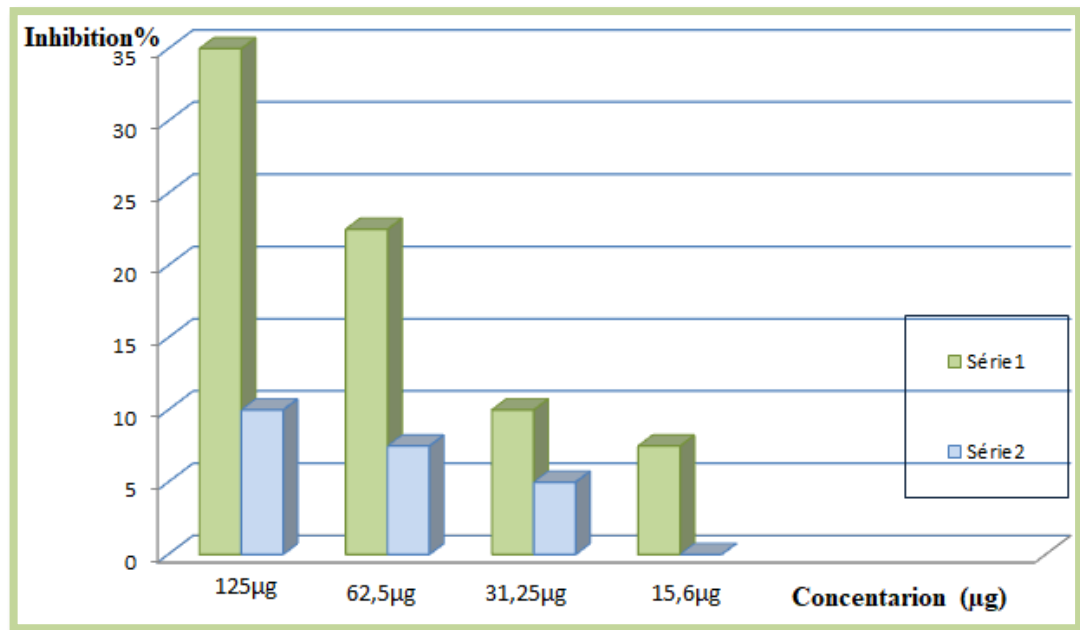


Figure 2.9: Concentration et inhibition de l'albumine d'œuf (l'extrait méthanolique série1), (Diclofénac série2).



La dénaturation des protéines est une cause d'inflammation bien démontrée [72].

Dans le cadre de l'enquête sur le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire, la capacité inhibitrice de l'extrait méthanolique a été étudiée contre la dénaturation des protéines du BSA, et de l'albumine d'œuf. Nos résultats ont clairement démontré que l'extrait méthanolique, à des concentrations de 15,6 ; 31,25 ; 62,5 et 125 µg/ml présente une activité anti-dénaturante de l'BSA de l'ordre respectif de 10 ; 40 ; 40 et 50%. Les mêmes concentrations ont montré une inhibition de la dénaturation de l'albumine d'œuf dans l'ordre respectif des concentrations citées de 7,5 ; 10 ; 22 et 35%. L'extrait montre ainsi une efficacité dans l'inhibition de la dénaturation du BSA et de l'albumine d'œuf. Il est à noter l'évolution du degré d'inhibition de la dénaturation des protéines qui augmente avec la concentration de l'extrait méthanolique.

11. Contrôle de produit fini :

Le tableau 2.7 présente les résultats des tests effectués sur le gel.

Tableau 2.7 : Les caractéristiques de formulation du gel à base des feuilles de *C. ovata*.

	Résultat	Description
Caractéristiques Organoleptiques		Le gel de à un aspect opaque homogène de couleur verte, d'un goût et d'une odeur agréables.
Test de stabilité		Il n'y avait aucun sédiment observable dans les tests de centrifugation. Les figures montrent que la formulation a une bonne stabilité.
pH	6,7	Le pH est dans les normes, et correspond au pH naturel de la cavité buccale.

11.2 Etude de stabilité :

Dans le test de changement de température (à 40°C, et 4°C), aucun changement d'apparence n'a été observé ce qui confirme la stabilité du gel.

11.3. Etude du comportement rhéologique :

Le graphe représente la variation de la viscosité apparente et la contrainte de cisaillement de gel en fonction de la vitesse de cisaillement, la viscosité change en fonction de la vitesse de cisaillement (Figure 2.10) ce que signifie que le comportement de ce gel est un comportement non newtonien, la contrainte de cisaillement est de l'ordre < 1 cela indique que ce gel est un fluide rhéofluidifiant.

