

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT

UNITE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN
SCIENCES DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

CENTER FOR RESEARCH AND
TRAINING IN GRADUATE STUDIES
IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

RESEARCH AND DOCTORATE
TRAINING UNIT IN LIFE SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE VEGETALE ET BIOCHIMIE

LABORATORY OF PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

**Valorisation des coques de cacao par production
d'extraits antioxydants, anti-inflammatoire et
anti-mélanogénèse pour des essais de formulation
de produits cosmétiques.**

Mémoire soumis comme requis partiel en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biochimie

Option : **Phytopharmacie et Agrochimie.**

Par :

AGOUAK SAMBA Roche Carel

Matricule : **18N2265**

Licencié ès-Sciences

Sous la Codirection de :

EFFA ONOMO Pierre

Maitre de conférences

KOUOH ELOMBO

Ferdinand

Chargé de cours



Année académique : 2023-2024

DEDICACE

Ce travail est dédié

A la famille SAMBA.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.

La réalisation de ce mémoire a été rendu possible grâce au soutien de plusieurs personnes auxquelles je tiens à adresser mes remerciements :

- Au **Pr. MOUNDIPA FEWOU Paul**, Chef du Département de Biochimie et Chef du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de la Faculté de Sciences de l'Université de Yaoundé I pour m'avoir accueilli et permis la réalisation de ce travail dans votre laboratoire. Recevez ici professeur, l'expression de ma profonde gratitude ;
- Au **Pr. EFFA ONOMO PIERRE, Dr. KOUOH Ferdinand** mes directeurs de mémoire. Vous m'avez accueilli dans votre équipe de recherche en acceptant d'encadrer mes premiers pas dans ce domaine avec toute rigueur scientifique qui vous ait reconnue. Vos conseils, vos encouragements et vos observations ont été d'une importance motivation capitale dans l'élaboration de ce mémoire. Recevez en ces termes l'expression de ma profonde gratitude ;
- Au **Dr. MANGA**, pour le soutien précieux que vous m'avez apporté dans l'acquisition d'un réactif dont j'avais absolument besoin. Votre aide a été cruciale afin que je puisse mener à bien ma recherche et atteindre mes objectifs. Recevez docteur mes sincères remerciements ;
- A tous **les Enseignants** du département de Biochimie pour la formation académique reçue ;
- A mes aînés de laboratoire, en particulier **ENANG II EDIE, NJINGOU Ibrahim, JIGNOUA Yannick, MAAFO Sandra, MBIDA martin, NGOHOBBA Vigny** pour votre assistance, votre disponibilité, vos multiples conseils, vos encouragements et votre mentorat qui m'ont permis de mener à bien ce travail ;
- A mes camarades et amis, en particulier **TCHOUTCHOUA KINPI Zidane, CHURUPOUO Lesli-Loïc, TCHAMBA TCHANA Jordas, SELE Gertrude Linaress, KENNE Bertanie, TCHOUTANG Maxime, NSANGOUE Merlin, NDZANA Daniel et TCHUENDEM Diane** pour votre assistance durant la réalisation de ce travail qui en quelque sorte est aussi le vôtre ;
- A mes cadets de laboratoire pour leur soutien moral et leur aide sur la paillasse ;

- A ma grande-sœur **KELAM Annie Michelle** pour ton soutien, ton amour et ton encouragement. Ta présence à mes côtés a été précieuse durant les moments difficiles, m'aidant à surmonter chaque obstacle avec conviction. Tu as été ma plus grande alliée tout au long de ma formation académique, la confiance que tu m'as accordée m'a motivée à aller plus loin et à mener à bien ce travail. Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, le respect et la reconnaissance sincère que j'ai envers toi ;
- A mes frères et sœurs **MEKABA Charlène, ANGBE Oriane, BELLA Lolita, TSANGUE Dorline, SAMBA Junior, PIAL Evance**, pour vos encouragements, votre présence et vos précieux conseils ;
- Au couple **KENNE** merci infiniment pour votre soutien multiforme, vos conseils, votre présence vos encouragements ;
- Au couple **BIYEGUE** merci infiniment pour votre soutien multiforme, vos conseils, votre présence vos encouragements ;
- Et enfin, **à toutes les personnes** qui de près ou de loin ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail, recevez mes remerciements les plus sincères.

TABLES DES MATIERES

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLES DES MATIERES.....	iv
LISTES DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTES DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES	x
RESUME	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCTION	1
REVUE DE LA LITTERATURE	5
I. Généralités sur l'anatomie, l'histologie et le fonctionnement de la peau.....	6
I.1. Anatomie et Histologie.....	6
I .1 .1. L'épiderme.....	7
I.1.1.1. Les Kératinocytes.....	7
I .1.1.2- Les Mélanocytes	7
I.1.1.3. Les Cellules de Langerhans	8
I.1.1.4. Les Cellules de Merkel.....	9
I.1.2. Le derme	9
I.1.3. L'hypoderme	10
I.1.4. Annexes cutanées	10
II. Formation couche cornée (cornéocytes)	12
III. Anomalies cutanées inflammatoires dues à l'accumulation de corneocytes : cas de la maladie d'acné.	15
III.1. Physiopathologie de l'acné	15
III.1.1. Rôle de l'hyperkératinisation dans la physiopathologie de l'acné.....	17
III.1.2. L'hyperséborrhée et l'acné.....	18
III.1.2.1. Impact de la composition du sébum	18
III.1.3. Cutibacterium acnes et inflammation	19
IV. Méthodes d'élimination des peaux mortes : exfoliation.....	23
IV.1. Processus naturel d'exfoliation	24
IV.2. Processus d'exfoliation cosmétique	24

IV.2.1. Exfoliation mécanique	24
IV.2.2. Exfoliation chimique.....	26
V. Génération du stress oxydatif au niveau de la peau	27
V.1. UV/lumière visible/rayonnement infrarouge	28
V.2. Pollutions	29
V.3. Impact du stress oxydatif sur la pigmentation cutanée	29
VI. Antioxydants dans la peau.....	30
VI.1. Antioxydants enzymatiques	30
VI.2 Antioxydants non enzymatiques	30
VII.1.1. Position systématique du cacaoyer.....	32
VII.1.2. Diversités morphogéographiques du cacaoyer.....	32
VII-1-3 Travaux antérieures sur les coques de cacao	35
MATERIELS ET METHODES	36
I. Matériel biologique, matériel végétal et préparation des extraits	37
I.1. Matériel biologique animal	37
I.2. Matériel végétal.....	37
I.3. Préparations des extraits.....	37
I.3.1. Préparation des extraits aqueux	37
I.3.2. Préparation de l'extrait éthanolique.....	37
I.3.3. Préparation de l'extrait hydro-éthanolique	37
II. Criblage phytochimique et dosage des composés phenoliques et des flavonoïdes totaux	38
II.1. Criblage phytochimique.....	38
II.1.1. Test des phénols : réaction au FeCl ₃	38
II.1.2. Test des flavonoïdes : réaction au NaOH en milieu acide	38
II.1.3. Test des coumarines : réaction au NaOH	38
II.1.4. Test des tannins : réaction au FeCl ₃	38
II.1.5. Test des anthocyanes: réaction au NH ₃ en milieu acide.....	38
II.1.6. Test des terpénoïdes: réaction de précipitation au HCl	38
II.1.7. Test des saponines : réaction à l'eau distillée.....	39
II.1.8. Mise en évidence des quinones	39
II.2. Dosage des composés phénoliques totaux	39
II.3. Dosage des flavonoïdes.....	40

