

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou
Faculté de Médecine – Département de Pharmacie



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة مولود معمري بتيزي وزو
كلية الطب – قسم الصيدلة

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en Pharmacie

Présenté sous forme d'article scientifique et soutenu
publiquement

Le : 22/07/2023

Sous le Thème ;

**Etude physicochimique et de cicatrisation -in vivo-
des extraits du rhizome de *Carthamus caeruleus* L et
développement d'une préparation pharmaceutique
cosmétologique a usage dermique**

Réalisé par :

ALIOUANE Anya Katia

AMIRAT Abderrahim

KACI Nadia

Tassadit

ZERROUKI Mohamed Rafik

Encadrés par :

Pr MAMOU Marzouk

Co-encadré par :

CHEKROUN

Membres de Jury

DAHMOUNE Amina

AMROUN LAGA Thilali Thanina

BENSISAID Hassan

ZERGOUG Madjid

MCA HU

MCA

MAHU

Pharmacien

Présidente

Examinatrice

Représentant Incubateur

Représentant du CATI

Expert auprès du CATI

Année universitaire 2022 – 2023

Etude physicochimique et de cicatrisation in vivo des extraits du rhizome de *Carthamus caeruleus L* et développement d'une préparation pharmaceutique cosmétologique a usage dermique.

A.K.Aliouane ; A.Amirat ; N.Kaci ; M.R.Zerrouki ; M.Mamou

Département de Pharmacie, Faculté de Médecine, Université Mouloud Mammeri, 15000 Tizi-Ouzou, Algérie

Résumé :

Les plantes thérapeutiques sont de plus en plus étudiées grâce aux avancées des méthodes d'extraction et d'analyse de leurs principes actifs. *Carthamus caeruleus L.*, est une plante d'intérêt utilisé en médecine et en cosmétologie traditionnelle pour ses propriétés cicatrisantes et amélioratrices de la peau. Ce sont les polyphénols, principalement présents dans les parties souterraines de la plante, qui sont responsables de ces vertus. L'objectif de l'étude est la formulation d'une préparation pharmaceutique, cosmétologie, cicatrisante à usage dermique à base de l'extrait aqueu des rhizomes de *Carthamus caeruleus L*. Une étude ethnobotanique a été réalisé dans la région de Boghni afin de connaître l'usage traditionnel, les parties de la plante utilisées et ainsi de procéder à deux extractions : selon la méthode traditionnelle à partir des rhizomes de la plante, et par macération de la poudre des rhizomes séchés dans deux solvants différents afin d'extraire les polyphénols totaux. Ces extraits ont été analysés par HPLC pour identifier les composés phénoliques en suivant une méthode analytique mise au point par identifications de 8 standards phénoliques. Un dosage des polyphénols totaux par UV-Visible a également été effectué. Une étude in vivo sur des lapins a été réalisée afin d'étudier l'activité cicatrisante de la plante et ainsi d'utiliser l'extrait des polyphénols totaux dans la formulation d'une préparation dont on évalua le ph, l'étalement, l'adhérence et le comportement rhéologique. Les résultats de cette étude ont montré un rendement d'extraction meilleure par macération éthanolique. La méthode de dosage par HPLC a permis d'identifier les 8 standards phénoliques dans les macérations et l'extrait

traditionnel. L'extrait naturel des rhizomes s'est révélé plus efficace lors des études in vivo que la pommade MEBO®, et l'étude rhéologique a démontré le caractère atypique et exceptionnel du produit formulé.

Abstract :

Therapeutic plants are increasingly being studied due to advances in extraction and analysis methods of their active principles. *Carthamus caeruleus L.* is a plant of interest used in traditional medicine and cosmetology for its healing and skin-improving properties. These virtues are attributed to polyphenols, mainly present in the underground parts of the plant. The objective of the study is to formulate a pharmaceutical and cosmetological preparation for dermal use, based on the aqueous extract of *Carthamus caeruleus L.* rhizomes. An ethnobotanical study was conducted in the Boghni region to understand its traditional use and the plant parts used. This led to two extractions : one using the traditional method from the plant's rhizomes, and the other through maceration of dried rhizome powder in two different solvents to extract total polyphenols. The extracts were analyzed using HPLC to identify phenolic compounds, following an analytical method developed with the identification of 8 phenolic standards. Total polyphenols were also measured using UV-Visible spectrophotometry. An in vivo study on rabbits was conducted to investigate the plant's healing activity, and the extract of total polyphenols was used in the formulation of a preparation evaluated for pH, spreadability, adhesion, and rheological behavior. The results of this study showed a higher extraction yield through ethanolic maceration. The HPLC

method allowed the identification of the 8 phenolic standards in the macerations and traditional extract. The natural extract from the rhizomes proved to be more effective in in vivo

studies than the MEBO® ointment, and the rheological study demonstrated the distinctive and exceptional nature of the formulated product.

Introduction

De nos jours, les vertus thérapeutiques des plantes présentent un regain d'intérêt grâce à l'amélioration des techniques extractives et aux progrès des méthodes d'analyses structurales pour la découverte de nouveaux principes actifs (1). Riche par sa diversité florale, l'Algérie constitue un véritable réservoir phylogénétique qui a donné à la médecine traditionnelle algérienne une richesse inestimable mais très mal exploitée(1). En effet, étant source d'actifs, l'usage de ces plantes ne se limitait pas uniquement au traitement des maladies mais s'étendait également à l'amélioration de la qualité de vie, à la guérison des affections cutanées ou encore, dans les soins de beauté, pour sublimer la peau et les cheveux. Dans l'optique de valoriser la médecine traditionnelle, les plantes à vertus thérapeutiques sont identifiées, étudiées et valorisées. C'est dans ce contexte que nous nous intéressons à l'espèce *Carthamus caeruleus* L.

L'espèce *Carthamus caeruleus* L. est une plante angiosperme dicotylédone appartenant à l'ordre des Asterales et à la famille des Asteraceae. C'est une plante vivace à rhizomes que l'on qualifie de rudérale, elle pousse sur les terres humifères et légères et supporte tous types de sol. Elle est rencontrée en Afrique du Nord, de l'Est (Algérie, Maroc, Tunisie) et du Sud, en Europe (Espagne, Grèce, Italie, Portugal), en Asie, ainsi qu'en Amérique du Nord et du Sud(2).

En Algérie, l'espèce est connue sous le nom de " Marsegus" ou " Marzegzeg". Elle est retrouvée dans les régions de Tizi-Ouzou, Bouira, Boumerdes, Tlemcen et Sétif. Régions où les extraits de ses rhizomes sont utilisés en médecine et cosmétologie traditionnelles pour soigner les brûlures, cicatriser les plaies, purifier la peau et traiter les imperfections(2).

Ce sont les polyphénols, que l'on retrouve majoritairement dans la partie souterraine de la plante, qui sont à l'origine de ces vertus (2).

Ces composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui représentent une classe de molécules naturelles très complexes estimées à plus de 10000 structures(3). Largement distribués dans le règne végétal (4), ces polyphénols sont divisés en acides phénoliques et en flavonoïdes et sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupes aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxylés(5). Ces molécules possèdent une gamme de propriétés bénéfiques pour la santé. Par conséquent, une attention particulière a été consacrée à leur analyse.

Afin d'acquérir des connaissances sur leurs activités potentielles, un isolement et une purification appropriés de ces composés à haute valeur ajoutée sont nécessaires. À cette fin, plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour caractériser les polyphénols dans les échantillons naturels, parmi lesquelles l'HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) et la méthode spectrophotométrique se démarquent. L'HPLC offre une séparation précise des différents polyphénols présents dans un échantillon, permettant ainsi une identification et une quantification spécifique(6). D'autre part, la méthode spectrophotométrique, basée sur l'absorption de la lumière par les polyphénols, permet une estimation rapide de la teneur totale en polyphénols(7). Ces deux méthodes sont complémentaires et jouent un rôle crucial dans la compréhension des propriétés des polyphénols et de leur concentration dans les produits cosmétiques traditionnels.

Par ailleurs, les polyphénols ont fait l'objet de plusieurs études antérieures démontrant leur rôle majeur dans le processus de cicatrisation et de ré-épithélisation cutanée(3). En effet, étant un processus complexe, celle-ci implique

différentes phases ; l'inflammation, la prolifération cellulaire et la maturation tissulaire(8). Les polyphénols peuvent influencer chacune de ces phases et favoriser une cicatrisation plus rapide et plus efficace. Outre leur effet antioxydant responsable de la neutralisation des radicaux libres(9), les polyphénols réduisent l'inflammation excessive qui entrave la cicatrisation et favorisent la transition vers la phase proliférative(10). Ceci stimule les fibroblastes, des cellules responsables de la production du collagène qui accélère le renouvellement tissulaire. Les polyphénols peuvent également avoir des propriétés antimicrobiennes (11)aidant à la prévention des infections au site de la blessure.

Plusieurs études *in vivo* réalisées sur des animaux de laboratoires (souris, rat et lapins)(2) ont montré l'effet cicatrisant du rhizome de *Carthamus caeruleus* L. par rapport aux traitements de référence.

L'objectif de cette étude est de développer une préparation pharmaceutique à usage topique et à visée cosmétologique, à base d'extraits de rhizomes de *Carthamus caeruleus* L. possédant des propriétés cicatrisantes et répondant aux différentes exigences de caractérisation, de formulation et des essais de tolérance.

Problématique :

Le recours au savoir ancestral de médecine traditionnelle n'est pas tout à fait inoffensif. Les plantes médicinales peuvent être responsables d'effets indésirables, dangereux, voire mortels, nécessitant une vigilance continue, des conditions de fabrication et de contrôle rigoureuses(12). L'usage de la phytothérapie en Algérie se heurte à deux principaux obstacles : le manque de connaissances et de formations adéquates garantissant un bon usage de ces actifs et l'absence de système de contrôle assurant l'efficacité et l'innocuité des produits à base de plantes.

C'est dans cette optique et afin d'encourager le recours à la phytothérapie, de préserver le savoir de nos grand-mères tout en assurant une sécurité d'emploi que nous avons réalisé ce travail.

Matériels et Méthodes :

1. Lieu d'étude :

Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou– UMMTO.

2. Matériel végétal :

L'étude s'est portée sur les rhizomes frais et secs de la plante *Carthamus caeruleus* L. (figure 01), récoltés au mois de Janvier 2023 et au mois de Mai 2023 au nord de l'Algérie, dans la commune de Boghni située à 249 m d'altitude et à environ 38 km au Sud-Ouest de la wilaya de Tizi-Ouzou. L'espèce a été identifiée par le Dr. BERIALA, Maître assistante en Pharmacognosie au Département de Pharmacie de la Faculté de Médecine de Tizi-Ouzou.

Selon Quezel et Santa (1963), l'espèce *Carthamus caeruleus* L. est classée comme suit :

- RÈGNE : Plantae
- EMBRANCHEMENT : Cardueae
- SOUS-EMBRANCHEMENT : Centaureinae
- GENRE : Carthame
- FAMILLE : Asteraceae
- ESPÈCE : *Carthamus caeruleus* L.



Figure 01: photographie de *Carthamus Caeruleus* L.
A : Tige et fleur, B : Rhizome

2.1. Séchage et conservation :

Les rhizomes récoltés en janvier ont été nettoyés et séchés à température ambiante à l'abri de la lumière pendant trois semaines afin d'éviter toute perte de composés actifs. Le séchage de la plante a été validé par le Dr.BERIALA, maître assistante en pharmacognosie. Quant aux rhizomes récoltés au mois de mai, ils ont été utilisés à l'état frais.

3. Matériel animal :

L'essai *in vivo* a été réalisé sur des lapins provenant d'un élevage situé dans la région de Tizi-Ouzou. La systématique est la suivante :

- ANIMAUX : Lapins
- ESPÈCE : *Oryctolagus cuniculus*
- NOMBRE : 06
- SEXE : Femelles
- POIDS : 2.593 +/- 20g



Figure 02: Lapins utilisés lors de l'expérimentation

3.1. Conditions de stabulation :

Les lapins ont été placés dans des cages individuelles métalliques, munies d'une trémie pour l'aliment et de tétines pour l'abreuvement. Les lapins sont alimentés et abreuvés *ad libitum*. L'aliment est de type granulé de commerce. Les cages sont disposées dans le laboratoire de toxicologie du département de pharmacie.