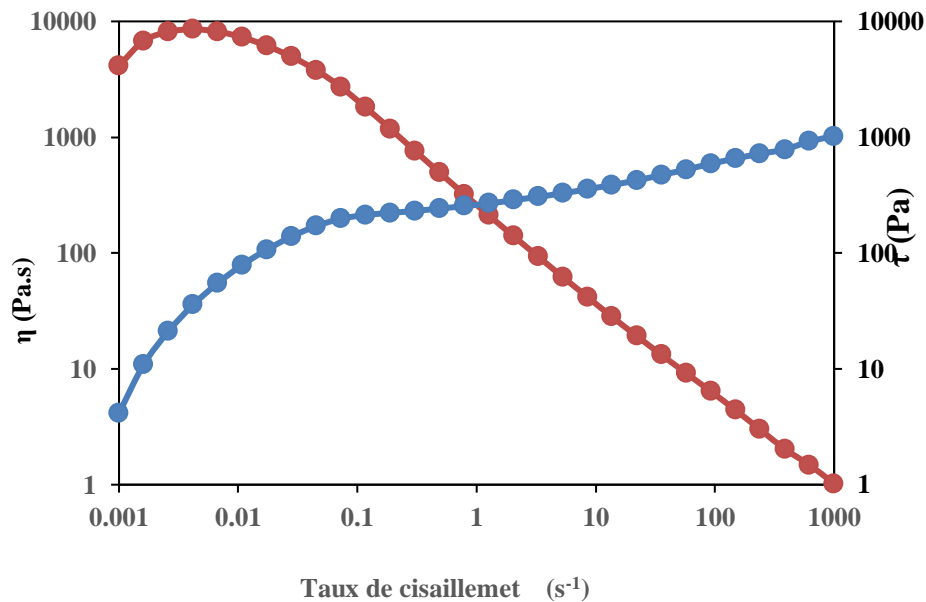


Figure 2.10 : Variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement de gel de la résine en fonction de taux de cisaillement.

11.4. Etude de la viscoélasticité :

La figure montre le module de conservation (élastique) (G') et le module de perte (visqueux) (G'') en fonction de l'amplitude de la déformation à une fréquence angulaire fixe $f= 1\text{Hz}$ de gel de résine à $T^\circ=37\text{ C}^\circ$.

Le module élastique présente un comportement solide viscoélastique jusqu'à 10 % d'amplitude de déformation et un module décroissant au-dessus de cette valeur. Le module visqueux avait un profil linéaire à $<10\%$ d'amplitude de déformation et un comportement décroissant au-dessus de cette valeur ce que signifie une stabilité dans la région de LVE (Linear viscoelasticity), Au-delà du LVE, on observe une évolution non-linéaire de G' et de G'' associée à un comportement viscoélastique non-linéaire. Le comportement devient liquide viscoélastique sur toute la gamme de fréquences angulaires.

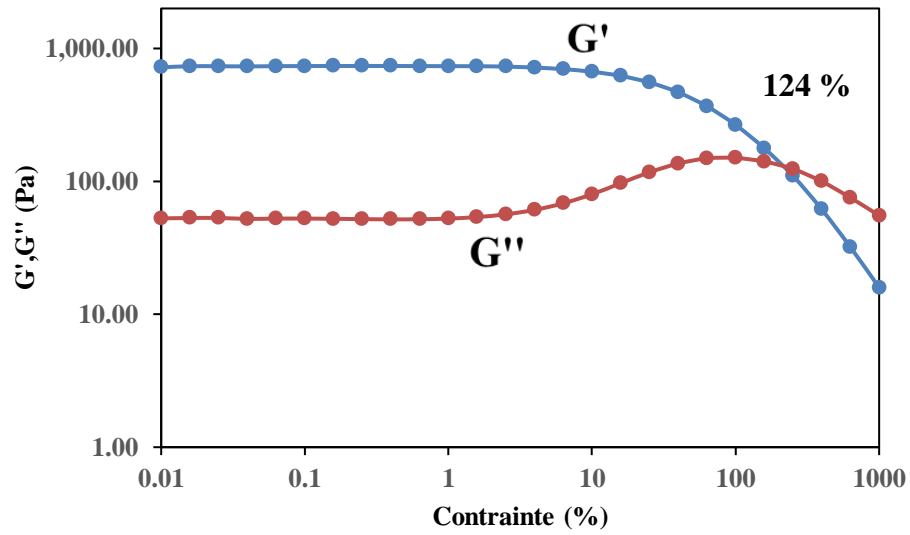


Figure 2.11 : Variation du module de conservation (élastique) G' et du module de perte (visqueux) G'' de l'émulgel de résine.