III. Détermination du potentiel antioxydant des extraits de coques de cacao.....	41
III.1. Evaluation de l'effet des extraits de coques de cacao sur l'inhibition de la peroxydation lipidique	41
III.1.1. Préparation de l'homogénat de foie	41
III.1.2. Induction de la peroxydation lipidique	41
III.2. Evaluation de la capacité antioxydante totale des extraits	43
IV. Détermination du potentiel anti-inflammatoire des extraits de coques de cacao	43
IV.1. Obtention des Macrophages	43
IV.2. Test au bleu trypan	44
IV.3. Mise en incubation des macrophages	45
IV.4. Test de viabilité des macrophages au 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophenyl)-5- phényl-2H-tétrazolium	45
IV.6. Evaluation de l'effet des extraits <i>de</i> coques de cacao et de sur l'activité de la 5-lipoxygénase	47
V. Mésure de l'inhibition de l'activité de la tyrosinase	48
VI. Méthode de sélection des meilleurs extraits	49
VII. Essai de formulation d'un produit exfoliant et d'un savon anti-acné	49
VII-1- Essai de formulation d'un gommage exfoliant.....	49
VII-2- Essai de formulation d'un savon anti-acné.....	49
VIII. Analyse des resultats.....	50
RESULTATS ET DISCUSSION	51
Résultats.....	52
I. Rendements de preparation des extraits	52
II. Criblage phytochimique et dosage des composes phenoliques et des flavonoïdes totaux....	52
II.1. Criblage phytochimique.....	52
II.2. Taux de composés phénoliques totaux et des flavonoïdes des extraits de plante	53
III. Potentiels antioxydants des extraits	53
III.1. Potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique.....	53
III.2. Capacité antioxydante totale.....	54
IV. Potentiel anti-inflammatoire des extraits	54
IV.1. Obtention des macrophages et cytotoxicité des extraits sur la culture.....	54
IV.1.1. Isolement des macrophages	54
IV.1.2. Cytotoxicité des extraits sur la culture primaire des macrophages au MTT	55

IV.1.3. Effet des extraits de plante sur la production de l'oxyde Nitrique par les macrophages	55
IV.1.4. Effet des extraits de plantes sur l'activité de la 5-lipoxygénase de macrophages	56
V.1. Effet des extraits de plantes sur l'activité de la tyrosinase	57
V. Méthode sélection des meilleurs extraits	58
VI. Essai de formulation d'un gommage exfoliant et d'un savon anti-acné.....	59
DISCUSSION.....	60
CONCLUSION ET PERPECTIVES.....	63
CONCLUSION	64
PERPECTIVES	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	66
ANNEXES.....	73

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la structure de la peau (Evon et <i>al.</i> , 2021).....	6
Figure 2 : Voies de biosynthèse de la mélanine (Kim et <i>al.</i> , 2023)	8
Figure 3 : Schéma d'une glande sébacée (à gauche) et du cycle de différenciation des sébocytes (à droite) (Schneider et <i>al.</i> , 2010).	11
Figure 4 : Structure de l'épiderme chez les humains (Matsui & Amagai, 2015).	14
Figure 5 : Les différents types de lésions (Marie, 2021).	16
Figure 6 : Microbiome sain (a) et un microbiome souffrant de dysbiose (b) après colonisation par <i>Cutibacterium acnes</i> (Marie, 2021).	21
Figure 7 : Les principaux processus pathologiques induits par <i>Cutibacterium acnes</i> dans l'acné vulgaire (Mias et <i>al.</i> , 2023).	22
Figure 8 : Cascade de phénomènes inflammatoires au cours de l'acné (Mias et <i>al.</i> , 2023).....	23
Figure 9 : Enzymes antioxydantes dans la peau (Sharma et <i>al.</i> , 2021).	30
Figure 10 : Plante de Cacao (Agouak, 2023)	32
Figure 11: Cabosse de cacao de variété Criollo (Agouak, 2023).	33
Figure 12: Cabosses de cacao de variétés Forastero (Agouak, 2023)	34
Figure 13: Cabosses de cacao de variétés Trinitario (Agouak, 2023).	35
Figure 14 : Cabosse brisée ouverte pour montrer les fèves entourées de pulpe mucilagineuse (Oddoye et <i>al.</i> , 2013).	35
Figure 15: Hématimètre de malassez	45
Figure 16: Photographie des macrophages observés sur une cellule de Malassez.....	55
Figure 17 : Effet des composés sur la viabilité des macrophages	55
Figure 18 : Crème exfoliante et savon anti-acné en cours de formulation.....	59
Figure 19 : Crème exfoliante et savon anti-acné après formulation.	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Etalonnage des polyphénols	39
Tableau 2 : Etalonnage des flavonoïdes	41
Tableau 3 : Rendements d'extraction.....	52
Tableau 4 : Résultats du screening phytochimique.....	52
Tableau 5 : CI_{50} de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique par les extraits de Coques de cacao.....	54
Tableau 6 : CI_{50} du potentiel inhibiteur des différents extraits sur la production du NO	56
Tableau 7 : CI_{50} du potentiel inhibiteur des différents extraits sur l'activité du 5-lipoxygenase.	57
Tableau 8 : CI_{50} du potentiel inhibiteur des différents extraits sur la tyrosinase.	57
Tableau 9 : Calcul des scores.	59

LISTES DES ABREVIATIONS ET ACRONYME

AA	Acide Ascorbique
ATB	Acide Thio Barbiturique
ATC	Acide Trichloracétique
DMEM	Dulbecco modified essential medium.
FA	<i>Forastero</i> Aqueux
FAE	<i>Forastero</i> Hydro-éthanoïque
FE	<i>Forastero</i> éthanoïque
IC50	Concentration Inhibitrice 50
MDA	Malonedialdéhyde
NO	Nitrique Oxide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PG_s	Prostaglandines
SC	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
SODECAO	Société de Développement de Cacao
TA	<i>Trinitario</i> aqueux
TAE	<i>Trinitario</i> hydro-éthanolique
TE	<i>Trinitario</i> ethanolique
TRP-1	Tyrosinase Related Protein-1
TRP-2	Tyrosinase Related Protein-2

RESUME

Les coques de cacao constituent de vastes quantités de déchets dans l'industrie de la cacaoculture. Dans le présent travail, il est question de valoriser ces coques pour l'industrie cosmétiques. Nous avons élaborés divers des procédés extractions par décoction, macération éthanolique et hydro-éthanolique des coques de cacao de variétés *Trinitario* et *Forastero* suivies d'un criblage phytochimique. Ensuite, nous avons évalué le potentiel des extraits sur leur capacité à moduler le stress oxydatif à travers l'inhibition de la peroxydation lipidique et de la mesure de leur capacité antioxydante totale. L'activité anti-inflammatoire a été étudiée à travers l'inhibition de la production de l'oxyde nitrique (NO°) et l'inhibition de la 5-lipoxygénase. Quant à l'activité anti-mélanogénèse, elle a été déterminée en analysant l'inhibition de la tyrosinase. Par la suite, l'extrait le plus actif a été retenu pour un essai de formulation d'une crème exfoliante et d'un savon anti-acné. Il ressort de ce travail que l'extrait obtenu par macération hydro-éthanolique de *Forastero* (FAE) présente les meilleures teneurs en composés phénoliques ($39 \pm 0,16 \text{ mgEq AG/g d'extrait}$) et en flavonoïdes ($14,61 \pm 0,24 \text{ mgEq quercétine/g d'extrait}$). De plus FAE possède une activité antioxydante plus prononcée avec une $\text{CI}_{50} = 6,7 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ pour la peroxydation lipidique comparativement à l'acide ascorbique ($\text{CI}_{50} = 4,4 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$) utilisé comme composé de référence. Pour l'activité anti-inflammatoire, FAE a montré une meilleure activité avec une $\text{CI}_{50} = 4,31 \pm 1,43 \mu\text{g/ml}$ pour l'inhibition de la production du NO° et $\text{CI}_{50} = 0,41 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ pour l'inhibition de la 5-lipoxygénase comparativement au baicalin (CI_{50} respectivement $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ et $0,71 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$). De plus, FAE a significativement inhibée la tyrosinase ($\text{CI}_{50} = 53,85 \pm 7,76 \mu\text{g/ml}$) comparé à l'acide ascorbique ($\text{CI}_{50} = 43,23 \pm 6,46 \mu\text{g/ml}$). Ensuite un calcul de score a été utilisé, l'extrait FAE présente globalement les meilleures activités biologiques recherchées. En définitive, cet extrait à la concentration de $100 \mu\text{g/ml}$ a été sélectionné pour l'essai de formulation d'une crème exfoliante et d'un savon anti-acné, produits actuellement soumis à des tests d'efficacité. Ces résultats permettent de valoriser les coques de cacao en produisant des ingrédients actifs pour la dermocosmétique en remplacement de certains produits synthétiques. A cet effet il y'a création d'une nouvelle source de revenus pour les cacaoculteurs et une solution de gestion durable des déchets de ce secteur d'activité.