- Température : 30 - 40 °C ;
- Eclairage : 12/24h.

4. Étalons et réactifs :

- Étalons phénoliques : acide gallique, rutine, acide cinnamique, quinoléine (BIOCHEM), acide cafféique (ALDRICH chemistry), acide para-coumarique, catéchine (SIGMA) ;
- Le réactif de Folin-Ciocalteu de SIGMA ;
- Les solvants : acide acétique glacial, éthanol, méthanol, eau distillée, tous de qualité HPLC, proviennent de BIOCHEM.

5. Appareils et verrerie :

Chromatographe en Phase Liquide à Haute Performance (Shimadzu LC 20), Spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1900i), Bain à Ultrason, Agitateur Magnétique Chauffant, Balance Analytique, verrerie de laboratoire, consommables.

6. Etude ethnobotanique :

L'étude ethnobotanique a permis de se renseigner sur l'usage thérapeutique traditionnel de *Carthamus caeruleus* L. et de déterminer les parties utilisées de la plante, la fréquence de son utilisation ainsi que les modes de préparation, d'administration et de conservation, une enquête ethnobotanique a été réalisée dans la région de Boghni.

7. L'extraction traditionnelle :

Selon l'enquête ethnobotanique, la procédure traditionnelle d'extraction utilisée fut décrite comme suit : une quantité de rhizomes a été lavée puis fragmentée après élimination de la couche superficielle, avant d'être broyée au moyen d'un pilon mortier. Le cataplasme obtenu est filtré à l'aide d'un tissu afin de récupérer le liquide.

Au niveau du Laboratoire, une partie de ce liquide est centrifugée deux fois à raison de 5000 tours pendant trois minutes. 2g du surnageant récupéré est filtré au filtre seringue PTFE de 0,45 nm puis dilué dans 20 ml de méthanol pur, agité au vortex avant d'être transféré dans un vial pour une analyse par HPLC. L'autre partie est conservée à température ambiante, à l'abri de la lumière, dans un pot stérile, hermétiquement fermé jusqu'à gélification. L'extrait obtenu est utilisé pour l'étude *in vivo*.

8. Analyse des Polyphénols :

8.1. Extraction des polyphénols :

Pour extraire les polyphénols des rhizomes séchés de *Carthamus caeruleus* L. par macération, nous avons opté pour le protocole décrit par Mahmoudi et al. en y apportant quelques modifications : Les Rhizomes de la plante ont été broyés au broyeur électrique, puis tamisés à travers un tamis de 0,19 mm. 25 g de poudre végétale sèche obtenue sont macérés à température ambiante pendant 72 heures dans 100 ml des solutions aqueuses suivantes : éthanol 70% (v/v) et méthanol 70% (v/v) sous agitation magnétique pendant 30 minutes. Les acides phénoliques trop polaires (acide benzoïque) ne seront pas totalement extraits dans des solvants organiques purs. C'est pourquoi, nous avons opté pour ces solutions aqueuses. Le mélange est filtré toutes les 24h sur papiers wattman (3mm), les filtrats sont rassemblés puis évaporés à sec sous pression réduite à 60°C pour l'éthanol et à 65°C pour le méthanol à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi R- 461). L'extrait est

séché à l'étuve à 40°C pendant 24H et conservé à l'obscurité à 4°C.

Le rendement (R%) de chaque extraction des composés phénoliques est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R\% = \frac{(m - m_0)}{m_T} \times 100$$

Où :

- m : masse du ballon après extraction ;
- m₀ : masse du ballon vide (avant l'extraction) ; (m-m₀) : masse de l'extrait sec ;
- m_T : masse totale de la poudre végétale utilisée dans l'extraction. Une comparaison entre les rendements des deux extractions nous permettra de déterminer le meilleur solvant.

8.2. Préparation des standards :

Huit (8) étalons de composés phénoliques ont été utilisés : Acide caféique, Acide cinnamique, Acide p-coumarique, Catéchine, Acide gallique, Quercitrine, Quinoléine, Rutine.

Une solution stock à 0.5mg/ml est individuellement préparée pour chaque composé phénolique. Ces solutions ont été préparées en dissolvant 10 mg de chaque étalon dans 20 ml de méthanol.

Une solution mère est préparée en prélevant 5 ml de chaque solution stock dans une fiole de 50 ml. Le volume est complété avec le méthanol.

Les courbes d'étalonnage ont été préparées en diluant la solution mère en une série de 4 niveaux de concentrations : 0.2mg/ml, 0.4mg/ml, 0.6mg/ml, 0.8mg/ml dans du méthanol.

8.3. Analyse des polyphénols par HPLC :

L'analyse des polyphénols par HPLC a été effectuée en utilisant un automate SHIMADZU (LC 20). La méthode a été mise au point au niveau du laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Tizi-Ouzou. La séparation chromatographique a été réalisée à travers une colonne C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm). La phase mobile est composée d'une solution aqueuse d'acide acétique à 2% V/V (solvant A) et du Méthanol (solvant B) et a été utilisée en mode gradient d'élution. Le débit était de 1 ml/min, le volume d'injection de 20 µl et la détection UV s'est faite à deux longueurs d'ondes : 260 et 320 nm conformément aux résultats de la balayage UV.

Les composés phénoliques ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention à ceux des standards, huit solutions standards ont été préparées à des concentrations individuelles de

50 µg/ml.

9. Dosage des polyphénols totaux par UV-Visible :

9.1. Principe : Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) décrite par Boizot et al. (2006), en y apportant de légères modifications. Ce réactif est constitué d'un mélange de deux acides : l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation des phénols, le réactif de Folin est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène(13). La coloration produite, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

9.2. Mode opératoire :

400 µl d'extrait de *Carthamus Caeruleus* L. sont mélangés à 2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10ème, et à 1.6ml de Na₂CO₃ à 7,5 % (m/v). Le mélange est agité et incubé dans l'obscurité et à température ambiante pendant vingt minutes. L'absorbance est mesurée à 736 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1900i).

Afin de quantifier la teneur en polyphénols totaux, l'acide gallique a été utilisé comme standard de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage.

Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique/g de matière végétale (mg GAE/g).

10. Activité cicatrisante :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie de la faculté de Médecine de Tizi-Ouzou, UMMTO, durant la période allant du 10/06/2023 au 04/07/2023. Au total six (06) lapins femelles de souche hybride, provenant de l'animalerie ont été placés dans des cages individuelles et soumis à une période d'acclimatation avant le démarrage de notre essai.

Le médicament de référence est le MEBO®, une pommade cicatrisante composée de β-sitostérol à 0,25% comme principal ingrédient actif. Secondairement, d'huile de sésame et de cire d'abeille, incluant 18 acides aminés, 4 acides gras majeurs, des vitamines et des polysaccharides.

10.1. Principe : Pratiquer une excision cutanée et suivre l'évolution de la cicatrisation(14).

10.2. Protocole :

- Répartition des animaux en lots : Les six lapins ont été marqués individuellement, pesés et

répartis aléatoirement en 3 lots équitables de 2 lapins chacun :

- Un groupe témoin négatif : constitué d'un lot de 2 lapins non traités ;

- un groupe témoin positif : constitué d'un lot de 2 lapins traités par une pommade cicatrisante, le MEBO® ;

- un groupe test : constitué également d'un lot de 2 lapins traités par l'extraction traditionnelle de *Carthamus caeruleus* L.

• Excision cutanée : Initialement, les poils de la partie dorsale des lapins ont été rasés à l'aide d'une lame 24h avant l'excision cutanée. Ensuite, les lapins ont subi une anesthésie générale par administration de la kétamine par voie intramusculaire à raison de 0,15 mg/kg afin d'éviter leur souffrance et de faciliter leur manipulation. Ultérieurement, dans des conditions d'asepsie rigoureuses, à l'aide d'un emporte-pièce rond d'environ 6cm de diamètre, la surface à exciser est délimitée par marquage. Le disque excisé est prélevé à l'aide d'un bistouri après désinfection de la région par une solution désinfectante iodée (BETADINE®).

L'extrait de rhizomes de la plante *Carthamus caeruleus* L., instantanément préparé, est appliqué sur la plaie provoquée jusqu'à recouvrement total de la surface excisée. La plaie est ensuite recouverte par une compresse stérile suivie d'un bandage adéquat et fixé par du sparadrap hypoallergénique pour éviter toute éventuelle surinfection. La même procédure est appliquée chez les groupes témoins positifs et négatifs.

Des injections de paracétamol par voie intraveineuse à raison de 100mg/kg sont effectuées juste après l'excision afin de réduire la douleur chez les lapins.

• Rythme d'administration : L'extrait de *Carthamus* ainsi que la dose de la pommade MEBO® sont appliqués à 48h d'intervalle sur les plaies des groupes tests et témoins positifs respectivement. Il en est de même pour les témoins négatifs, qui se voient changer leur pansement chaque 48h et aucune antibiothérapie prophylactique n'a été appliquée.

10.3. Expression des résultats : l'évolution de la cicatrisation est suivie selon deux modes :

- Suivi par observation des plaies : L'aspect des plaies est suivi et décrit toutes les 48h, avec un suivi rigoureux de l'apparition des croûtes et une surveillance accrue de la présence ou l'absence de pus ;

- Mesure de la surface des plaies : Les plaies sont calquées à l'aide de papier transparent. Celui-ci est ensuite repris sur du papier millimétré pour la mesure de la surface en utilisant le logiciel AutoCad. A partir de ces résultats, le pourcentage de réduction des plaies et le taux de cicatrisation sont ensuite calculés suivant l'équation :

$$\text{Taux de cicatrisation}\% = \frac{(J_0 - J_n)}{J_0} \times 100$$

Avec :

• J_0 : Moyenne des surfaces des plaies de chaque lot au jour de l'excision ;

• J_n : Moyenne des surfaces de chaque lot à J_n .

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et écart-types et l'évaluation statistique est effectuée par le test de Student dont les résultats sont calculés par le logiciel JASP (0.17.2.1) sont interprétés de la façon suivante :

• $P > 0,05$: la différence est non significative ;

• $0,05 > p > 0,01$: la différence est significative ;

• $0,01 > p > 0,001$: la différence est hautement significative ;

• $P < 0,001$: la différence est très hautement significative.

11. Formulation :

11.1. Préparation du gel : une quantité préalablement pesée de glycérol est ajoutée à 34.6 ml d'eau épurée. On disperse l'hydroxyethyl cellulose dans le mélange d'eau et de glycérine, à l'aide d'un agitateur mécanique de laboratoire (heidolph RZR 1) sous une forte homogénéisation. On ajoute le carbopol tout en poursuivant lentement l'homogénéisation jusqu'à disparition totale de la mousse. L'extrait aqueux de *Carthamus caeruleus* L. est introduit tout en maintenant l'agitation. On obtient une dispersion d'une faible viscosité avec un pH de 4.7 à laquelle on ajoute 7 gouttes de triéthanolamine pour augmenter le pH du gel et le maintenir à une valeur neutre et poursuivre l'agitation pendant 5 min sous faible homogénéisation.

11.2. Contrôles :

- Caractères organoleptiques : Le gel obtenu est inspecté afin de décrire ses caractéristiques organoleptiques. La couleur est appréciée en posant une petite quantité du gel sur fond blanc, la consistance par application sur la peau, et l'odeur en sentant le produit. L'homogénéité, la présence ou l'absence d'agrégat a également été observée(15).

- Mesure du pH : L'électrode d'un pH-mètre a été entièrement plongée dans le gel. La lecture est répétée trois fois, et le résultat exprime la moyenne des trois lectures(16).