CONCLUSION GENERALE

Les ressources naturelles du règne végétal restent la source fiable et capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. À l'aide de la médecine traditionnelle, la recherche des molécules bioactives dans les extraits de plantes va mener à leur utilisation comme alternative des molécules de synthèse.

C. ovata est employée dans la médecine traditionnelle de nombreuses cultures. Parmi ces utilisations le traitement des aphtes, et les ulcérations buccales.

Le travail reporte les résultats d'une étude faite sur une espèce *C. ovata*. Correspondant à des récoltes durant le mois d'Avril 2023 dans la région de Blida (Algérie).

Le but de ce travail est la valorisation de l'espèce *C. ovata*, d'étudier sa composition chimique, le dosage de ces composants, ainsi que d'évaluer les activités biologiques: l'activité anti-oxydante, anti-microbienne, anti-acide, anti-reflux, et anti-inflammatoire.

Tout d'abord nous avons effectué 4 différentes extractions des feuilles de la plante. Le rendement de l'extrait méthanolique (0,30%) est plus important que celui de l'extrait éthanolique (0,15%).

Dans le cadre de ce travail nous avons le screening phytochimique de cette espèce pour déterminer la nature des métabolites secondaires qu'elle accumule. Cette étude a montré la présence des polyphénols, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponines, terpénoïdes et quinones libres.

Les résultats obtenus lors de notre étude phytochimique de la plante sont donc tout à fait en accord avec les travaux antérieurement publiés sur cette famille et sur ce genre.

Après un screening phytochimique, nous avons quantifié la teneur des polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés. Cette étude a montré la richesse de la plante en polyphénol et en flavonoïdes.

La teneur des polyphénols était de 89,08 mg EAG/g, la teneur des flavonoïdes : 22,16mg EQ/g d'extrait, et la teneur des tanins condensés : 5,22mg EC/g d'extrait.

Le pouvoir antioxydant d'extrait de *C. ovata* a été mis en évidence. Une CI50 de 0,4 mg/ml a été enregistrée.

L'extrait méthanolique à la concentration de 125 µg/ml a montré un pourcentage d'inhibition de la BSA à l'ordre de 50% et un pourcentage d'inhibition de 35 % par rapport à l'Albumine d'œuf, soit bien supérieur à celui du Diclofénac sodique. Ainsi, ces résultats indiquent que l'extrait présente une activité anti-dénaturation significativement bonne en comparaison avec le diclofénac.

Nous avons décidé d'exploiter ces effets et ainsi de concevoir une formulation appropriée, stable et facilement accessible de cette herbe.

La formulation du gel montre une stabilité importante approuvée par les contrôles du produit fini avec un pH de 6,7 ; chose qui indiquée par la centrifugation.

Les résultats obtenus de cette étude sont satisfaisants et importants. Ainsi nous souhaitons dans les années à venir les approfondir et les compléter afin de valoriser et de bénéficier de cet arbuste qui est bien la *Crassula.ovata*.

APPENDICE A

Liste d'abréviations :

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

MT : La Médecine Traditionnelle. .

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché.

MPUP : Les Matières Premières à Usage Pharmaceutique.

C.S.P : Code de la Santé Publique.

C. ovata : *Crassula ovata*.

ATCC : American Type Culture Collection.

tr/min : Tour par minute.

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

Abs : Absorbance.

UV : Ultra-Violet.

IR : Infrarouge.

µg /ml : Microgramme par millilitre.

µl : Microlitre.

pH : Potentiel Hydrogène

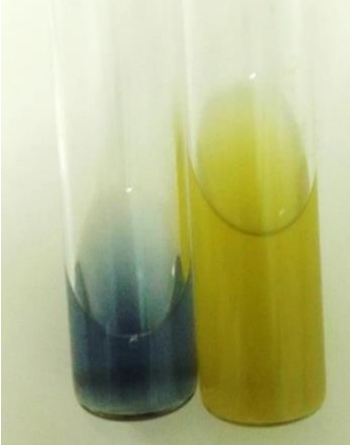



BSA : Albumine bovin sérum


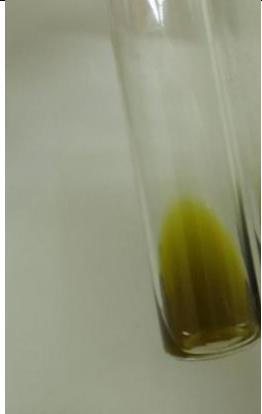
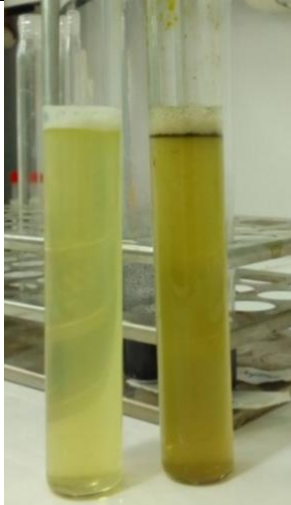