Mots clés : valorisation des coques de cacao ; stress oxydatif ; exfoliant ; anti-acné ; antioxydant ; anti-inflammatoire ; anti-tyrosinase, produits cosmétiques.

ABSTRACT

Cocoa shells generate vast amounts of waste in the cocoa industry. This study focuses on valorizing these husks for the cosmetics industry. We developed various extraction processes through decoction, ethanolic maceration, and hydro-ethanolic maceration of cocoa husks from Trinitario and Forastero varieties, followed by a phytochemical screening. Subsequently, we evaluated the potential of the extracts to modulate oxidative stress by assessing lipid peroxidation inhibition and measuring their total antioxidant capacity. The anti-inflammatory activity was studied by examining the inhibition of nitric oxide (NO^o) production and the inhibition of 5-lipoxygenase. Regarding anti-melanogenesis activity, it was determined by analyzing tyrosinase inhibition. The most active extract was then selected for the formulation testing of an exfoliating cream and an anti-acne soap. The results indicate that the extract obtained through hydro-ethanolic maceration of Forastero (FAE) exhibits the highest levels of phenolic compounds (39 ± 0.16 mgEq AG/g of extract) and flavonoids (14.61 ± 0.24 mgEq quercetin/g of extract). Furthermore, FAE demonstrates a more pronounced antioxidant activity with an IC₅₀ of 6.7 ± 0.07 µg/ml for lipid peroxidation inhibition compared to ascorbic acid (IC₅₀= 4.4 ± 0.09 µg/ml), which was used as a reference compound. For anti-inflammatory activity, FAE showed superior effects with an IC₅₀ of 4.31 ± 1.43 µg/ml for NO^o production inhibition and an IC₅₀ of 0.41 ± 0.02 µg/ml for 5-lipoxygenase inhibition, in comparison to baicalin (IC₅₀ values of 0.12 ± 0.02 µg/ml and 0.71 ± 0.15 µg/ml, respectively). Additionally, FAE significantly inhibited tyrosinase (IC₅₀= 53.85 ± 7.76 µg/ml) compared to ascorbic acid (IC₅₀= 43.23 ± 6.46 µg/ml). A scoring calculation was subsequently employed, revealing that the FAE extract generally exhibited the best biological activities sought after in this study. Ultimately, this extract at a concentration of 100 µg/ml was selected for the formulation testing of an exfoliating cream and an anti-acne soap, which are currently undergoing efficacy tests. These findings contribute to the valorization of cocoa husks by producing active ingredients for dermocosmetics as a replacement for certain synthetic products. This approach not only creates a new source of income for cocoa farmers but also offers a sustainable waste management solution within this sector.

Keywords: cocoa boost; oxidative stress; exfoliant; anti-acne; antioxidant; anti-inflammatory; anti-tyrosinase, cosmetics products.

INTRODUCTION

La peau, large organe enveloppant l'organisme est constitué de trois couches superposées : l'épiderme (la plus externe, protectrice et régulatrice) ; le derme (tissu intermédiaire) et l'hypoderme (tissu de réserve le plus profond) (**Evon et al., 2021**). Cet organe joue plusieurs rôles : de régulation thermique, de respiration et participe à la synthèse de la vitamine D (**Bassaguet et al., 2022**).

Malheureusement, comme tout autre organe la peau est constamment exposée à diverses agressions externes causées par les micro-organismes, une exposition chronique aux rayons UV, la pollution, les produits chimiques, des toxines et du tabac (**Manupriya et al., 2020**). En contact avec l'épiderme, ces agents induisent : la surproduction des espèces réactives d'oxygènes ; l'activation des enzymes tyrosinase (EC 1.14.18.1) (enzymes clés de la biosynthèse de la mélanine), 5-lipoxygénase (EC 1.13.11.34) et oxyde nitrique synthétase (EC 1.14.13.39) (enzymes pro-inflammatoires) ; la destruction des cellules de langerhans et une prolifération anormale des cellules de la peau telles que les mélanocytes et les kératinocytes qui se différencient en corneocytes (cellules mortes). Ceci a pour conséquence : la survenue du stress oxydatif, l'inflammation et répartition anormale de la mélanine dans les mélanocytes tout au long de la surface du corps ; l'accumulation des peaux mortes (**Julie et al., 2020 et Sarr et al., 2015**). Ainsi se développent au niveau de la peau une surproduction des cellules mortes au niveau de la couche cornée de l'épiderme qui sont responsables de l'obstruction des pores entraînant des lésions rétentionnelles : les comédons ouverts (points noirs) et les comédons fermés (microkystes). Ceux-ci peuvent s'enflammer et ainsi donner des lésions inflammatoires telles que des papules, pustules et/ou nodules (survenu de l'acné). Par la suite, si aucun traitement n'est entrepris des cicatrices vont se former dans certains cas. Ces cicatrices peuvent être sévères et marquantes entraînant un retentissement esthétique ainsi qu'une détresse émotionnelle importante. De plus cette accumulation de peaux mortes cause également une sécheresse cutanée, donne un aspect terne et rugueux (**Elias, 2018**). Ces désordres cutanés causés par l'accumulation de peaux mortes et dont la conséquence la plus prononcée est l'acné restent encore de nos jours un problème de santé publique particulièrement en Afrique subsaharienne car ils affectent 30 % des jeunes (**Kourouma et al., 2016**) et devient des préoccupations esthétiques pour de nombreuses personnes (**Omar et al., 2021**). Cependant, les produits cosmétiques utilisés et disponibles sur le marché présentent des problèmes de sécurité controversés et douteux pour les utilisateurs à cause de l'incorporation des substances chimiques nocives tels que le polyéthylène glycol, alpha et bêta-hydroxyacides, parabènes et

dioxanes. De ce fait, ces substances ont de nombreux effets néfastes sur la peau et la santé : irritation cutanée, perturbation du système endocrinien et toxicité pour l'organisme. C'est au regard de tout cela que l'OMS a établi une stratégie visant à valoriser l'utilisation des plantes (OMS, 2014).

Les coques de cacao sont des sous-produits de l'industrie cacaoyère. La coque de cacao représente 70% de la masse d'une cabosse de cacao (fèves, pulpe, coque) (Oddoye et al., 2013). En 2023, la production mondiale de cabosse de cacao était de 4,45 millions de tonnes dont 1,335 millions de tonnes de fèves qui sont utilisées pour la fabrication du chocolat et 3,115 millions de tonnes qui sont négligées et abandonnées dans la nature. Ces coques de cacao abandonnées créent ainsi des problèmes de surproduction et gestion des déchets (risque écologique), des risques de contamination des autres plants de cacao car les coques de cacao abandonnées sont des incubateurs de la pourriture brune, des risques de contamination des eaux et un manque à gagner pour les cacaoculteurs. Dans le but de limiter et valoriser ces déchets afin d'apporter une valeur ajoutée à ce secteur d'activité plusieurs travaux ont été menés. Les coques de cacao ont été utilisées pour la fabrication de charbon actif et pour la production d'engrais (Fisal, 2005). Très peu de travaux ont été effectués sur les coques de cacao mais il a été prouvé qu'elles sont riches en composés bioactifs tels que polyphénols et flavonoïdes (Karim et al., 2014). Les propriétés antioxydantes des coques de cacao ont été démontrées en utilisant un extrait organique (mélange méthanol/acide 70% (v/v)) (Karim et al., 2014). Cependant ces solvants organiques étant redoutés pour leur toxicité, les solvants comme l'eau et l'éthanol sont un atout majeur pour les recherches actuelles (Carré, 2021). A notre connaissance, les extraits aqueux, éthanolique et hydroéthanolique des coques de cacao n'ont pas encore fait l'objet d'une investigation. De même les propriétés anti-inflammatoires, anti-mélanogénèse des coques de cacao et leur utilisation comme ingrédient en cosmétique n'ont pas encore été évaluées. Ainsi, notre étude se propose d'évaluer les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-mélanogénèse des extraits de coques de cacao. En intégrant ces extraits dans une formulation d'exfoliant et d'un savon anti-acné, nous visons non seulement à valoriser un déchet agricole, mais également à offrir une solution potentiellement efficace pour améliorer la santé cutanée. Ce mémoire s'inscrit donc dans une démarche innovante qui allie durabilité environnementale et bien-être dermatologique.

Hypothèses de recherches

Les extraits de coques de cacao possèdent des activités antioxydantes, anti-inflammatoire ou anti-mélanogénèse exploitable pour des formulations cosmétiques.