Aptitude à l'étalement : De légères modifications ont été apportées à la méthode des plaques parallèles afin d'apprécier l'aptitude d'étalement du gel : 1g de gel a été disposé sur une plaque en verre (25x25cm) placée au-dessus d'une feuille millimétrée. Une seconde plaque de la même dimension est placée parallèlement à la précédente. On a fait agir différents poids de 50, 100, 200, 250 et 500g individuellement et dans ce même ordre sur la plaque supérieure pendant 1 minute. La transparence des plaques permet de mesurer les diamètres de la zone d'étalement du gel sur la feuille millimétrée. Cette opération est répétée trois fois. La moyenne des 3 diamètres pour chaque poids appliqué permet de calculer les surfaces des zones d'étalement et ainsi de tracer la courbe de variation des surfaces d'étalement du gel en fonction du poids(17).

- L'adhérence : 1 gramme de formulation a été disposé entre deux plaques en verre, que l'on a pressées ensemble avec une charge de 1kg pendant 5 minutes. Une fois les 5 minutes écoulées, la charge est relâchée, et le temps nécessaire aux deux objets en verre pour se séparer est enregistré. L'opération a été répétée trois fois(18).

- Rhéologie : Les mesures rhéologiques ont été réalisées au niveau de la faculté de chimie de l'université Saad Dahleb de Blida. L'appareil utilisé est un rhéomètre de type MCR 302 Physica Rhéo lab, relié à un thermostat où la température est maintenue entre 9 et 10°C. Le rhéomètre est piloté par le logiciel rhéoplus qui permet d'effectuer le traitement des données.

Afin d'établir la courbe d'écoulement du gel, une géométrie cône/plan 1:60 et un stator (mobile) de 25 mm ont été utilisés. Des contraintes de cisaillement ont été appliquées sur 3 ml du produit en utilisant une échelle logarithmique croissante en vitesse de déformation de cisaillement allant de 0.001 1/s à 1000 1/s. Les mesures ont été réalisées à 25°C (température ambiante), et répétées après 5 minutes de repos à la même température, 35°C (température corporelle) et 10°C.

Afin d'évaluer la viscoélasticité sur un nouvel échantillon (3ml), un signal sinusoïdal (régime oscillatoire) a été appliqué en augmentant la vitesse de déformation en utilisant 5 points par décade et une fréquence d'oscillation de 1hz. Cela a permis de mesurer deux paramètres : le module de conservation G', et le module de dissipation G''. La température est maintenue à 20°C.

Résultats :

1. Enquête ethnobotanique :

L'étude ethnobotanique, menée sur un échantillon de 50 individus, a révélé une utilisation précise de la plante *Carthamus caeruleus* L. par la population locale, en prenant compte de divers aspects tels que les parties utilisées, les modes de préparation et d'administration, ainsi que les usages associés. Les données résultant, englobant à la fois les informations démographiques des participants (sexe, âge et niveau d'étude) et les informations relatives à l'utilisation de la plante, sont présentées dans le tableau I.

Selon notre enquête, les personnes ayant un niveau d'instruction universitaire ont tendance à suivre précisément les modes de préparation, d'administration, la posologie et les précautions d'emploi. Contrairement à celles ayant un niveau d'instruction plus bas. Les participants interrogés ont montré peu de familiarité avec la quantité de rhizomes à utiliser et le dosage approprié du solvant associé.

L'enquête a également révélé une tendance prédominante d'utilisation exclusive de la plante sans association à d'autres drogues ou substances médicamenteuses, en particulier dans les cas de brûlures légères ou de plaies superficielles. Cependant, lors de notre étude, un médecin légiste a rapporté un cas de décès résultant d'une infection grave causée par l'application de cette plante sur des brûlures étendues à l'ensemble du corps.

Tableau I:Résultats de l'enquête ethnobotanique

Paramètre	Catégorie	Résultat (%)
Âge	20-30 ans	07
	30-40 ans	22
	40-50 ans	33
	50-60 ans	29
	60-70 ans	09
Sexe	Femme	70
	Homme	30
Niveau d'étude	Non scolarisé	23
	Primaire	20
	Collège	19
	Lycée	25
	Université	13
Indications	Brûlures et plaies	49
	Cosmétologie et dermatologie	47
	Ulcères	00
	Hémorroïdes	04
Partie utilisée	Racines et Rhizomes frais	100
Voie d'administration	Topique	100
Mode de préparation	Cataplasme	53
	Décoction	47
Solvant	Eau	71

	Lait de vache	20
	Lait de chèvre	9
Résultats attendus	Cicatrisation très significative	75
	Cicatrisation modérée	17
	Cicatrisation faible	8

2. Rendement d'extraction :

Il en ressort un rendement de 12,3% pour l'extraction méthanolique, et un rendement de 14,5% pour l'extraction éthanolique.

3. Analyse des polyphénols par HPLC :

Les résultats de la mise au point pour l'analyse des 8 standards phénoliques par HPLC, sont représentés dans le tableau II et les figures (03) et (04) et l'analyse de l'extrait naturel de *Carthamus caeruleus* L. et des extraits hydroalcooliques sont représentés dans le tableau III et les figures (04) et (05).

Tableau II: Résultats de la mise au point de méthode pour l'identification des polyphénols

Composé	Temps de rétention	Linéarité A= f(C)	Linéarité H= f(C)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Acide gallique	7,129	Y= 4660,83x - 13803,2 R ² =0,999 σ _A =30844,58 σ _B =92,45	Y= 215,879x + 1104 R ² =0,999 σ _A =1411,96 σ _B =4,23	8,20	24,85
Rutine	42,331	Y= 4660,83x - 13803,2 R ² =0,999 σ _A =30844,57 σ _B =92,45	Y= 215,87x + 1104 R ² =0,999 σ _A = 1411,96 σ _B =4,23	21,58	65,41
Acide p-coumarique	38,944	Y= 3350,76x + 1707,9 R ² =0,999 σ _A =16628,21 σ _B =50,19	Y= 151,85x + 612,9 R ² =0,999 σ _A =782,69 σ _B =2,36	17,01	51,54
Acide cafféique	30,582	Y= 17504x - 22628,3 R ² =0,999 σ _A =11710,17 σ _B =350,04	Y= 792,74x + 2117,2 R ² =0,999 σ _A =4031,36 σ _B =12,05	16,78	50,85
Acide cinnamique	46,339	Y= 12480,63x + 27818 R ² =0,999 σ _A =60318,5 σ _B =172,71	Y= 1150,096x + 3584,1 R ² =0,999 σ _A =5696,46 σ _B =16,31	16,35	49,53
Quercétine	48,122	Y= 9323,3x - 12733 R ² =0,999 σ _A =40716,83 σ _B =123,38	Y= 13208,15x + 27818 R ² =0,999 σ _A =60318,5 σ _B =182,78	15,07	45,67
Quinoléine	45,258	Y= 1334,34 + 3584,1 R ² =0,999 σ _A =5696,46 σ _B =18,92	Y=47,441x + 2046,1 R ² =0,99 σ _A =827,09 σ _B =2,75	57,53	174,34
Catéchine	23,299	Y= 13308,32x - 5611, R ² =0,997 σ _A =149890,73 σ _B =453,30	Y= 572,85x -2770,6 R ² =0,995 σ _A =7866,62 σ _B =23,79	45,32	137,32

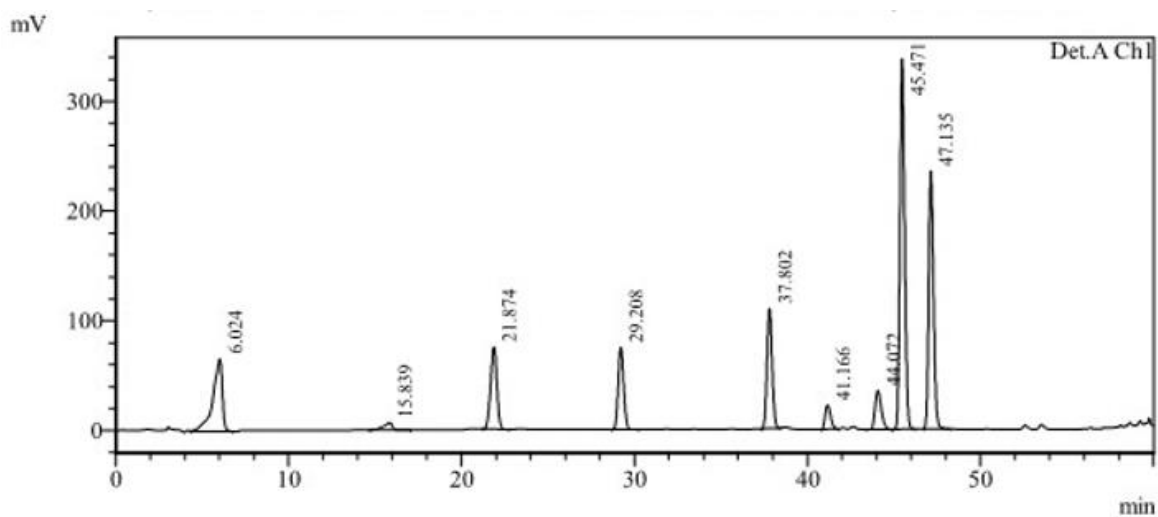


Figure 03 : Chromatogramme des huit standards polyphénoliques à 260nm

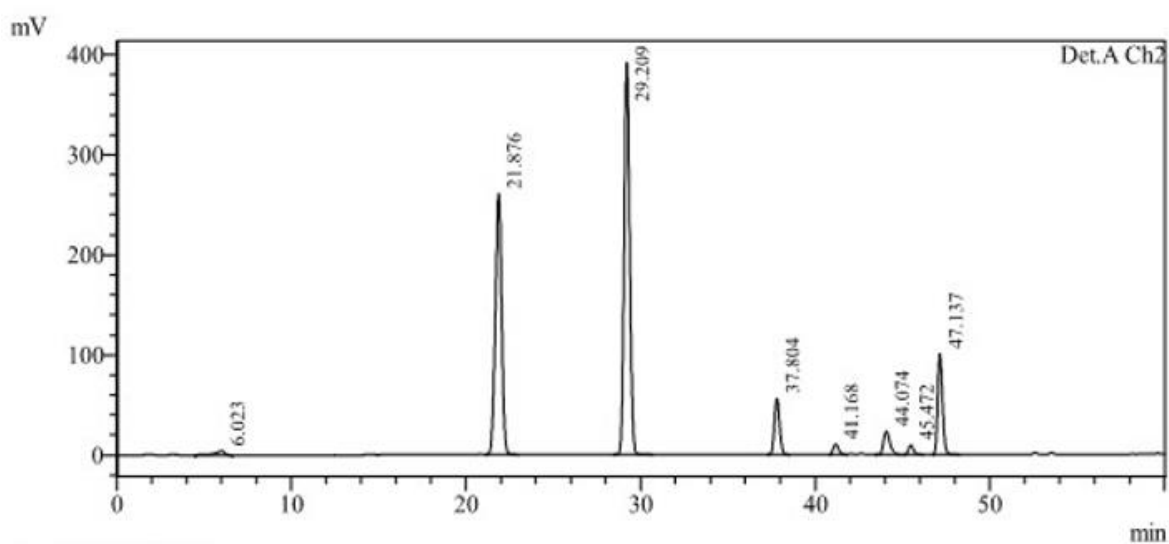


Figure 04:Chromatogramme des huit standards polyphénoliques à 320 nm

Tableau III: Résultats de l'analyse des échantillons de *Carthamus caeruleus L.*

Composé	Temps de rétention		Extraits du 17 juin	
	Temps de rétention	Temps de rétention relatif	Extrait concentré 1	Extrait concentré 2
Acide gallique	7,129	1,00	6,19	6,04
Catechine	23,299	3,27	20,25	19,74
Acide caffeique	30,582	4,29	26,58	25,91
Acide p-coumarique	38,944	5,46	33,85	33,00
Rutine	42,331	5,94	36,79	35,87
Quinoleine	45,258	6,35	39,33	38,35
Acide cinnamique	46,339	6,50	40,27	39,26
Quercetine	48,122	6,75	41,82	40,77