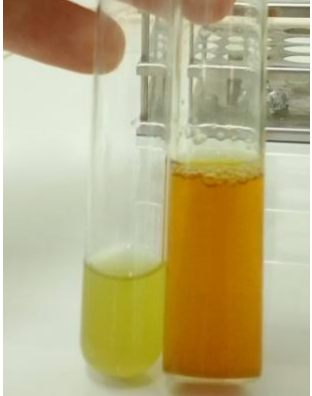
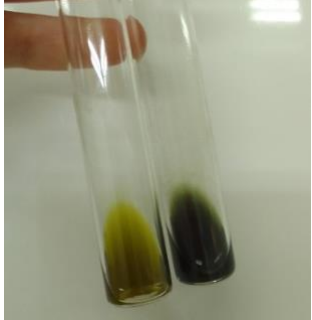
KBr : Bromure de Potassium

UFC : Unité Formatrice de Colonie

APPENDICE B

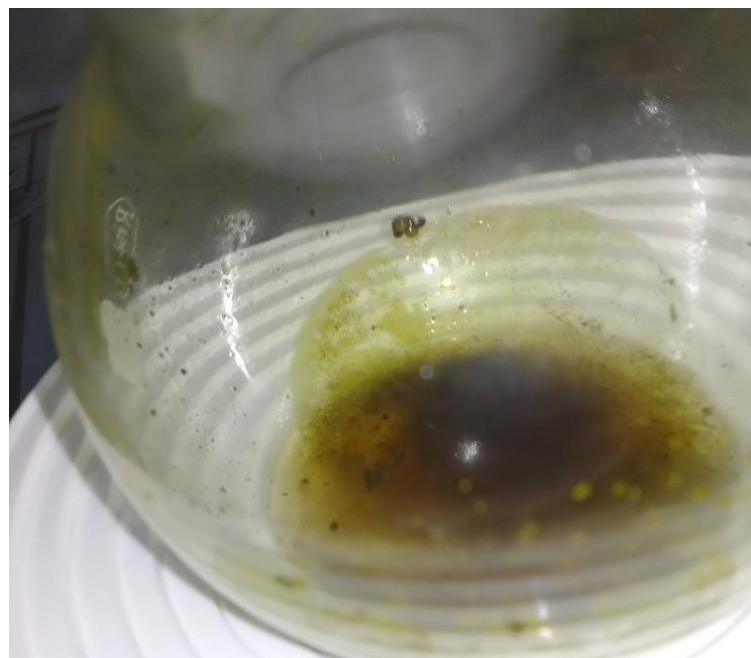
Résultats de screening phytochimique

Teste	EMF	EMS
Les Polyphénols		
Les Alcaloïdes		
Les Flavonoïdes		

<p>Les Tanins</p>		
<p>Les Saponines</p>		
<p>Les Terpénoïdes</p>		
<p>Les Quinones Libres</p>		

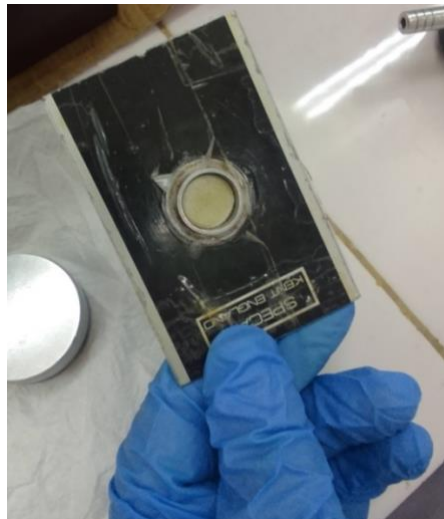
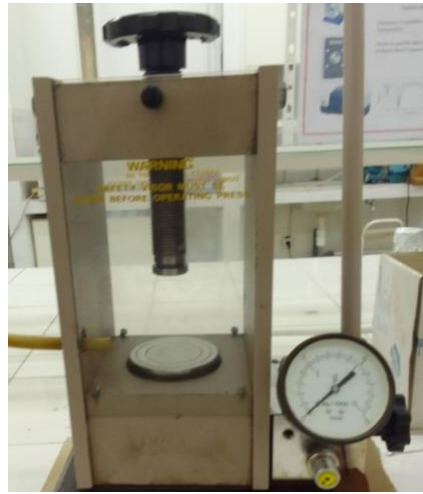
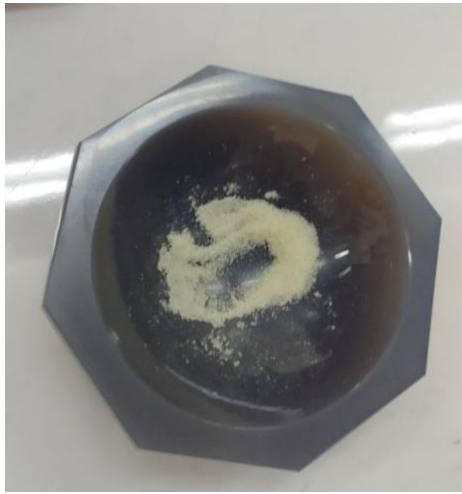
APPENDICE D