Objectif générale

Rechercher l'extrait de coques de cacao possédant la meilleure activité antioxydante, anti-inflammatoire ou anti-mélanogénèse pour un essai de formulation d'un produit exfoliant.

Objectifs spécifiques

- Caractériser phytochimiquement les extraits de coques de cacao de variétés *Trinitario* et *Forastero* ;
- Sélectionner l'extrait de coques de cacao ayant un fort potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-tyrosinase ;
- Formuler un crème exfoliante et un savon anti-acné.

REVUE DE LA LITTERATURE

I. Généralités sur l'anatomie, l'histologie et le fonctionnement de la peau

I.1. Anatomie et histologie

La peau est un organe complexe qui comprend plusieurs compartiments aux fonctions différentes. C'est le plus grand organe couvrant le corps humain, avec une surface d'environ 1,5 à 2 m², et est en contact direct avec l'environnement extérieur.

La peau est composée de trois couches, à savoir l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 1**). L'épiderme est la couche la plus externe qui a une fonction protectrice pour empêcher la pénétration d'agents pathogènes et réguler la perte d'eau du corps. Le derme contient un réseau de matrice extracellulaire dense qui fournit à la peau une résistance mécanique et un recul élastique, et la graisse sous-cutanée dans l'hypoderme fournit une isolation. A ces couches s'ajoutent les annexes cutanées tels que les glandes cutanées (les follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) et les phanères (les cheveux, ongles et poils) (**Evon et al., 2021**).

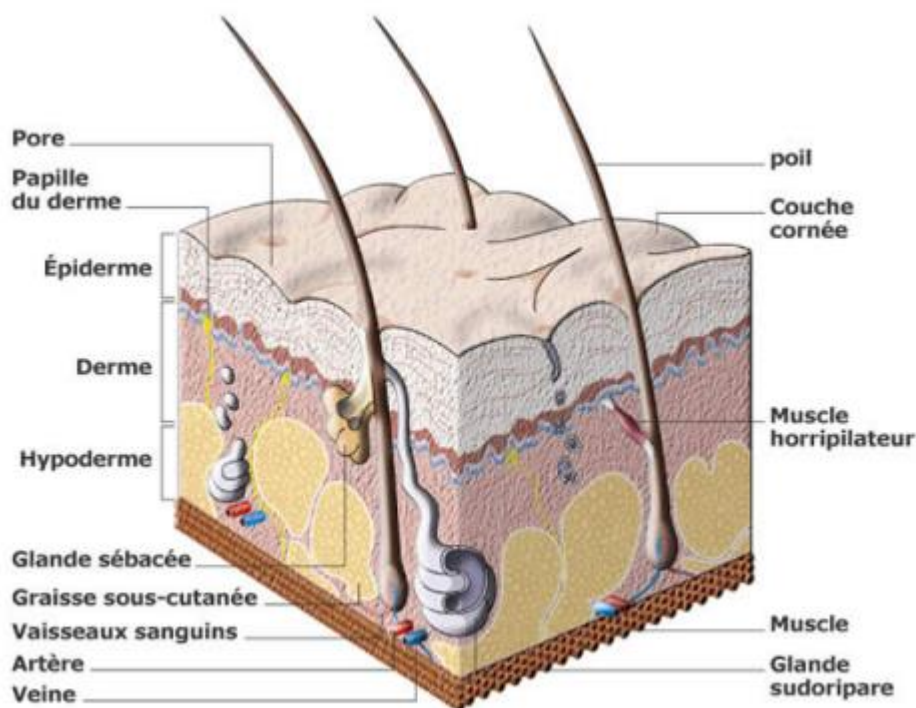


Figure 1 : Schéma de la structure de la peau (Evon et al., 2021).

I.1.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de revêtement stratifié car constitué de plusieurs assises cellulaires appelées couches ou **stratum** ; pavimenteux car les cellules de la couche superficielle sont plates ; kératinisé car les cellules épidermiques expriment une protéine spécifique, la kératine, qui est un composant du cytosquelette (les filaments de kératine sont appelés tonofilaments) ; squameux car il possède à sa surface des petites lamelles de peau mortes, les squames, qui s'en détachent (**Evon et al., 2020**). L'épiderme a pour principal rôle de n'est pas vascularisé ; les nutriments nécessaires à son fonctionnement proviennent du derme. En revanche, il est parcouru par de fines terminaisons nerveuses libres amyéliniques impliquées dans la thermoception et la protéger l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures. Comme tous les épithéliums, il détecte des stimuli douloureux (nociception). Quatre types cellulaires sont présents dans les différentes couches de l'épiderme : les kératinocytes, les mastocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merckels (**Evon et al., 2021**).

I.1.1.1. Les Kératinocytes

Les kératinocytes sont d'origine ectoblastique. L'ectoblaste est le feuillet le plus externe chez l'embryon au stade gastrula qui, au cours du développement, se différencie en organes tels que la peau, les phanères (poils et ongles), les glandes cutanées, mais aussi le système nerveux et les organes sensoriels. Les kératinocytes se répartissent dans les 4 couches composant l'épiderme : la couche basale (stratum basale), la couche épineuse (stratum spinosum), la couche granuleuse (stratum granulosum) et la couche cornée (stratum corneum) (**Hirobe, 2014**).

Les kératinocytes sont en perpétuel renouvellement. Ce processus de renouvellement se déroule à travers les différentes couches de l'épiderme, de la couche basale à la couche cornée entre 4 à 6 semaines. Au niveau de la couche basale, chaque kératinocyte se multiplie par mitose. Un kératinocyte donne naissance à deux cellules filles identiques : l'une reste dans la couche basale pour se diviser à nouveau tandis que l'autre migre vers les couches superficielles de l'épiderme en se différenciant (**Tobin, 2017**). Au cours de cette migration, les kératinocytes synthétisent la kératine qui assure à la peau son imperméabilité (**Bassaguet et al., 2022**).

I.1.1.2- Les Mélanocytes

Les mélanocytes constituent, par leur nombre, la deuxième population cellulaire de l'épiderme (**Kim et al., 2023**). Leur fonction est la synthèse des mélanines : eumélanine et la

phéomélanine (**Figure 2**). Cette biosynthèse s'effectue en permanence mais fortement stimulée par les rayonnements UV, le stress oxydatif... La L-tyrosine, acide aminé soufré, est capturée par les mélanocytes dans le sang circulant et est incorporée dans le mélanosome. Par la suite, la tyrosinase (enzyme limitante de la mélanogénèse) catalyse des réactions chimiques qui conduisent à la formation d'eumélanine contrôlée par les enzymes *tyrosinase related protein 1* (TRP-1) et la dopachrome tautomerase (TRP-2) et de phéomélanine en présence d'une grande quantité de cystéine ou de glutathion pigments brun-noirs et jaune-rouges respectivement et ont un rôle photo protecteur (**Tobin, 2017 ; Bassaguet et al., 2022**).

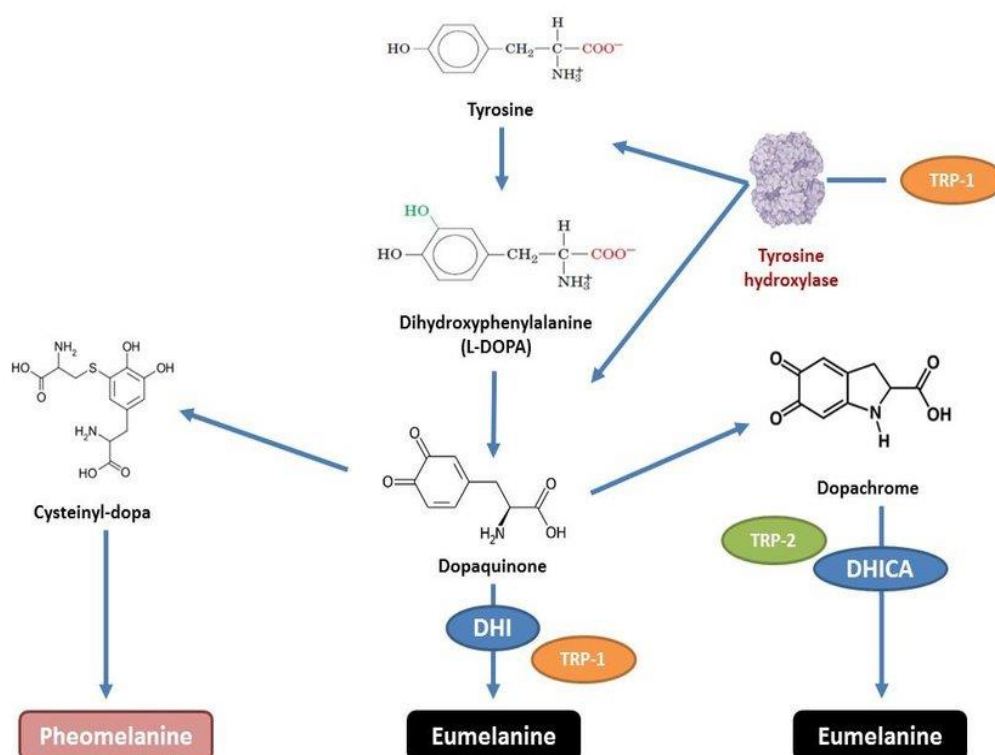


Figure 2 : Voies de biosynthèse de la mélanine (Kim et al., 2023)