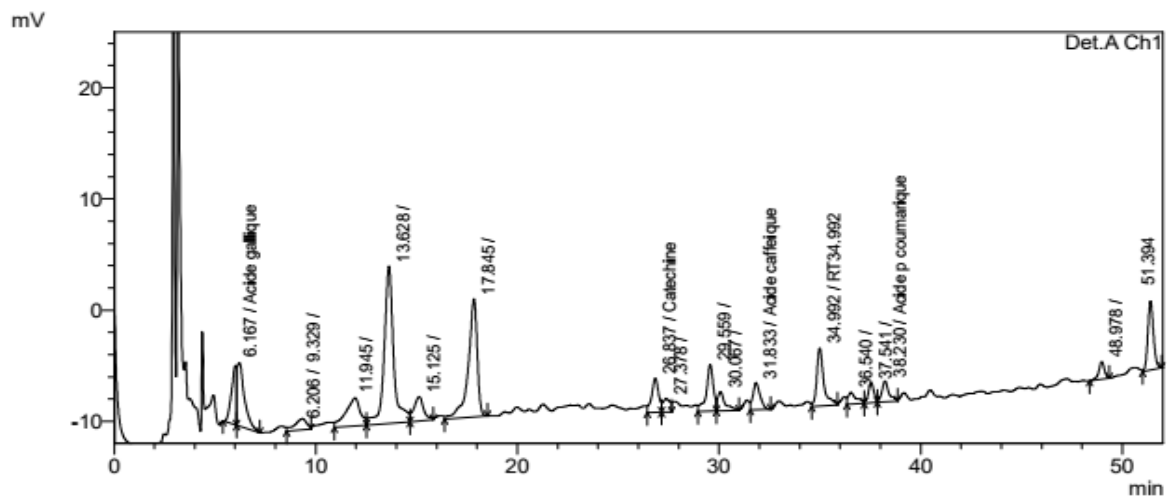


Figure 05: Chromatogramme de l'extrait naturel de *Carthamus caeruleus* L à 260 nm.

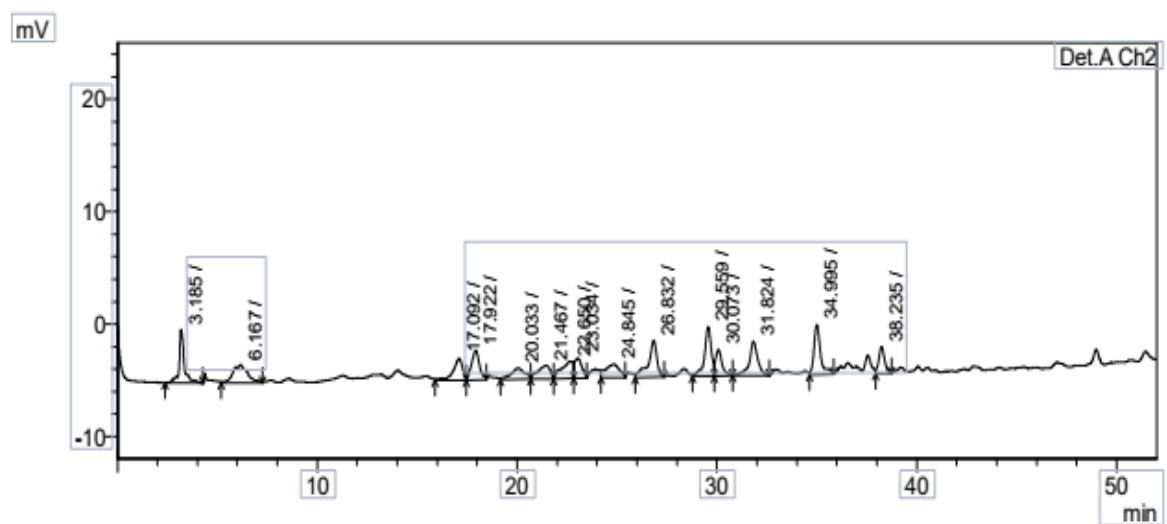


Figure 06: Chromatogramme de l'extrait naturel de *Carthamus caeruleus* L à 320 nm.

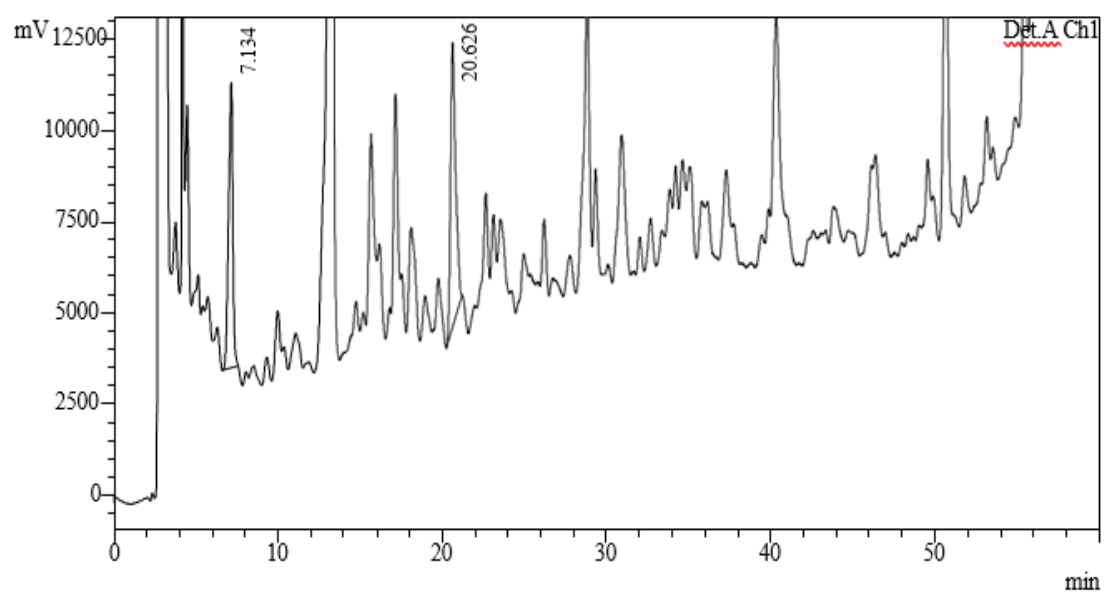


Figure 07: Chromatogramme de l'extrait aqueux à 260nm

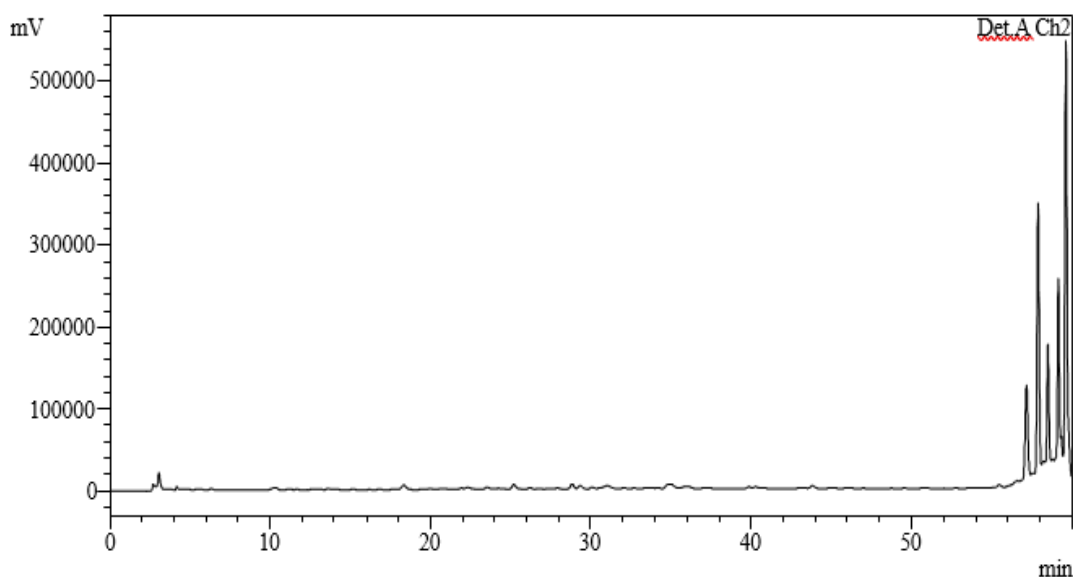


Figure 08 Chromatogramme de l'extrait aqueux à 320 nm

4. Dosage des polyphénols totaux par UV- visible :

La teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Carthamus caeruleus* L. obtenus sont indiqués dans le tableau IV. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique (mg EAG/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique figure (07).

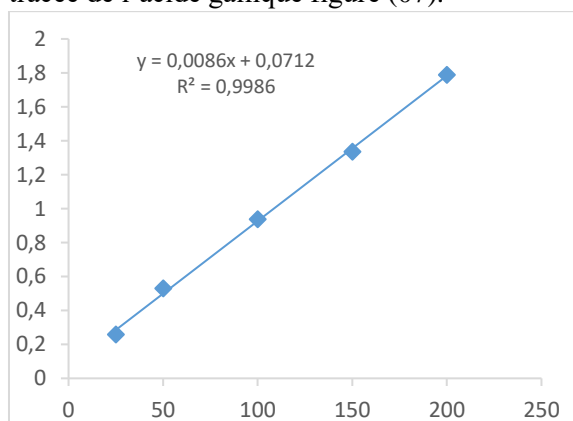


Figure 09: Courbe d'etalonnage de l'acide gallique

Tableau IV: Teneurs en polyphénols dans les 02 extraits hydroalcoolique

Fractions	Teneur en polyphénols totaux mg EAG/g d'extrait
Extrait hydro-éthanolique	44,87
Extrait hydro-méthanolique	35,23

5. Activité cicatrisante :

L'évolution de la cicatrisation des plaies des lapins appartenant aux 3 lots est représentée dans la figure (08) durant toute la période du suivi. Globalement, aucune complication n'a été observée durant le déroulement de l'acte chirurgical et aucun cas de mortalité n'a été constaté au cours du processus cicatriciel.

Nous avons rencontré quelques difficultés lors du changement de pansement les 2 premiers jours, mais nous avons constaté que les lapins se laissaient manipuler plus aisément les jours suivants.

Les pansements adhéraient aux plaies durant les 4 premiers jours chez tous les lapins, puis après, les pansements étaient plus faciles à retirer.

Aucune surinfection n'a été observée pour les lapins traités avec l'extrait de *Carthamus caeruleus* L. Quant aux témoins positifs, nous avons observé sur un des lapins, une plaie infectée avec présence d'une poche remplie de liquide dégageant une odeur nauséabonde sur toute la surface de la plaie au 9^{ème} jour. Celle-ci a été traitée et désinfectée avec de l'eau oxygénée. Les témoins négatifs ont également eu, au 3^{ème} jour, une légère inflammation accompagnée d'une légère suppuration, sans odeur particulière, au pourtour de la plaie. La disparition de celles-ci a été spontanée au bout de 4 jours, sans aucune intervention.

Un léger saignement a été noté chez tous les lapins au 3^{ème} jour après l'excision. Des hématomes ont été observés seulement chez les lapins traités avec l'extrait de *Carthamus* et ceux du témoin négatif. Ces hématomes ont disparu au bout de 2 jours.

En parallèle, on a observé la formation des croûtes de cicatrisation autour des plaies chez les lapins traités par l'extrait de *Carthamus* dès le 3^{ème} jour. La croûte a ensuite recouvert la totalité de la surface de la plaie à partir du 5^{ème} jour, avec la formation d'une couche de ré-épithélisation chez ce groupe et les lapins traités avec la pommade MEBO au 7^{ème} jour. Celle-ci n'a été observée chez les témoins négatifs qu'à partir du 9^{ème} jour.

Enfin, nous avons noté une flagrante poussée de poils au J3 autours des plaies des témoins positifs traités avec la pommade MEBO. Quant aux témoins négatifs et aux lapins traités avec du *Carthamus* la repousse des poils n'a été observée qu'à partir du J9.

Au bout du 17^{ème} jour, les cicatrices ont pris un aspect régulier et sans bourgeons. Au 24^{ème} jour, les cicatrices des lapins test étaient presque invisibles et d'aspect très esthétiques comparé aux témoins positifs.