Elimination du solvant



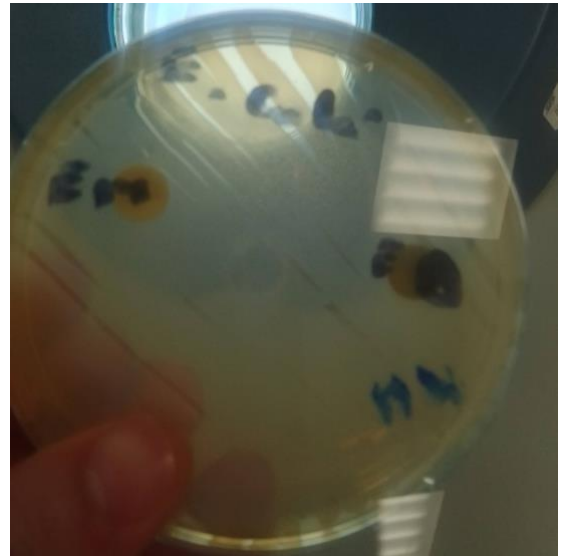
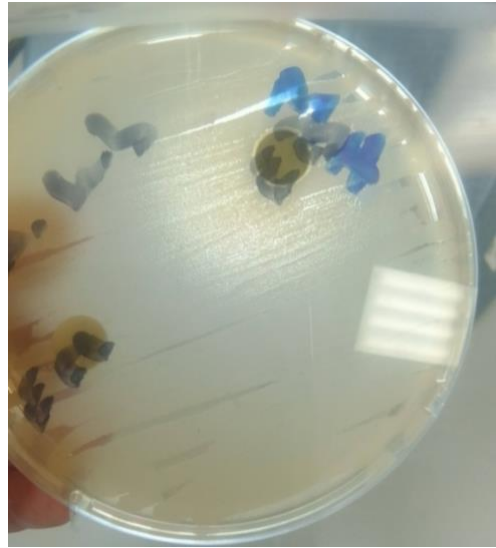
APPENDICE C

Le Test Infrarouge



APPENDICE E

Le Test d'Activité Anti-microbienne



APPENDICE F

Le Test in vitro d'activité anti-inflammatoire



REFERENCES

- [1] : Sanago, R., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle : Université Bamako Développement, Environnement et Santé, p 53.
- [2] : Les plantes médicinales d'Algérie Ali - Delille, Berti Editions, 2013.
- [3] : Newman, DJ, Crag, GM et Snader, KM (2000) L'influence des produits naturels sur la découverte de médicaments. *Rapports sur les produits naturels*, 17, 215-234.
- [4] : Une phylogénie des légumineuses (Leguminosae) basée sur l'analyse du gène matK du plaste résout de nombreux sous-clades bien pris en charge au sein de la famille 004 novembre ;91(11):1846-62. doi : 10.3732/ajb.91.11.1846.
- [5] : Peuplement, population et santé : une inégale répartition Gérard Salem, Stéphane Rican, Zoé Vaillant Dans *Géographie humaine* (2016).]
- [6] : Gruffat X. Définition de la phytothérapie [Internet]. 2017. Disponible sur: <https://www.creapharma.ch/phytotherapie.htm>.
- [7] : Anne-Sophie Limonier. La phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie. *Sciences pharmaceutiques*. 2018. ffdumas-01840619.
- [8] : Jean-Yves Chabrier. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. *Sciences pharmaceutiques*. 2010. ffhal-01739123f.
- [9] : Les Polyphénols en agro-alimentaire SARNI-MANCHADO et Véronique CHEYNIER ; 2006.
- [10] : Support de cours sur le métabolisme secondaire d'Antoine Gravot (Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV Université de Rennes 1 – L2 UE PHR – 2008/2009.
- [11] : MAURO NEVES MUNIZ Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I le 10/07/2006.
- [12] : Biosynthèse des alcaloïdes : métabolisme et trafic Jörg Ziegler, Peter J. Facchini *Annu Rev Végétal Biol* 2008 ; 59 : 735-69.