I.1.1.3. Les Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans dérivent des cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse et sont présentes dans tous les épithéliums pavimenteux stratifiés des mammifères où elles jouent un rôle dans les réactions immunitaires. Ces cellules appartiennent au groupe des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T trans-épithéliales. Elles sont produites au niveau des organes hématopoïétiques puis migrent vers l'épiderme où elles capturent les corps étrangers tels que les exo antigènes (virus, bactéries,

allergènes...). Après les avoir capturés grâce à la voie des endosomes, elles les apprêtent et les réexpriment en surface avec les molécules de classe II du CMH. Les cellules de Langerhans migrent ensuite à travers l'épiderme et le derme vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T CD4+ qui jouent un rôle essentiel dans l'initiation et l'amplification d'une réponse immune et adaptative (Khavkin et Ellis, 2011).

I.1.1.4. Les Cellules de Merkel

Originaires des crêtes neurales, ces cellules constituent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Elles sont relativement plus abondantes au niveau des lèvres, des paumes et des pieds. Ce sont des cellules neuro-épithéliales dérivant des cellules souches de l'épidermes fœtal. Elles sont localisées entre les kératinocytes dans la couche basale au contact d'une terminaison nerveuse libre. Leur rôle est mal connu mais elles pourraient avoir un rôle de mécanorécepteurs sensoriels. Ces mécanorécepteurs sont en relation avec des terminaisons nerveuses libres. Ils enregistrent les moindres vibrations à l'intérieur de l'épiderme et les transmettent à ces terminaisons nerveuses pour en informer le cerveau (Bassaguet et al., 2022).

I.1.2. Le derme

Le derme, 10 à 40 fois plus épais que l'épiderme. A la différence de l'épiderme, il est vascularisé, ce qui lui permet non seulement d'apporter l'énergie, mais aussi les nutriments à l'épiderme. Fortement irrigué de sang, le derme joue un rôle essentiel dans la défense et le soutien de la peau, dans l'irrigation et dans la cicatrisation (Laverdet et al., 2018). Sur le plan architectural, le derme est constitué de deux zones : l'une superficielle appelée « derme papillaire » et l'autre profonde dénommée « derme réticulaire » (Khavkin et Ellis, 2011).

Le derme papillaire, en superficie, est composé de mastocytes et de fibroblaste responsables de la synthèse de nombreuses fibres constituées d'élastine et de fibres de collagènes, fines, isolées et orientées le plus souvent perpendiculaire à la peau (Tobin, 2017).

Le derme profond, dit derme réticulaire, occupe environ 80% du derme. Il est composé de tissu conjonctif dense. Contrairement au derme papillaire, les fibres d'élastine et de collagène sont disposées de façon multidirectionnelle. Ces fibres sont enchevêtrées dans des plans grossièrement parallèles à la surface cutanée. La fonction principale du collagène dermique est de donner à la peau une résistance à la traction et une extensibilité en maintenant son intégrité structurale. Le derme réticulaire englobe les glandes sudoripares et contient les

follicules pilo-sébacés (racines des poils) sur lesquelles s'attachent les muscles arrecteurs (Tobin, 2017).

I.1.3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau qui se situe sous le derme encore appelé tissu sous-cutané et relie la peau aux organes sous-jacents en protégeant l'organisme des variations thermiques et des chocs mécaniques. Il est constitué d'un tissu conjonctif très lâche dans lequel se trouvent de nombreuses cellules adipeuses (adipocytes) qui stockent une grande quantité de lipides. La graisse contenue dans les adipocytes peut être mobilisée sous forme d'énergie en cas d'effort intense ou prolongé ou de jeûne. Cette graisse participe aussi à la régulation thermique en jouant un rôle d'isolant passif et réduisant ainsi les échanges de température avec l'extérieur (Bassaguet et al., 2022)

I.1.4. Annexes cutanées

Les annexes cutanées regroupent les glandes cutanées (les follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) et les phanères (ongles, poils et cheveux) toutes d'origine épidermique mais situées dans le derme et l'hypoderme (Tobin, 2017). Cette position est très importante car elles constituent une source de cellules profondément ancrées dans la peau capable de régénérer l'épiderme lorsque ce dernier a été détruit ou abîmé par une lésion.

a) Follicule pileux et poil

Le follicule pileux est divisé en deux régions : une partie supérieure permanente, composée de l'infundibulum et de l'isthme et une région inférieure variable, composée du renflement et du bulbe qui contient la matrice capillaire, les cellules épithéliales différenciées et les cellules de la papille dermique, permettant la production du poil (Tobin, 2017).

b) Glande sébacée

➤ Histologie / Localisation

Les glandes sébacées sont des glandes exocrines que l'on retrouve sur l'intégralité de la peau, à l'exception des paumes de mains et des plantes de pied. Elles sont généralement associées à un follicule pileux pour former l'unité pilo-sébacée (Schneider et al., 2010). Ce sont des structures unilobulaires ou multilobulaires constituées d'acini (cavité épithéliale arrondie, bordée par des cellules sécrétrices qui débouche dans le canal excréteur d'une glande). Les glandes sébacées sont composées de sébocytes et de kératinocytes recouvrant les canaux

sébacés (**Figure 3**). Leur fonction principale consiste à sécréter le sébum : une substance lipidique complexe décrite ci-après.

➤ Sébocytes

Les sébocytes sont des cellules épithéliales majoritairement présentes dans la glande sébacée. Leur fonction primaire consiste à synthétiser et sécréter le sébum. Cela s'effectue via la différenciation et la désintégration de sébocytes matures. C'est une sécrétion dite holocrine car la libération du contenu se produit via la rupture totale de la membrane cellulaire. La différenciation sébocytaire se déroule en plusieurs étapes à l'intérieur de la glande sébacée (**Schneider et al., 2010**). Les cellules situées en zone périphérique de la glande sébacée sont non différenciées et prolifératives, elles sont issues des cellules souches sébocytaires. Elles arrêtent ensuite de se diviser et migrent vers le centre de la glande sébacée (zone de maturation) où elles augmenteront de volume en accumulant des gouttelettes lipidiques et continueront de synthétiser le sébum. Une fois arrivé à maturité, elles libèrent leur contenu de manière holocrine, qui sera ensuite déversé dans le canal excréteur avant d'être dirigé à la surface de la peau via le canal folliculaire (**Schneider et al., 2010**) (**Figure 3**)

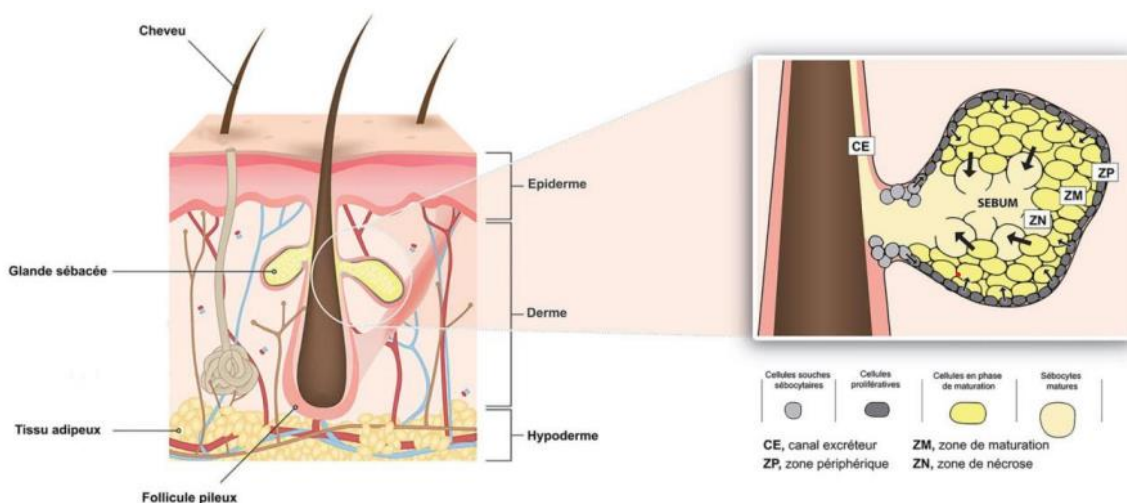


Figure 3 : Schéma d'une glande sébacée (à gauche) et du cycle de différenciation des sébocytes (à droite) (Schneider et al., 2010).