L'évolution de la surface des plaies des groupes test, témoin + et témoin - sont représentés dans la figure (09).

L'étude statistique des données par le test de student montre qu'aucune différence significative (p -valeur >0.05) n'est observée pendant les quatre premiers jours suivant l'excision. Cependant, une réduction significative (p -valeur <0.05) de la moyenne des surfaces des plaies traitées avec notre plante comparée à celles traitées avec la pommade MEBO est observée au 5^{ème} jour, au 7^{ème} et au 24^{ème} jour.

Au 24^{ème} jour, on a constaté une fermeture totale des plaies traitées par l'extrait de *Carthamus caeruleus* L., tandis que les plaies des témoins montraient une cicatrisation encore incomplète.

La moyenne des surfaces des plaies des lapins traités avec notre plante est de 0.35 cm² contre 1.73 cm² pour les témoins positifs et 0.60 cm² pour les témoins négatifs.

La vitesse de cicatrisation des plaies calculée pour les 3 lots démontre que la plante avec une

vitesse de 1,16 cm²/jour permet une cicatrisation plus rapide comparée aux deux groupes témoins avec une vitesse de 1,10 cm²/jour pour le MEBO et de 1,15 cm²/jour pour les témoins négatifs.

Les taux de cicatrisation ont été calculé et étudié statistiquement et sont représentés dans la figure (10).

Les résultats montrent que dès le 5^{ème} jour, il y a une différence significative (p -valeur <0.05) entre les taux de cicatrisations des plaies des lapins traités avec notre plante et les taux de cicatrisation des plaies des lapins traités avec la pommade MEBO (témoins +). Cette différence est encore plus significative au 24^{ème} jour.

On constate que le taux de cicatrisation atteint 98.76 % chez les lapins traités avec l'extrait de notre plante, tandis qu'il est à 93.86 % chez les lapins traités avec la pommade MEBO et à 97.86% chez lapins non traités (témoins -)

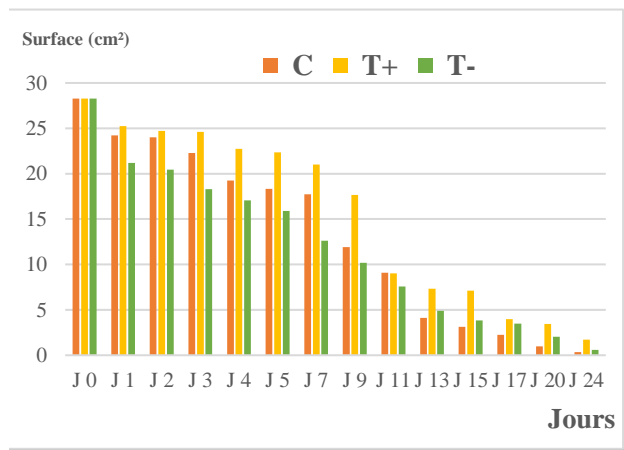


Figure 09 : Evolution de la surface des plaies des lapins test, MEBO et Témoins

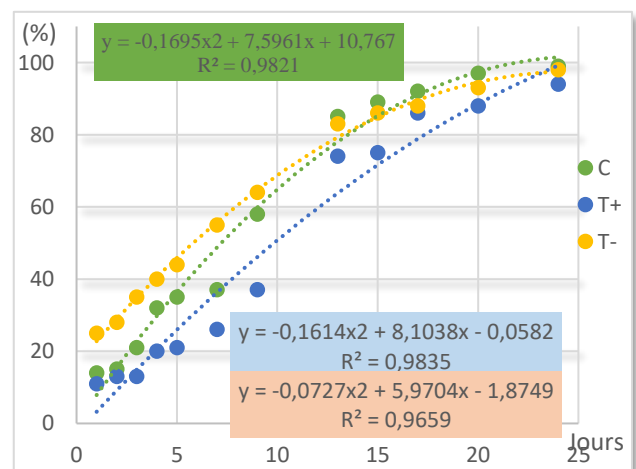


Figure 10 : Evolution du taux de cicatrisation des plaies des lapins test, MEBO et Témoins -

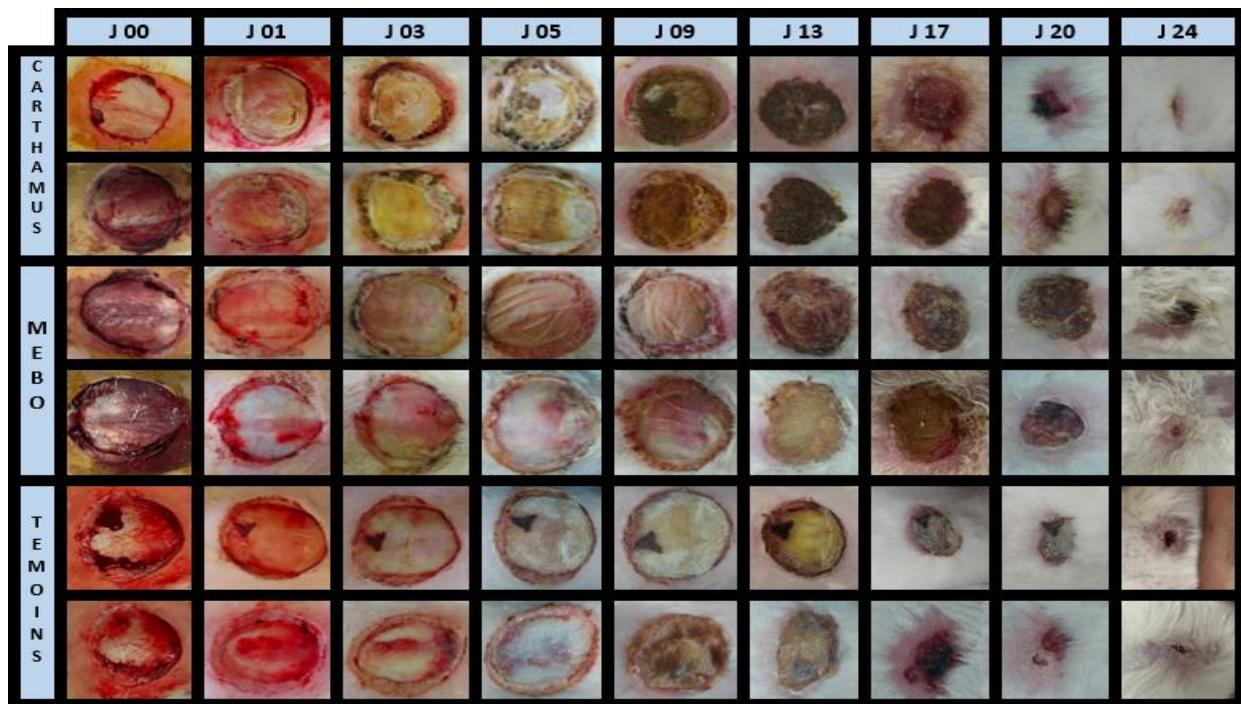


Figure 08 : Evolution des plaies des lapins traités avec Carthamus, Mebo et témoins négatifs

6. Formulation :

6.1. **Caractères organoleptiques :** Le gel obtenu était translucide avec une teinte légèrement marron, moins prononcée que celle de l'extrait aqueux. Sa texture était légère et fluide, s'étale facilement et pénètre rapidement la peau lors de son application en laissant une sensation de fraîcheur et un effet légèrement collant qui s'estompe rapidement. On retrouve une odeur plus atténuée de la poudre des rhizomes mais qui reste caractéristique de la plante. On remarque également l'absence de grumeaux et d'agréats.

- Mesure du Ph : Les 3 mesures successives à j_0 , j_2 et j_{10} ont affiché un même pH d'une valeur de 5.6.

- Test d'étalement : Les moyennes des surfaces d'étalement du gel ont été calculées à partir des diamètres mesurés. Les diamètres de la zone d'étalement se trouvent dans une plage allant de 6.96-8.56 cm, soit une surface de 38.04-57.54 cm². La courbe représentant l'évolution de la surface d'étalement en fonction des poids (figure 11), montre une évolution progressive et quasi linéaire des surfaces.

- **Rhéologie :** La courbe d'écoulement de la préparation en termes de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement à 20°C est représentée dans la figure (12). A l'examen de cette courbe, on remarque une nette variation de la viscosité en fonction des forces de

cisaillements avec élévation relative de la viscosité à faibles cisaillement avant de se stabiliser à 10^{-3} . Aux alentours de 10^{-1} , une augmentation de la viscosité avant son retour à des valeurs plus faibles forme une bosse vers 10^{-1} . À très fort cisaillement les valeurs de la viscosité diminuent.

La figure (13) montre les courbes d'écoulement de la formulation en termes de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement après 5 minutes de repos à 20°C, à 35°C et à 10°C.

À 20°C on retrouve la même courbe d'écoulement que la précédente, à 35°C la viscosité est constante à très faibles cisaillements, et commence à chuter à partir de 10^{-1} . À 10°C on observe un saut de décade avant d'atteindre la même viscosité que les précédents essais à fort cisaillement.

La viscosité à l'état 0 et celle à l'état infini, nous ont permis d'opter pour un modèle de carreaux.

Les résultats du test de la viscoélasticité sont représentés dans la figure (14).

Les modules G' et G'' restent constants en fonction de la déformation. À de faibles niveaux de cisaillement, G'' est inférieur à G' , jusqu'à ce qu'ils s'intersectent autour d'une contrainte de 100%, où l'on observe un changement de tendance.

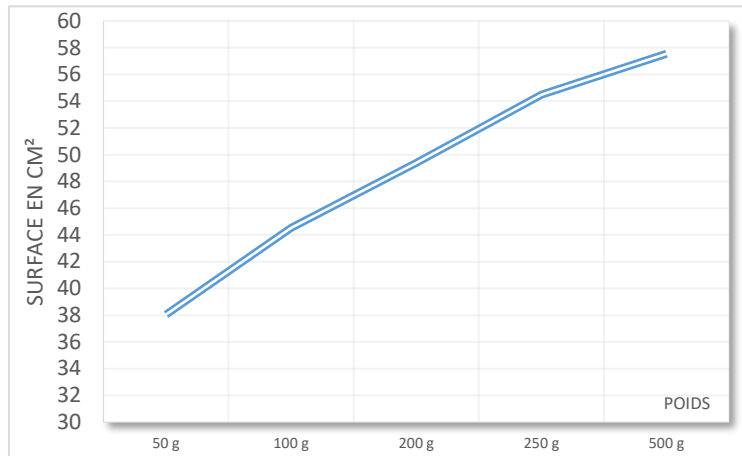


Figure 11 : Courbe représentant l'évolution de la surface d'étalement en fonction des poids

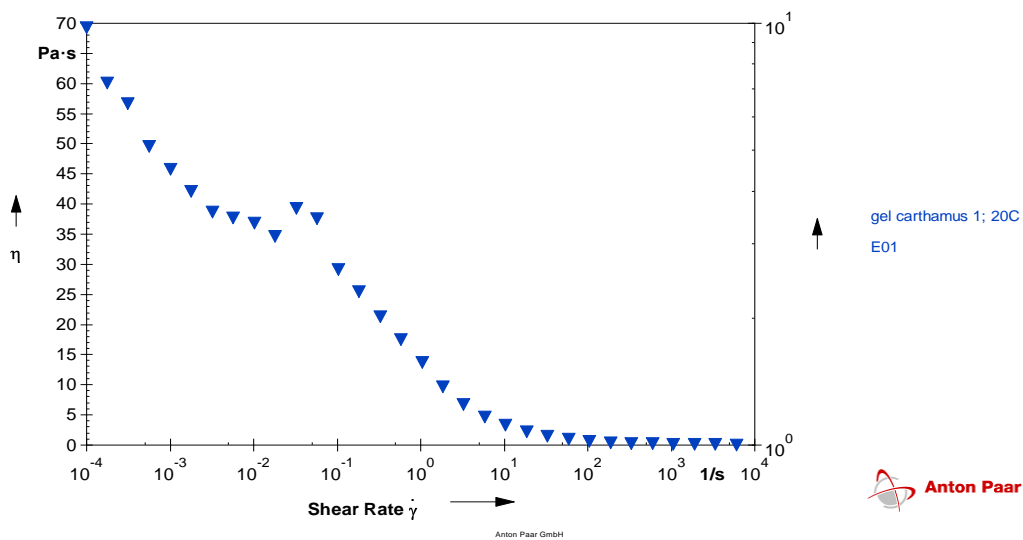


Figure 12 : La courbe d'écoulement de la préparation en termes de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement à 20°