- [13] : Beddou, F. (2015) Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat, Biologie Cellulaire et Biochimie, Université Abou Bekr Bailked, Tlemcen, Algérie. 2015.
- [14] : Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif T.Hennebelle ,S.Sahpaz &F.Bailleul *Phytothérapie* volume 2 , pages3–6 (2004).
- [15] : Les polyphénols de thé, du vin et du cacao É. Ménat *Phytothérapie* Février 2006 DOI : 10.1007/s10298-006-0133-2.
- [16] : Biopesticides d'origine végétale (2e éd.) REGNAULT-ROGER, PHILOGENE, VINCENT.
- [17] : Flavonoïdes : un aperçu AN Panche , A. D. Diwan , et SR Chandra *J Nutr Sci.* 2016.
- [18] : Derbel.S. ; Ghedire.K. : Les phytonutriments et leur impact sur la santé, *Phytothérapie*, Numéro 1 :28-34, (2005)].
- [19] : Paolini, V., Dorchies, Ph. Et Hoste, H. (2003). Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter.Agri*, 17-19.
- [20] : Ali-dellile L., 2013. Les plantes médicinales d'Algerie. Berti Edition Alger 6-11.
- [21] : Identification et contrôle des mauvaises herbes communes : Volume 2 pp 475–486 Zhenghao Xu & Meihua Deng Première ligne :11 novembre 2017.
- [22] : *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* Volume 4, Issue 2, Décembre 2018 , Pages 234-240 Crassulaceae (chimie et pharmacologie)- Une revue Omneya Aïd ,Shahira ezzat ,Mariam Gonaïd ,Mouchira choucry.
- [23] : *Crassula ovata* (jade plante) datasheets Centre for agriculture and biosciences International, Wallingford. Retrieved June 02, 2023, from <http://www.cabi.org/isc/datasheet/113574>.
- [24] : Smith, G.F., Figueiredo, E., van Wyk, A.E., 2019, Chapter 3 - Crassulaceae in Southern Africa, *Kalanchoe* (Crassulaceae) in Southern Africa, Classification, Biology, and Cultivation, 17-22.

- [25] : <http://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.visual.preart0000071>.
- [26] : *Crassula ovata* (Mill.) Druce. Globale Biodiversity Information Facility Secretariat, Copenhagen. Retrieved 02/06/2023 from <http://www.gbif.org/species/5362063>.
- [27] : Morandini P, Salamini F. Plant biotechnology and breeding: Allied for years to come. Trends in Plant Science. 2003 ;8 :70–75.
- [28] : Eggli UR. Illustrated handbook of succulent plants, Crassulaceae illustrated handbook of succulent plants. Springer, Berlin ; 2002.
- [29] : Phytochemical and Antimicrobial Activity of (*Crassula ovata*) Jade Plant on Different Strains of Bacteria Mwangi Denis Muiruri^{1*} and Wambura Mwangi¹ Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, P.O.Box 62,000 – 00200 Nairobi, Kenya. European Journal of Medicinal Plants page 4.
- [30] : SCREENING OF PHYTOCHEMICALS AND EVALUATION OF ANTI-MICROBIAL, ANTI-OXIDANT AND IN-VITRO ANTIDIABETIC ACTIVITY OF *CRASSULA OVATA* LEAVES K. Chokhone, Nayan Talukdar, Manash Pratim Sarma, Karabi Das and Partha Pratim Kalita * Department of Biotechnology, Assam down town University, Assam, India. IJPSR (2017), Vol. 8, Issue 2 page 860.
- [31] : Barros FWA, Bandeira PN, Lima DJB, Meira AS, de Farias SS, Albuquerque MRJR, dos Santos HS, Lemos TLG, de Moraes MO, Costa-Lotufo LV Les esters d'amyrine induisent la mort cellulaire par apoptose dans les cellules leucémiques HL-60. *Bioorg. Méd. Chim.* 2011 ; 19 :1268–1276. doi : 10.1016/j.bmc.2010.12.016.
- [32] : Lima EM, Nascimento AM, Lenz D., Scherer R., Meyrelles SS, Boëchat GAP, Andrade TU, Endringer DC Triterpènes de la composition chimique de la résine *Protium heptaphyllum* et cytotoxicité. *Rév. Bras. Farmacogn.* 2014 ; 24 : 399–407. doi : 10.1016/j.bjp.2014.06.003.
- [33] : Aragão GF, Carneiro LMV, Junior APF, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GSDB Un mécanisme possible pour les effets anxiolytiques et antidépresseurs de l'alpha et de la bêta-amyrine de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Mars. *Pharmacol. Biochimie*, 2006 ; 85 :827–834. Doi : 10.1016/j.pbb.2006.11.019.