➤ Sébum

Le sébum humain est un mélange complexe de lipides : il est majoritairement constitué de triglycérides et d'acides gras libres (57,5%) ainsi que d'esters de cire (26%) et de squalène (12%) qui sont deux lipides spécifiques du sébum. Enfin le cholestérol avec ses esters sont les lipides les moins abondants (4,5%). Le sébum possède de nombreuses fonctions protectrices telles que la lubrification, l'imperméabilité et la protection de la peau contre les frictions. Certains peptides exprimés dans la glande sébacée comme la cathelicidine possèdent une activité anti-microbienne et peuvent déclencher la production de cytokines pro-inflammatoire contre *Propionibacterium acnes*, une bactérie impliquée dans la pathologie de l'acné (Schneider et al., 2010).

c) Glande sudoripare

Les glandes sudoripares jouent un rôle important dans la régulation de la température corporelle. Il en existe 3 types différents : eccrine, apocrine et apoeccrine.

d) Ongle

L'ongle tout comme les poils est constitué de kératine renouvelée en permanence. L'ongle peut être délimité en 4 zones distinctes : la matrice qui correspond à la zone de croissance de l'ongle, le lit correspondant à la couche cellulaire interne épaisse et élastique sur laquelle repose, la plaque constituée de cornéocytes plats et disposés de manière dense et l'hyponychium se situant sous l'extrémité de l'ongle (Schneider et al., 2010).

II. Formation couche cornée (cornéocytes)

La couche superficielle de la peau, nommée épiderme est un épithélium squameux stratifié en renouvellement constant (**Figure 4**). L'épiderme est très innervé mais n'est pas vascularisé. Il est composé de cellules de Langerhans, de mélanocytes, de cellules de Merkel et enfin de kératinocytes qui y sont les cellules majoritaires, représentant entre 90 et 95% des cellules épidermiques (**Bouwstra et al., 2023**). Son rôle est de créer une couche protectrice et semi-perméable dans le but de maintenir la peau hydratée, cette couche est appelée la couche cornée (stratum corneum).

La couche cornée est composée de cornéocytes qui sont des cellules de forme polyédrique plate, dites « mortes » mais encore actives du point de vue biochimique. En effet, les cornéocytes sont des kératinocytes ayant atteint leur niveau final de différenciation. Ils

permettent un renforcement mécanique, protègent des ultraviolets les cellules de la couche inférieure, maintiennent l'hydratation et enfin régulent l'inflammation médiée par les cytokines **(Bouwstra et al., 2023)**.

La couche cornée est la couche la plus externe de l'épiderme, elle est en contact avec le monde extérieur.

Les autres couches qui composent l'épiderme sont les suivantes **(Figure 4)** :

- La couche basale (couche germinative, stratum basal), qui ne contient qu'une seule couche cellulaire. Cette couche est composée de différents types de cellules : des cellules prismatiques ainsi que des cellules cubiques. Celles-ci sont attachées à la membrane basale par des hémidesmosomes. C'est au sein de la couche basale que sont produits les kératinocytes que l'on pourra retrouver dans les couches superficielles.
- La couche épineuse ou stratum spinosum se caractérise par plusieurs couches cellulaires, généralement entre 5 à 15. On y retrouve des cellules de forme polygonale dans les couches inférieures et de forme plus aplaties dans les couches supérieures, elles sont reliées entre elles par les desmosomes.
- La couche granuleuse ou stratum granulosum se compose de 1 à 3 couches de cellules. On y retrouve des granules lamellaires et des grains de kératohyalines qui sont stockés dans des cellules granuleuses de forme aplatie.
- La stratum lucidum, composé d'une seule couche de cellules translucides, n'est présent que dans les épidermes épais **(Matsui et Amagai, 2015)**.

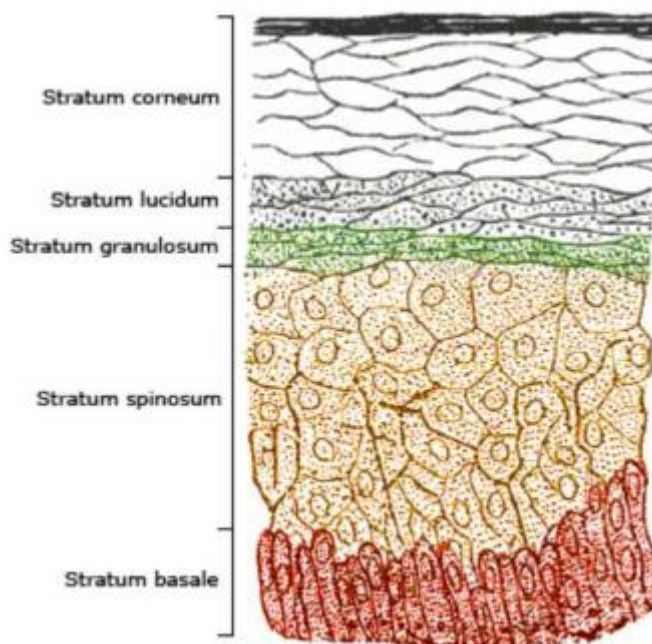


Figure 4 : Structure de l'épiderme chez les humains (Matsui & Amagai, 2015).

La kératinisation est un processus de différenciation terminal. En effet l'épiderme, comme dit précédemment, est sujet à un renouvellement constant avec ses cellules souches de la couche basale ayant un fort taux de prolifération. Ces cellules souches peuvent créer des cellules filles et des cellules à amplification transitoire. Lors de la kératinisation, les cellules à amplification transitoire migrent vers les couches plus superficielles de la peau et se différencient pour devenir des cornéocytes, elles perdent leur potentiel de prolifération et quittent le cycle cellulaire sans pour autant mourir. Les kératinocytes, en changeant de couche, produisent un marqueur de différenciation ; l'involucrine, ils produisent également des granules lamellaires dans les couches supérieures (Évora et al., 2021).

Au niveau de la jonction entre la couche cornée et la couche granuleuse, il y a une fusion de la membrane plasmique avec les corps lamellaires, ce qui entraîne une arrivée de lipides dans les espaces intercornéocytaires. Ces lipides sont contenus dans les corps lamellaires et sont des lipides polaires comme le cholestérol, des phospholipides ou bien encore des glycosylcéramides. Ils présentent une structure de forme discoïdale qui après avoir fusionnés ensemble, vont former à la surface des cornéocytes d'amples lamelles ayant un rôle dans la protection de l'épiderme. Dans l'espace intercornéocyttaire, ces lipides polaires vont être pris en charge par des enzymes qui vont les transformer en acides gras libres, cholestérols ou encore

céramides. La libération des cornéocytes est appelée desquamation, elle est due à la destruction des attaches intercornéocytaires par des enzymes comme la « Stratum Corneum Tryptic Enzyme » (SCTE) de la famille des trypsines et la « Stratum Corneum Chemotryptic Enzyme » (SCCE) (Matsui et Amagai, 2015).. L'accumulation des cornéocytes s'accompagne d'accumulation de mélanocytes responsable de la synthèse de la mélanine, rendant la peau plus terne et moins lumineuse. La production des cornéocytes devient excessive lorsque la peau fait face à de nombreuses attaques telles que les polluants, les UV..... responsable du stress et de l'inflammation au niveau de cet organe.