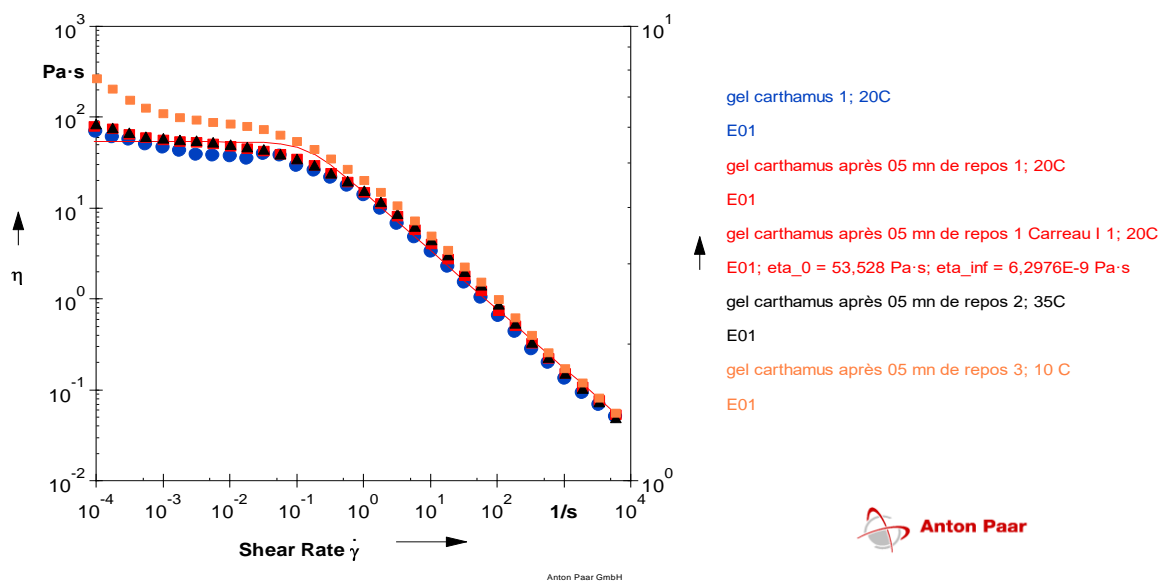


Figure 13 : les courbes d'écoulement de la formulation en termes de viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement à 20°C, à 35°C et à 10°C

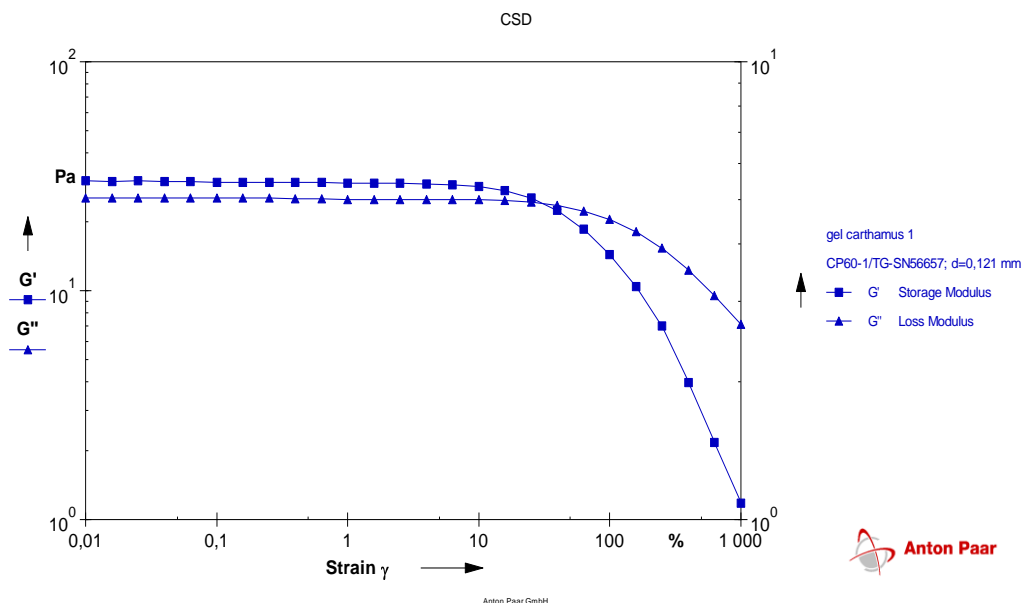


Figure 14 : test de la viscoélasticité

Discussion :

Notre étude révèle une prévalence de l'utilisation de *Carthamus caeruleus* L. dans toutes les tranches d'âge de la région de Boghni. Les individus âgés de 40 à 50 ans représentent 33 % de l'échantillon et accordent une attention particulière au traitement des brûlures, suivi par les plaies. Les participants plus jeunes (20-30 ans) se concentrent davantage sur les traitements de l'acné et de ses cicatrices, en raison de la prévalence de ce problème chez les jeunes (19). Les femmes constituent une majorité significative en ce qui concerne l'utilisation de cette plante, probablement en raison de sa fréquente utilisation à des fins cosmétiques.

Par ailleurs, L'utilisation de la plante *Carthamus caeruleus* L. varie en fonction du niveau d'étude des individus, avec une majorité d'utilisateurs ayant un niveau d'instruction lycéen, probablement lié à la région, au choix des participants et au contexte spécifique de l'enquête.

On remarque également que les individus ayant un niveau d'instruction universitaire respectent scrupuleusement les protocoles de préparation et d'administration, ainsi que les dosages et les précautions d'emploi de notre plante. En revanche, les personnes moins instruites ont tendance à négliger ces aspects importants.

Concernant son usage, la plupart préfèrent utiliser la plante à l'état frais. Ceci peut s'expliquer par la nécessité d'une intervention rapide dans le traitement des lésions cutanées.

De plus, nous avons remarqué que lors de l'utilisation de la plante, il est fréquent de l'associer à un solvant, généralement de l'eau. Ces solvants servent probablement à obtenir une consistance appropriée pour faciliter son application cutanée. Il convient de souligner que l'utilisation optimale d'une plante consisterait à préserver toutes ses propriétés tout en permettant l'extraction et l'assimilation de tous ses principes actifs(20).

Selon les résultats de notre étude, toutes les tranches de la population ont préféré ne pas combiner leurs préparations à d'autres plantes ou médicament, probablement en raison de la sensibilisation aux risques d'interactions d'une part, d'autre part cette approche reflète leur confiance en les propriétés thérapeutiques de la plante et leur volonté de traiter les affections de manière naturelle.

Quant au cas de décès qui nous a été signalé, nous pensons qu'il pourrait être dû à une infection résultant d'un manque de respect des mesures d'asepsie lors de l'extraction de la préparation naturelle.

Enfin, notre enquête ethnobotanique a révélé un fort intérêt et un fort engagement en faveur de l'exploitation potentielle de la plante *Carthamus caeruleus* L. dans le domaine pharmaceutique. Les résultats obtenus s'alignent avec les connaissances scientifiques antérieures sur les plantes médicinales, renforçant ainsi la crédibilité de notre travail. Cette recherche contribue à l'enrichissement des connaissances sur les usages et les propriétés médicinales de la

plante étudiée, et encourage une approche respectueuse et rationnelle de son utilisation, tant du point de vue scientifique que traditionnel.

Les résultats de cette analyse qualitative et quantitative par HPLC confirment la spécificité, la linéarité et la sensibilité de la méthode développée :

Les temps de rétention observés dans notre méthode sont nettement distincts, ce qui témoigne d'une résolution efficace entre les pics. Cela confirme la spécificité de notre approche. Il convient de souligner que des travaux antérieurs réalisés (14) ont rapporté des temps de rétention plus longs que les nôtres. Pour prendre l'exemple de l'acide gallique, notre méthode a enregistré un temps de rétention de 7,21 minutes, tandis que leur méthode a rapporté un temps de rétention de 12,1 minutes. Cette variation peut être expliquée par les conditions chromatographiques utilisées, telles que la composition de la phase mobile, la température, le débit.

Les coefficients de corrélations des deux linéarités A et H sont tous supérieurs à 0,99 pour un large intervalle de concentrations indiquant une bonne linéarité, ce qui signifie que la courbe de calibration est en étroite corrélation avec les concentrations réelles de l'échantillon ;

Concernant la sensibilité de notre méthode analytique qui est évaluée à partir des limites LOD et LOQ qui représente la concentration standard avec un rapport signal/bruit (S/N) de 3,3 tandis que la LOQ a été calculée avec un SNR de 10. Le niveau le plus bas de LOD qui est de 8,20 µg/ml et LOQ qui est de 24,85 µg/ml est obtenu pour l'acide gallique et les valeurs maximales de LOD = 57,53 µg/ml et de LOQ = 174,34 µg/ml obtenus pour la quinoléine. Ces limites sont plus élevées que celles trouvées dans d'autres études (21). La différence de valeurs est attribuable à la sensibilité de l'instrument utilisé. Un instrument plus sensible est capable de détecter des concentrations plus faibles, ce qui se traduit par des LOD et des LOQ plus bas. Dans notre étude, les résultats obtenus restent significativement bas. Cette caractéristique représente un avantage pour l'analyse ultérieure des extraits aqueux de *Carthamus caeruleus* L. dans notre étude.

L'analyse de l'extrait naturel de *Carthamus caeruleus* L. a révélé la présence de 33 pics, parmi lesquels 8 ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention avec ceux des standards polyphénoliques injectés. Des études

ultérieures ont confirmé la présence de ces huit composés polyphénoliques dans

Carthamus caeruleus L., ainsi que d'autres types de polyphénols (2,22), soulignant ainsi la richesse de notre plante en polyphénols.

Lors de l'analyse des deux extraits hydroalcooliques, nous avons remarqué que le chromatogramme de l'extrait éthanolique présente une similarité avec celui de l'extrait naturel, contrairement à l'extrait hydro-méthanolique. Cette observation confirme l'efficacité d'extraction des polyphénols dans l'extrait éthanolique.

La teneur en polyphénols totaux est de 35,23 mg EAG/g d'extrait et 44,87 mg EAG/g d'extrait pour les extractions hydro-méthanolique et hydro-éthanolique respectivement, à partir de 25 g de poudre de rhizomes.

Dahmani (2019) a observé une teneur en polyphénols totaux de 57,91±0,57 mg EAG/g dans 30g de poudre de rhizomes provenant de Boumerdes en utilisant un solvant hydro-méthanolique. Cette teneur est plus élevée que celle obtenue dans notre extrait hydro-méthanolique, malgré la différence de poids de la poudre. En revanche, Boumerfeg (2010) a enregistré une teneur de 12,53±0,67 mg EAG/g dans les rhizomes de *Carthamus caeruleus* L. provenant de la région de Sétif.

Cheriet et al, (2021) ont obtenu une teneur en polyphénols totaux de 53.186 ± 2.123 mg EAG/g avec un extrait hydro-éthanolique pour des rhizomes provenant de Boumerdes.

En effet, le choix de la méthode d'extraction est essentiel pour récupérer l'intégralité des polyphénols tout en préservant leur structure chimique. Ce qui maintiendra les propriétés des composés extraits. En outre, la modification chimique des composés pendant leur extraction peut altérer leur structure, leur activité biologique ou leurs propriétés physico-chimiques. C'est pourquoi, Dai et Mumper (2010) soulignent l'importance de choisir une méthode permettant une extraction complète.

Par ailleurs, il est important d'utiliser un solvant qui assure une extraction optimale. Parmi les solvants couramment utilisés, l'éthanol est largement reconnu comme l'un des meilleurs solvants pour extraire les polyphénols, comme en témoignent les travaux de Cimanga et al. (2018).