[34] : Oliveira FA, Vieira-Júnior GM, Chaves MH, Almeida FRC, Florêncio MG, Lima RCP, Silva RM, Santos FA, Rao VSN Effets gastroprotecteurs et anti-inflammatoires de la résine de *Protium paraphyllum* chez la souris et le rat. *Pharmacienne. Rés.* 2004 ; 49 : 105–111. doi : 10.1016/j.phrs.2003.09.001.

[35] : Kai Liu, Xumin Zhang, Longue Xie, Mao Deng, Huijuan Chen, Chanson Jiawen, Long Jiaying, Xiaofang Li, Jia Luo « Le lupéol et ses dérivés comme agents anticancéreux et anti-inflammatoires : mécanismes moléculaires et efficacité thérapeutique » *ELSVIER* volume 164, février 2021 , 105373.

[36] : Rôles multifonctionnels et potentiel pharmacologique du β -sitostérol : preuves émergentes vers des applications cliniques *Interactions chimico-biologiques* Tome 365, 25 septembre 2022, 110117.

[37] : Phytochemical and Biological Studies of Different *Crassula* species Family Crassulaceae A thesis submitted by Omneya Eid Mohamed M.Eid B.Sc.Pharm. 2013.

[38] : ISOLATION OF THE GALLIC ACID IN THE BUTANOLIC FRACTION OF *Crassula ovata* (Mill.) DRUCE (CRASSULACEAE) LEAVES AND ITS VASO-RELAXING EFFECT |Nantenaina Tombozara, Zoarilala Rinah Razafindrakoto, David Ramanitrahasimbola, Reine Dorothée ; Ramilison Razafimahefa, Eric Marchioni, and Dina Andriamahavola Rakotondramanana ; *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. ISSN 2429-5396 May 2017.

[38] : Aphtes et ulcérations buccales Aphthous ulcers and oral ulcerations panelLoïc Vaillant, Mahtab Samimi. *La Presse Médicale* Volume 45, Issue 2, February 2016, Pages 215-226.

[39] : Eslami Raveshty SS, Eslami Raveshty SB. L'effet de la combinaison des essences de *Myrtus Communis* et de *Melissa Officinalis* dans le traitement des aphtes mineurs. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2011 ; 19 (76) :76–83.

[40] : Tarakji, B., Gazal, G., Al-Maweri, SA, et al. (2015) Directive pour le diagnostic et le traitement de la stomatite aphteuse récurrente pour les praticiens dentaires. *Journal de la santé bucco-dentaire internationale*, 7, 74-80.

[41] : Stomatite aphteuse récurrente Dimanche O Akintoye , Martin S Greenberg *Dent Clin North Am.* Avril 2014 ;58(2) :281-97. doi : 10.1016/j.cden.2013.12.002

- [42] : Greenberg MS, Glick M. 11e éd. Hamilton : BC Decker; 2008. Diagnostic et traitement de la médecine buccale de Burket ; p. 63–5.
- [43] : Rad F, Yaghmaee R, MehdiAbadi P, Khatibi R. Un essai clinique comparatif de la triamcinolone topique (ad Cortyle) et d'une solution à base de plantes pour le traitement de la stomatite aphteuse mineure. *Armaghane-danesh*. 2010 ; 15 (3):191–8.
- [44] : Conception, formulation et évaluation d'un gel oral d' extrait de fleur de *Punica Granatum* pour le traitement de la stomatite aphteuse récurrente Abolfazl Aslani , Behzad Zolfaghari , et Fatemeh Davoodvandi *Adv Pharm Bull*. 2016 septembre ; 6(3): 391–398.
- [45] : Singh M, D'Silva V (2014) *Preparation and Evaluation of herbal gel containing ethanolic extract of Ipomoea*. *Int J Sci Res*. 3 : 1862-1866.
- [46] Hamid EL-Haoud, Moncef Boufellous, Assia BERRAN, Hind Tazougart et Rachid Bengueddour. SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: MENTHA SPICATA L. *Am. J. innov. res. appl. sci*. 2018 ; 7(4): 226-233.
- [47] : 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.
- [48] : Dewanto, V. Wu, X., Adom, K.K. Liu, R.H. 'Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity'. *J. Agric. Food Chem*. Vol.50. (2002).pages 3010–3014
- [49] : Majjob, F., Kamalinejab, M., Ghaderi, N., & Vahidipour, H. R. (2003). Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian J Pharma Res*, 2, 77-82.
- [50] : Azzi R. Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'ouest algérien : enquête ethno pharmacologique, analyse pharmaco-toxicologique de figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse de doctorat 2012, P 75.
- [51] : Karumi, Y. O. V. O., Onyeyili, P. A., & Ogugbuaja, V. O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179-182.]