III. Anomalies cutanées inflammatoires dues à l'accumulation de cornéocytes : cas de la maladie d'acné.

III.1. Physiopathologie de l'acné

L'acné, ou *Acne Vulgaris*, est une maladie cutanée. En France, en 2021, 72% des adolescent(e)s entre 11 et 18 ans souffraient d'acné (Marie, 2021). L'acné est la première cause de consultation chez un dermatologue, en effet, elle touche environ 15 millions de français(es) (Marie, 2021). Au Cameroun la prévalence de l'acné est de 7,7% (Kouotou et al., 2016).

L'acné est une maladie inflammatoire chronique touchant le follicule pilo-sébacé, débutant généralement à l'adolescence. Le diagnostic clinique de l'acné se pose lors de l'observation à l'examen clinique de lésions rétentionnelles (non inflammatoires) ou inflammatoires (Marie, 2021).

Les lésions rétentionnelles correspondent à des comédons ouverts et/ou des microkystes (comédons fermés) (Marie, 2021).

Les comédons fermés ou microkystes ne sont pas visibles, contrairement aux comédons ouverts, ils ont un diamètre compris entre 2 et 3 mm, ils peuvent présenter une couleur chair ou être moins pigmenté que la peau saine. Le canal folliculaire est dilaté par l'accumulation de la kératine et du sébum qui s'y accumulent, celui-ci restant fermé car recouvert de cellules de l'épiderme. Bien que causant une dilatation du canal folliculaire, les microkystes ne sont pas visibles sans procéder à un étirement de la peau qui les révèle (Marie, 2021).

Les comédons ouverts, que l'on appelle également « points noirs » sont visibles à cause de l'oxydation des kératinocytes présents dans le sébum qui s'accumulent dans le canal

infundibulaire, causant la dilatation de celui-ci. Le diamètre des comédons ouvert varie entre 1 et 3mm (Marie, 2021).

Les lésions rétentionnelles peuvent devenir inflammatoires tout comme elles peuvent rester stables. À ces lésions, peuvent s'ajouter des lésions inflammatoires comme les papules, les nodules et les pustules.

Les papules ont généralement un diamètre inférieur à 5 mm et peuvent avoir un aspect érythémateux avec une couleur rouge et un gonflement pouvant être douloureux. Leur origine provient généralement d'un microkyste inflammé. Les papules sont l'expression d'une infection causée par la colonisation de la glande sébacée par *Cutibacterium acnes*. L'évolution de la papule se tourne vers deux issues : une résorption ou alors une évolution vers la formation de pustule (Marie, 2021).

Les pustules, de taille semblable aux papules, sont remplies d'un liquide de couleur blanchâtre ou pouvant devenir purulent et tourner vers une couleur jaunâtre. Les pustules ont un aspect très inflammatoire (Marie, 2021) (Figure 5). Par la suite, si aucun traitement n'est entrepris des cicatrices vont se former dans certains cas. Ces cicatrices peuvent être sévères et marquantes entraînant un retentissement esthétique ainsi qu'une détresse émotionnelle importante.

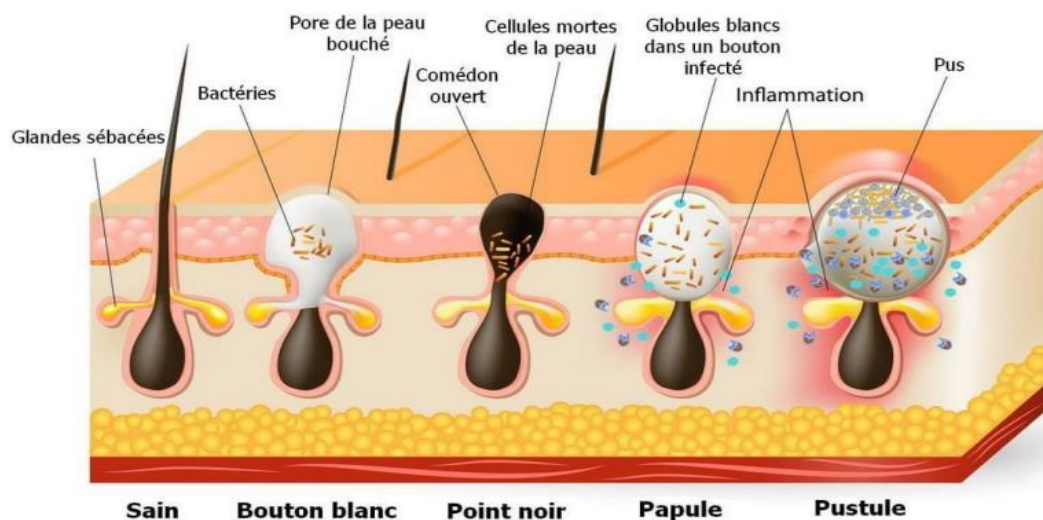


Figure 5 : Les différents types de lésions (Marie, 2021).

Sur cette figure, nous pouvons visualiser les différents types de lésions en comparaison avec un follicule pileux normal. On y voit un comédon ouvert, qui porte bien son nom de point noir à cause de l'oxydation, suivi d'un comédon fermé qui lui est de couleur blanche. La papule

montre bien son aspect inflammatoire avec une rougeur en surface et enfin la pustule démontre un aspect encore plus inflammatoire.

Les lésions se développent sur les joues, le menton, le front ou encore le dos, endroits où la concentration en follicules pilo-sébacés est la plus dense (**Tuchavi et al., 2015**).

L'acné est une maladie chronique inflammatoire, et non infectieuse comme pourrait le faire penser la présence de la bactérie *Cutibacterium acnes*. Sa physiopathologie est multifactorielle, la genèse de l'acné est au carrefour entre différents facteurs :

- Hyperkératinisation, causée par un défaut de kératinisation au sein du follicule, amenant au comédon
- Hyperséborrhée
- Colonisation par *Cutibacterium acnes* et libération de facteurs inflammatoire

III.1.1. Rôle de l'hyperkératinisation dans la physiopathologie de l'acné

L'hyperkératinisation est un élément clé de la survenue de l'acné. En effet, lors du processus d'hyperkératinisation, les kératinocytes prolifèrent de façon excessive et ne sont pas éliminés normalement, provoquant une obturation de l'infundibulum par lequel le sébum s'écoule (**Sánchez-Pellicer et al., 2022**). En temps normal, les cellules épithéliales se renouvellent à intervalles réguliers, lors de l'hyperkératinisation, la desquamation se fait anormalement ce qui provoque une accumulation des kératinocytes. Cela peut être dû à une infection ou une irritation chronique (**Sánchez-Pellicer et al., 2022**).

De plus, chez le sujet acnéique, la couche cornée est plus épaisse car les kératinocytes ont plus de desmosomes et de tonofilaments. Les desmosomes sont des cellules jointives retrouvées au niveau de l'épiderme. Ils permettent de relier deux membranes cellulaires externes à l'aide des tonofilaments. Les tonofilaments, eux, sont des filaments de kératine baignant dans le cytoplasme de la cellule (**Tuchavi et al., 2015**).

La desquamation anormale des cellules est due à une diminution du nombre de corps lamellaires dans l'espace intercornéocytaire, ce qui empêche une desquamation à un rythme normal.

L'acné change la structure de la kératine. Les gouttelettes lipidiques, comme vu précédemment, s'accumulent dans l'espace intercornéocytaire, la taille des grains de kératohyaline augmente alors que la quantité de corps lamellaire diminue. Tout d'abord, ces

changements sont observés au niveau de la partie inférieure de l'infundibulum puis on les retrouve dans l'ensemble du follicule. C'est ainsi que l'hyperkératinisation peut mener à la formation de microkystes par l'obturation de l'infundibulum. On peut également noter que dans les microkystes, les kératinocytes prolifèrent de façon plus importante que dans un follicule normal. Cela peut être dû à l'hyperséborrhée qui provoquerait une diminution de la présence d'acide linoléique, les détails de ce mécanisme seront vus dans la partie concernant l'hyperséborrhée, pour l'instant, nous pouvons simplement dire que la diminution de la présence d'acide linoléique provoque une différenciation anormale des kératinocytes (**Sánchez-Pellicer et al., 2022**).