Dans notre étude, nous avons également constaté que l'extraction hydro-éthanolique a généré des rendements plus élevés que l'extraction hydro-

méthanolique, ce qui a confirmé l'efficacité de l'éthanol en tant que solvant d'extraction des polyphénols. Ceci peut s'expliquer par la capacité de l'éthanol à dissoudre efficacement les polyphénols des végétaux, facilitant ainsi leur extraction.

Cependant, il convient de citer que d'autres études ont privilégié le méthanol pour l'extraction des antioxydants d'une plante (Złotek et al., 2016). Chaque solvant possède des caractéristiques et affinités spécifiques vis-à-vis des composés ciblés.

C'est pourquoi, nous avons comparé les rendements d'extraction entre le méthanol et l'éthanol. Les résultats ont révélé une concentration polyphénolique supérieure avec l'éthanol.

Ainsi, le choix du solvant se fait en fonction des objectifs de l'étude et des composés recherchés et dépend de la nature des composés ciblés et de leurs solubilités. Les variations de teneur peuvent également être attribuées aux conditions climatiques, le stade de maturité lors de la récolte et les conditions de stockage (Podsędek, 2007). En effet, l'augmentation de la température et l'exposition à des journées plus longues laisseraient accumuler les polyphénols (Cosmulescu et Ion, 2011).

L'étude *in vivo* menée sur un modèle animal lapin a pour objectif d'évaluer l'activité cicatrisante de la plante *Carthamus caeruleus* L. on note cependant, que c'est une étude préliminaire, en raison du nombre réduit d'animaux utilisés (2 lapins par lots).

Le pouvoir cicatrisant du rhizome de cette plante a été déterminé par la mesure de la surface des plaies pendant 24 jours. Ainsi, les taux de cicatrisation obtenus nous ont permis de constater que cette plante possède un pouvoir cicatrisant meilleur comparé à ceux obtenue sur les Témoins négatifs et les lapins ayant reçu un traitement médicamenteux (T+).

La vitesse de cicatrisation calculée dans le groupe ayant été traité avec cette plante est de l'ordre de 1,16 cm²/jour, permettant ainsi une cicatrisation plus rapide comparée à celles déterminées sur les groupes témoins positif (1,1cm²/jour) et négatif (1,15cm²/jour).

Plusieurs travaux ayant été réalisés sur d'autres animaux de laboratoire (rats et lapins) ont rapporté l'efficacité de *Carthamus caeruleus* L. à l'égard des plaies superficielles. Les travaux de Dahmani (2018) menés sur des rats pour tester

l'effet cicatrisant de la pommade issue de la poudre des racines de *Carthamus caeruleus* L. ont montré de meilleurs résultats en termes de qualité de cicatrisation chez le groupe d'animaux traités par l'extrait de cette plante comparé à des plaies traitées avec un médicament de référence, le Madecassol®. Ces mêmes observations ont été également observées dans les travaux de Benhamou et Fazouane (2013), qui ont utilisé la même plante médicinale récoltée à Boumerdes.

Dans une étude portant sur la détermination du potentiel accélérateur de la néoformation des tissus dermiques, Farhat et Belhadi (2016) ont appliqué l'extrait à base de rhizomes de *Carthamus caeruleus* L. sur des plaies superficielles provoquées chez les rats de laboratoire. Les résultats ont montré que le pourcentage de contraction était de 98,33%, beaucoup plus élevé que celui obtenu sur le groupe de rats ayant reçu le Madécassol®.

Par ailleurs, Dans une revue bibliographique détaillée sur les cicatrisants naturels (Marume et al., 2017) présumant que l'effet bénéfique du genre *Carthamus* est lié à la stimulation de la maturation des cicatrices suite à la production de collagène de type I, à la diminution de la réaction inflammatoire et à la production de myofibroblastes (15).

Enfin, l'exposition à des températures très élevées pourrait avoir un impact négatif sur la cicatrisation des plaies. En effet, la chaleur aggraverait l'inflammation et augmenterait le risque d'infections en créant un environnement propice à la prolifération microbienne.

L'Algérie étant un pays où les températures oscillent entre 30 et 45°C 5 mois sur 12, nous avons jugé important de contextualiser les conditions de l'étude. Ce travail a donc été réalisé entre juin et juillet, à des températures dites non optimales, mais qui retracent la réalité du terrain afin d'observer le réel impact de la chaleur sur le pouvoir cicatrisant de la plante *Carthamus caeruleus* L. Nous avons constaté suite à cela, que les lapins traités avec l'extrait de *Carthamus caeruleus* L. n'ont pas été infectés contrairement à ceux traités avec la pommade MEBO et ceux n'ayant reçu aucun traitement. Ceci pourrait être lié à un effet antibactérien potentiellement exploitable, confirmant ainsi les résultats des études antérieures menées par Dahmani et al (2017) et Saffeddine et al. (2013)

qui ont montré une sensibilité accrue de certains germes aux extraits des rhizomes de la plante.

Toutes ces propriétés et caractéristiques nous permettent donc de dire que la plante *Carthamus caeruleus* L. est un remède idéal quant à la qualité et la rapidité de cicatrisation des plaies et pourrait être exploité en médecine comme en cosmétologie.

Concernant la formulation :

Le glycérol est très couramment utilisé dans la formulation des soins pour la peau pour son effet hydratant, mais il est également connu pour la sensation collante qu'il peut laisser en cas d'excès. Ce qui expliquerait l'effet légèrement collant constater lors de l'essais de notre formulation(23).

- Un pH compris entre 3-9 ne cause pas d'irritations et est acceptable pour les préparations à usage topique (24). Cependant, le pH idéale pour la peau doit être préférablement compris entre 4-6 car la peau est recouverte d'un manteau acide qui est un film très fin et protecteur contre tout contaminant nuisible(25)

Notre formulation présente un pH de 5.5, qui selon des essais menés(26) permet de maintenir le film protecteur de la peau.

Il est important de connaître la capacité d'étalement d'une préparation sur la peau, car cela témoigne de la bonne pénétration des principes actifs et donc de l'efficacité du produit. (5) (Naibaho et al 2013) le diamètre des zones d'étalement d'une formulation de référence doit être compris entre 5-7 cm (6) (Sari et al 2015). Ceux de notre formulation oscillent entre 6-8 cm, ce qui est à peine au-dessus des normes et probablement dû à la viscosité du produit comme peuvent en témoigner les études effectuées sur des gels buccaux dentaires (7), et aux différentes conditions de déroulement des tests. Néanmoins, la courbe d'évolution des surfaces en fonction du poids appliqué est presque parfaitement linéaire, cela signifie que l'augmentation de la surface d'étalement (c'est-à-dire la déformation) est directement proportionnelle à la force (poids) appliquée. L'expansion du produit est donc prédictible et pratiquement uniforme en fonction des contraintes imposées.

Selon Sari et al (2015), les préparations à usage dermatiques devraient présenter un temps d'adhérence d'au moins 4 secondes. Dans le cas de notre formulation, le temps d'adhérence moyen est de 8,43s montrant une forte capacité à adhérer à la peau. Une durée d'attachement plus

longue indique une période de pénétration prolongée des principes actifs, et donc une meilleure efficacité(27).

La courbe d'écoulement à 20°C nous a tout de suite paru atypique. En effet, la formation préparée se voulait être un gel, seulement la viscosité d'un gel à faible cisaillement devrait se situer dans les environ de 10000 pas/s (28) Mais celle de notre produit est dans la décade

De 10, soit un rapport de 100.

A très fort cisaillement, les valeurs faibles et la stabilisation de la viscosité démontrent la facilité avec laquelle le produit s'étale sur la peau(29).

Le test est reproduit dans les mêmes conditions et sur le même échantillon 5 minutes plus tard afin d'apprécier la capacité de régénérescence du produit qui s'est avérée être spectaculaire. La courbe d'écoulement est la même que la précédente, le produit s'est donc totalement restructuré.

Les courbes d'écoulement à 20°C, 35°C et 10°C, sont similaires. Le produit est donc thermorésistant.

À 10°C, la viscosité est une décade plus élevée, mais à l'étalement elle reste la même. Ce qui nous laisse suspectés qu'à faible cisaillement, un des polymères composant le produit est thermosensible.

A très faibles cisaillements, le produit présente un comportement newtonien : la viscosité dynamique est indépendante de la contrainte appliquée et de la durée de cisaillement(30).

Aux alentours de 10-1, le comportement est non newtonien rhéofluidifiant : la viscosité diminue quand les forces de cisaillement augmentent. Sous l'effet d'une force, les particules (chaînes de polymères), s'alignent progressivement dans le sens de la contrainte, ce qui favorise leur glissement relatif. Ainsi, on obtient au fur et à mesure la même organisation que les molécules d'H₂O pour l'eau à l'état liquide, alignées et ordonnées(31).

A très fort cisaillement, il y a un point d'inflexion qui suggère la présence d'une deuxième région newtonienne inatteignable à ces forces de cisaillements. La viscosité serait donc constante de l'étalement. Ça nous laisse supposer la présence de tensioactifs dans l'extrait actif, comme les shampoings qui présentent également une zone newtonienne large(32).

Le screening phytochimique de la plante met en évidence des saponines connues pour leurs

propriétés tensioactives (33) et solubles dans de le solvant d'extraction.⁷

Le comportement particulier de cette formulation peut être expliqué par la présence de deux populations (deux systèmes colloïdaux) : l'extrait actif et le carbopol. Ils s'imbriquent l'un dans l'autre tel un modèle de poupée russe.

Ainsi :

A de très faibles cisaillements : première région newtonienne : déstructuration du système qui englobe le second.

A 10-1 : région rhéofluidifiante : stabilisation de la première structure et déstructuration de la seconde.

Une étude réalisée (34) montre une similitude entre la courbe d'écoulement du produit et celle du blanc d'œuf. Ce dernier est rhéofluidifiant, mais retrouve rapidement sa viscosité initiale même après plusieurs cycles de cisaillement.

Cette ressemblance appuie donc l'éventuelle présence de propriétés moussantes et visqueuse exceptionnelles du produit.

La supériorité de G' sur G'' dans un domaine de fréquences, témoigne de la prédominance des propriétés solides dans le comportement du produit, c'est donc un solide visqueux élastique. Cela peut s'expliquer par l'influence positive du carbopol sur le module de rigidité. En effet, les macromolécules des chaînes de carbopol, peuvent s'enchevêtrer pour former un réseau ferme donnant alors des propriétés élastiques au produit(35). Comme le montre l'étude de Romain et al (2013), les gels présentent cette même propriété(36) mais différence entre G' et G'' dans un gel devrait est d'au moins une décade, ce qui n'est pas le cas de notre produit où la différence est minime, mais reste suffisamment significative pour être un solide visqueux élastique dans un domaine de fréquence allant de 0,01 aux environ de 100.

La linéarité de G' et G'' montrent que l'élasticité et la viscosité du produit ne sont pas affectés par les variations de fréquences et restent constantes, jusqu'à environ une fréquence de 100%, où se situe la zone de transition d'écoulement, également appelé le point de gel(37) où G' et G'' ont la même dépendance à la fréquence et à partir de laquelle la formulation entre dans une zone vitreuse où le module de perte domine rapidement donnant ainsi au produit un comportement de liquide visqueux élastique. tandis que les gels classiques se comportent comme des solides visqueux élastiques sur tous les domaines de fréquences.

La formulation obtenue présente donc des propriétés rhéologiques atypiques et très particulières de par sa thermostabilité, son comportement à la fois newtonien et non newtonien en fonction de la fréquences de cisaillement, son élasticité et sa viscosité ainsi que la présence de deux systèmes polymériques lui confèrent propriétés exceptionnels. Il pourrait servir de matrice pour la conduction d'autres matières premières.