- [52] : N'Guessan, K., Kadja, B., Zirihi, G., Traoré, D., & Aké-Assi, L. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1)
- [53] : Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.]
- [54] : Oloyede, O. I. (2005). Chemical profile of unripe pulp of Caricapapaya. *Pakistan journal of nutrition*, 4(6), 379-381.
- [55] : Chetoui, I. Messaoud, C. Boussaid, M. Zaouali, Y. 'Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content variation among Tunisian natural populations of *Rhus tripartita* (Ucria) Grande and *Rhus pentaphylla* Desf'. Elsevier Journal. (2013). pages 171– 177
- [56] : Ojeil, A. El Darra, N. El Hajj, Y. Bou Mouncef, P. Rizk, T.J. et Maroun, R.G. 'Identification et caractérisation de Composés phénoliques extraits du Raisin chateauxsara'. *Lebanese Science Journal*, Vol .11. (2010). p 2
- [57] : Nguyen V T, 'Evaluation of polyphenol content and antioxidant activities of Dill leaves extract *Anethum graveolens*' LIOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 991 (2020). 012032.
- [58] : Topçu G, Ay A, Billici A, Sarihurkucu C, Ozturk M, and Ulubelen A. *Food Chemistry*, 2007, 103, 816-822.
- [59] : D. Marinova, F. Ribarova, M. Atanassova *Journal de l'Université de technologie chimique et de métallurgie*, ; TOTAL PHENOLIQUES ET TOTAL FLAVONOÏDE EN FRUITS ET LÉGUMES BULGARE CAPABLES 40, 3, 2005, 255-260
- [60] : "In Quantification of tannins in tree foliage" Working document, FAO/IAEA, Vienna, 2000, et P.Schofield, D.M. Mbugua, A.N.Pell, "Analysis of condensed tannins" a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2001, Vol. (91), page : 21.9.
- [61] : Kaneyoshi M. and Jones W. J. (1999). *Mater. Chem*, 9 805 – 811.
- [62] : Serigne, I. 'Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumacher Int'. *J. Biol. Chem. Sci.* (2017). 11(2): pages 768-776.

[63] : <http://chimactiv.agroparistech.fr/>

[64] : Kadri A, Zarai A, Békir A, et al (2011) Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10(19): 3908–14.

[65] : Dave, BS., Amin, AF., Patel, MM., “Gastroretentive drug delivery system of ranitidine hydrochloride: formulation and in vitro evaluation”. *AAPS Pharm Sci Tech.* V.5, (2004), 77–82.

[66] : *Drug Discovery and Evaluation : Pharmacological Assays/* Vogel, Hans G. (Ed.).

[67] : V. V. (2009). *Clinical Pharmacology / V. Veber. -Medicine.* 448 p

[68] : Activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'écorce de *Ficus racemosa* L. à l'aide de la méthode de dénaturation de l'albumine Sharmila Dharmadeva , Lahiru Sandaruwan Galgamuwa , C. Prasadinie , et Nishantha Kumarasinghe Ayu :2018 octobre-décembre ; 39(4): 239-242.

[69] : Medina MB. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agricult Food Chem* 2011;59: 1565- 71.]. [Brooks P. The burden of musculoskeletal disease: A global perspective. *Clin Rheumatol* 2006 ; 25 : 778-81.

[70] : *Ruellai prostrata* Poiré. Activité évaluée par les phytoconstituants, activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne, etin silicofonctions moléculaires Shahina Akhter ; M. Walid Hossain, Sharmin Sultana ; Jannatul Ferdous Jharna , Nigar Sultana Meghla ; Rahat Alam ; KM Anis-Ul-Haque : Md. Mashiar Rahman. *Journal of Saudi Chemical Society* Volume 26, Issue 1, January 2022, 101401

[71] : Phytochemical and Antimicrobial Activity of (*Crassula ovata*) Jade Plant on Different Strains of Bacteria Mwangi Denis Muiruri^{1*} and Wambura Mwangi¹ Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, P.O.Box 62,000 – 00200 Nairobi, Kenya. *European Journal of Medicinal Plants* page 11.

[72] : Medina MB. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agricult Food Chem* 2011;59: 1565- 71.]. [Brooks P. The burden of musculoskeletal disease: A global perspective. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 778-81.