Conclusion :

Dans le cadre de notre présent travail, nous avons entrepris une exploration des vertus d'une plante médicinale, *Carthamus caeruleus L.*, aux vues de sa valorisation à travers une caractérisation et une étude de son activité biologique dans le but de développer un produit cosmétique aux vertus cicatrisantes. Cette initiative s'inscrit dans une démarche visant à révéler et redécouvrir l'intérêt thérapeutique inhérent de cette plante, contribuant ainsi à sa reconnaissance en cosmétologie.

Une enquête ethnobotanique a été réalisée pour une meilleure compréhension de son utilisation traditionnelle. Parallèlement, une caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été réalisée, permettant d'identifier certains polyphénols présents. De plus, une évaluation de l'activité cicatrisante a été menée à l'aide d'un protocole in-vivo sur des lapins, révélant une efficacité remarquable de la plante dans l'évolution de la cicatrisation. Enfin, une formulation a été développée pour exploiter pleinement le potentiel de cette plante et remédier à ses problèmes de conservation.

Aux vues de toutes ses qualités démontrées dans cette étude et dans d'autres d'envergure, *Carthamus caeruleus L.*, s'avère être une plante aux vertus exceptionnelles ouvrant de nouvelles perspectives médicales et cosmétologiques, suscitant une réflexion profonde sur son exploitation.

Perspectives :

La formulation mise au point présente des propriétés rhéologiques particulières qui nécessiteraient une étude plus approfondie. Une optimisation de la formulation se fera par la

réalisation de tests de vieillissement accéléré et en temps réel sur plusieurs mois ainsi qu'une analyse par infrarouge. Une étude microbiologique est également nécessaire afin de déterminer le meilleur conservateur à utiliser. Un test de viabilité cellulaire nous renseignera sur la biodisponibilité du produit et enfin une amélioration des caractéristiques organoleptiques.

Références :

1. SAFFIDINE KARIMA, SAHLI Farida, ZERROUG Mohamed Mihoub. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. [Internet]. [Sétif]: Université Ferhat Abbas; 2015 [cité 12 juill 2023]. Disponible sur: <https://tdoctorat.univ-setif.dz/2015/SNV/SAFFIDINE%20KARIMA.pdf>
2. DAHMANI Mohammed Mahdi. Evaluation de l'activité biologique des polyphénols de *Carthamus caeruleus* L (Asteraceae) [Internet]. UNIVERSITE DE M'HAMED BOUGUERA-BOUMERDES; 2019 [cité 13 juill 2023]. Disponible sur: <http://dlibrary.univ-boumerdes.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/5642/1/DAHMANI%20.pdf>
3. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*. 22 déc 2014;6(12):6020-47.
4. Edwin Haslam, Terence H. Lilley, Edward Warminski, Hua Liao, Ya Cai., Russell Martin, Simon H. Gaffney, Paul N. Goulding, and Genevieve Luck. Polyphenol Complexation. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*, 8–50 | 10.1021/bk-1992-0506.ch002. In: *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I* [Internet]. Department of Chemistry, University of Sheffield, Sheffield S3 7HF, United Kingdom; 1992 [cité 13 juill 2023]. Disponible sur: <https://sci-hub.se/10.1021/bk-1992-0506.ch002>
5. Singla RK, Dubey A, Garg A, Sharma R, Fiorino M, Ameen S, et al. Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *J AOAC Int*. 20 mai 2019;102.
6. López-Fernández O, Domínguez R, Pateiro M, Munekata PES, Rocchetti G, Lorenzo JM. Determination of Polyphenols Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Technique (LC–MS/MS): A Review. *Antioxidants*. 2 juin 2020;9(6):479.
7. Guemari F, Laouini SE, Rebiai A, Bouafia A, Tliba A, Barhoum A. UV-Visible Spectroscopic Technique for Prediction of Total Polyphenol Contents for a Bunch of Medicinal Plant Extracts [Internet]. In Review; 2022 févr [cité 19 juill 2023]. Disponible sur: <https://www.researchsquare.com/article/rs-1370198/v1>
8. Sanford MRA. Cicatrisation et plantes utilisées dans la médecine traditionnelle polynésienne. 21 nov 2022;104.
9. Nicole Cotelle BSP. Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Curr Top Med Chem*. 1 déc 2001;1(6):569-90.
10. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*. 2 nov 2018;10(11):1618.
11. Silva FM da, Iorio NLP, Lobo LA, Santos KRN dos, Farah A, Maia LC, et al. Antibacterial Effect of Aqueous Extracts and Bioactive Chemical Compounds of *Coffea canephora* against Microorganisms Involved in Dental Caries and Periodontal Disease. *Adv Microbiol*. 23 oct 2014;04(14):978.
12. Phytovigilance [Internet]. [cité 14 juill 2023]. Disponible sur: https://www.cnpm.org.dz/index.php/d%C3%A9claration/phytovigilance.html?fbclid=IwAR0s5nck8RRm2sEoMDKUpFKANlpX_B7_IRnsu2vO7Hhqs2XPiYrK3jFsc1s
13. RIBEREAU-GAYON P, Sudraud P, Milhé JC, Canbas A. Recherches Technologiques Sur Les Composés Phénoliques Des Vins Rouges. *Conn Vigne Vin*. 20 juin 1970;4:133-44.

14. TH.DVET.FR.2018.36.pdf [Internet]. [cité 19 juill 2023]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tiaret.dz/bitstream/123456789/6215/1/TH.DVE.T.FR.2018.36.pdf>
15. SIFOUR A. Formulation and evaluation of a tea tree oil-based buccal gel for treatment of oral candidiasis. 6 févr 2023 [cité 19 juill 2023]; Disponible sur: <https://zenodo.org/record/7613503>
16. Kassab H, Vartanian L, Jabir S. Development and physical characterization of a periodontal bioadhesive gel of gatifloxacin. *Int J Appl Pharm.* 1 mai 2017;9:31.
17. Sah S, Badola A, Mukhopadhyay S. Development and evaluation of tioconazole loaded emulgel. *Int J Appl Pharm.* 15 sept 2017;9:83.
18. Wuryandari T, Sugihartini N, Kintoko K. Emulgel Formulation of Purified Extract of Moringa (*Moringa oleifera* L.) Leaf. *Folia Medica Indones.* 9 avr 2019;55:17.
19. Tuchayi SM, Makrantonaki E, Ganceviciene R, Dessinioti C, Feldman SR, Zouboulis CC. Acne vulgaris. *Nat Rev Dis Primer.* 17 sept 2015;1(1):15029.
20. Benlamdini N, Elhafian M, Rochdi A, Zidane L. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya). *J Appl Biosci.* 29 juill 2014;78:6771-87.
21. Thiruvengadam M, Praveen N, Yu BR, Kim SH, Chung IM. Polyphenol composition and antioxidant capacity from different extracts of *Aster scaber*. *Acta Biol Hung.* juin 2014;65(2):144-55.
22. CHERIET Anfel : HEZLA Naoua. République Algérienne Démocratique et Populaire [Internet]. Université Echahid Hamma Lakdhar- EL OUED; 2021. Disponible sur: <http://dspace.univ-eloued.dz/bitstream/123456789/12436/1/572.01200.pdf>
23. Braun O, Mallo P, Braun O, Mallo P. (54) THICKENING POLYMER REDUCING THE.
24. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. *Acta Derm Venereol.* mai 2013;93(3):261-7.
25. Schmid-Wendtner MH, Korting HC. PH and Skin Care. ABW Wissenschaftsverlag; 2007. 149 p.
26. Khan B, Naveed A, Khan H, Braga V. Development, characterization and antioxidant activity of polysorbate based O/W emulsion containing polyphenols derived from *Hippophae rhamnoides* and *Cassia fistula*. *Braz J Pharm Sci.* 1 déc 2013;49:763-73.
27. Kumar D, Singh J, Antil M, Kumar V. EMULGEL-NOVEL TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEM–A COMPREHENSIVE REVIEW. 1 janv 2016;7:4733-42.
28. Rodriguez SH. Les propriétés, actions et principales problématiques des gels de Pemulen®TR-2. CeROArt Conserv Expo Restaur D'Objets D'Art [Internet]. 1 déc 2017 [cité 20 juill 2023];(EGG 6). Disponible sur: <https://journals.openedition.org/ceroart/5278#tocto2n9>
29. <https://elearning.univ-msila.dz/moodle/mod/resource/view.php?id=137402> - Recherche Google [Internet]. [cité 20 juill 2023]. Disponible sur: https://www.google.com/search?q=https%3A%2F%2Felearning.univ-msila.dz%2Fmoodle%2Fmod%2Fresource%2Fview.php%3Fid%3D137402&sxsrf=AB5stBh0LwSWNy_VoICucSGdPOs2viqPsA%3A1689883542738&source=hp&ei=lpO5ZOiUK7OnhBIp3oSJkAs&iflsig=AD69kcEAAAAAZLmhp0NkdOZONVdRIrgYcto2pLYCLVg3&ved=0ahUKEwjot5niip6AAxWzU0EAHV5CArIQ4dUDCAg&uact=5&oq=https%3A%2F%2Felearning.univ-msila.dz%2Fmoodle%2Fmod%2Fresource%2Fview.php%3Fid%3D137402&gs_lp=Egdnd3Mtd2l6lkZodHRwczovL2VsZWVybmluZy51bml2LW1zaWxhLmR6L21vb2RsZS9tb2QvcmluZy51bml2VjY2Uvdmlldy5waHA_aWQ9MTM3NDAYSL8DUABYAHAAeACQAQCYAcIBoAHCAa0BAzAuMbgBA8gBAPgBAvgBAQ&scient=gs-wiz

30. ResearchGate [Internet]. [cité 20 juill 2023]. (PDF) Matériaux amorphes : des solides qui coulent de façon collective. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/30514202_Materiaux_amorphes_des_solides_qui_coulent_de_facon_collective
31. Coussot P, Grossiord JL, éditeurs. Comprendre la rhéologie: De la circulation du sang à la prise du béton [Internet]. EDP Sciences; 2002 [cité 20 juill 2023]. Disponible sur: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1051/978-2-7598-0250-0/html>
32. Monteux C. Adsorption et rhéologie interfaciale de complexes polyélectrolytes-tensioactifs.
33. In vivo Anti-inflammatory Activity of Aqueous Extract of *Carthamus caeruleus* L Rhizome Against Carrageenan-Induced Inflammation in Mice. *Jordan J Biol Sci.* 1 sept 2021;14(03):529-35.
34. Escadeillas M, Gauffre F, Gouttefangeas F, Jehan P, Joanny L, Jourdy L, et al. ScanMat, une plateforme d'analyses multi-échelle pour le soutien à l'innovation: exemple de l'étude 'Aquafaba'.
35. AMOURA M, Zeraibi N, Gareche M. Etude comparative de modèles rhéologiques. Application au Carbopol 940. 1 janv 2007;
36. Castellani R. Caractérisation rhéologique et structurale de gels colloïdaux utilisés pour la décontamination nucléaire [Internet] [phdthesis]. Université de Lorraine; 2013 [cité 20 juill 2023]. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750115>
37. Bacha N. Evolution du comportement rhéologique des polymères en présence d'un durcisseur [Internet] [Thesis]. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou; 2013 [cité 20 juill 2023]. Disponible sur: <https://www.ummtto.dz/dspace/handle/ummtto/5894>
38. Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *NATEC.* 30 juin 2013;5(2):35-40
39. Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. 1 janv 2006;
40. Baghiani A, Boumerfeg S, Belkhiri F, Khenouf S, Noureddine C, Harzallah D, et al. Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae.* 1 déc 2010;1:128-36.
41. Dai J, Mumper RJ. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* oct 2010;15(10):7313.
42. K.R. C, LubilaM.Z., B.f M, Tona Lutete G, K.O. K, Vlietinck A. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ARREDOUL JAUNE, A PHYTOMEDICINE BASED ETHANOL EXTRACT FROM FRESH ROOTS OF *PENTADIPLANDRA BRAZZEANA* BAILL. (PENTADIPLANDACEAE) USED AS AN ANTIDIARRHOEAL DRUG IN KISANGANI-DEMOCRATIC REPUBLIC OF CONGO. 21 mars 2018;
43. Złotek U, Mikulska S, Nagajek M, Świeca M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 1 sept 2016;23(5):628-33.