L'hyperkératinisation peut également être causée par la production d'IL-1 α , une cytokine pro-inflammatoire que produisent les kératinocytes ainsi que les lymphocytes (**Tuchavi et al., 2015**).

III.1.2. L'hyperséborrhée et l'acné

III.1.2.1. Impact de la composition du sébum

L'hypersécrétion de sébum est considérée comme une étape majeure dans le développement de l'acné. En effet, les sujets souffrant d'acné produisent davantage de sébum que les sujets ayant une peau saine. Lorsque le sébum est produit en trop grande quantité, celui-ci peut boucher le follicule pilo-sébacé et ainsi contribuer à la formation de lésions. On retrouve également un rapport de corrélation entre la quantité de sébum excrétée et la sévérité des lésions acnéiques (**Mias et al., 2023**). Cependant, ce n'est pas seulement la quantité de sébum excrété qui joue un rôle dans le développement de l'acné, mais également la composition du sébum en lui-même. Effectivement, on retrouve une concentration moins élevée d'acides gras essentiels chez des sujets souffrant d'acné que chez des sujets contrôles (**Sánchez-Pellicer et al., 2022**).

Il se pourrait qu'une diminution de la concentration d'acide linoléique soit un facteur menant à la formation de comédons. On retrouve effectivement une concentration moins élevée d'acide linoléique chez les sujets acnéiques que chez les sujets sains.

De faibles taux d'acide linoléique peuvent rendre la barrière cutanée plus perméable aux substances inflammatoires et ainsi influencer sur la formation de comédons (**Mias et al., 2023**).

D'autres lipides peuvent être mis en cause dans la formation de comédons, notamment les sous-produits de la peroxydation du squalène après exposition aux UV. En effet, après exposition aux UV, le squalène est photo dégradé, il s'oxyde et engendre l'apparition de sous-

produits qui ont des propriétés nocives au niveau cutané, par exemple en exerçant une activité cytotoxique sur les kératinocytes. Le sous-produit primaire de la peroxydation du squalène est le squalène mono-hydroxyperoxyde, ses propriétés comédogènes ont été démontrées lors d'une étude par Chiba et collaborateurs en 2014. Lors de cette étude, il était question d'appliquer du squalène mono-hydroperoxyde sur des oreilles de lapin ; après application, des comédons sont apparus. En revanche, le squalène en lui-même n'entraînait pas d'apparition de lésions, c'est donc bien le squalène monohydroxyperoxyde qui est comédogène (**Sánchez-Pellicer et al., 2022**).

Les peroxydes de squalène ont également une activité pro-inflammatoire, ils induisent la régulation positive et la libération de médiateurs inflammatoires comme l'IL-6, ils peuvent également activer les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors). Chez les patients souffrant d'acné, on observe que la surface de leur peau et que la composition des lipides issus des comédons est enrichie en lipides dérivés de l'oxydation du squalène, ce qui permet de renforcer l'hypothèse pour laquelle la peroxydation du squalène joue un rôle dans le développement de l'acné (**Marie, 2021**).

En plus du peroxyde de squalène, les MUFA (monounsaturated fatty acid) peuvent provoquer des altérations au niveau de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes. Ainsi, on retrouve de plus grandes quantités de peroxyde de squalène chez les sujets acnéiques. Mais la différence de composition du sébum entre un sujet acnéique et un sujet contrôle ne s'arrête pas là. En effet, on observe une diminution de la quantité de vitamine E. On retrouve la vitamine E dans les lipides présents à la surface de la peau, c'est un constituant et un antioxydant majeur du sébum humain. La vitamine E permet de limiter les effets nocifs du squalène peroxyde, une diminution de la vitamine E permet donc au squalène peroxydé d'exercer une activité nocive sans restrictions (**Mias et al., 2023**).

III.1.3. *Cutibacterium acnes* et inflammation

➤ Le microbiome cutané : rôle de *C. acnes* et *Staphylocoque epidermidis*

Notre compréhension du rôle de *Cutibacterium acnes* dans la physiopathologie de l'acné a récemment subi un changement de paradigme : plutôt qu'une hyper-prolifération de *C. acnes*, c'est la perte d'équilibre entre les différents phylotypes de *Cutibacterium acnes*, associée à une dysbiose du microbiome de la peau, qui entraîne le développement de l'acné. La perte de diversité des phylotypes de *Cutibacterium acnes* agit comme un déclencheur de l'activation du

système immunitaire inné, conduisant à une inflammation cutanée. Une prédominance du phylotype IA1 de *Cutibacterium acnes* a été observée, avec un profil plus virulent dans l'acné que dans la peau normale. D'autres bactéries, principalement *Staphylococcus epidermis*, sont également impliquées dans l'acné. *Staphylococcus epidermis* et *Cutibacterium acnes* interagissent et jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie de la peau.

Il a été démontré que dans un microbiome cutané équilibré, le staphylococcus epidermidis contrôle la prolifération de *C. acnes* via la libération d'acide succinique, un produit de fermentation des acides gras qui inhibe les Toll like récepteurs (TLR) de surface des kératinocytes et du facteur de nécrose tumorale TNF- α et supprime la production d'IL-6 induite par *C. acnes* (Marie, 2021). Le *Cutibacterium acnes* limite la croissance de Staphylocoque aureus, ainsi que celle de Staphylocoque pyogènes en maintenant un pH acide du follicule pilosébacé en hydrolysant les triglycérides de sébum et en sécrétant de l'acide propionique (Figure 6). Le microbiome cutané est potentiellement influencé par des facteurs externes (facteurs mécaniques, cosmétiques comédogènes, dermo-nettoyants agressifs, médicaments, alimentation) et internes (facteurs hormonaux ou génétiques) (Marie, 2021).

Toute modification de la composition naturelle du microbiome peut entraîner une barrière cutanée perturbée, un effet qui est également appelé dysbiose, via une colonisation accrue de l'unité pilo-sébacée et de la surface cutanée par *C. acnes*, activant l'immunité innée via l'expression de récepteurs activés par la protéase (PAR), le facteur de nécrose tumorale- α , et la production d'interféron- γ et d'interleukines [IL-8]. Dans l'acné, la dysbiose peut être accompagnée d'un changement qualitatif et quantitatif du sébum, appelé dysséborrhée entraînant par conséquent une aggravation de l'inflammation.

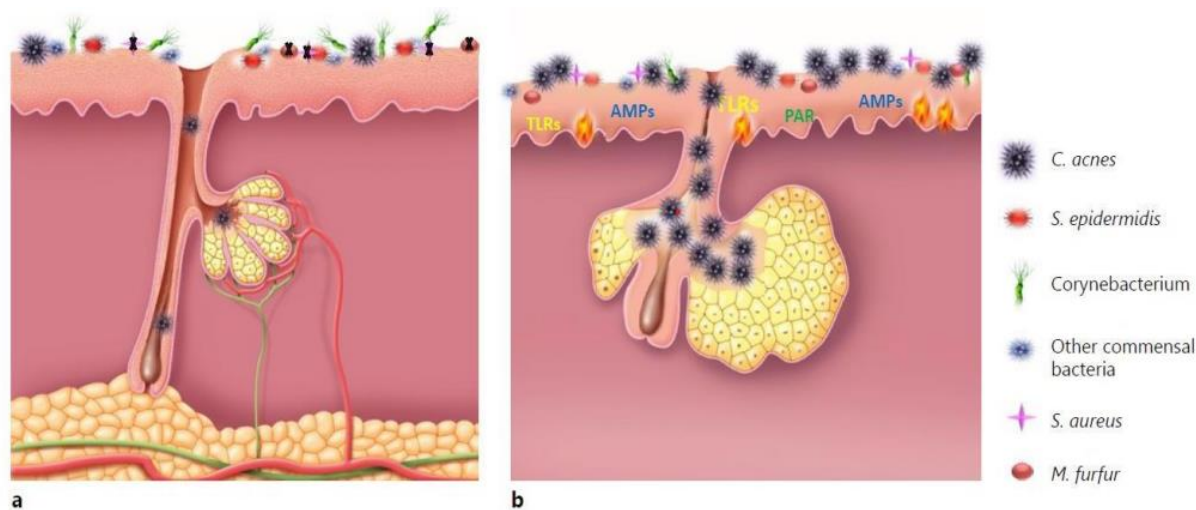


Figure 6 ; Microbiome sain (a) et un microbiome souffrant de dysbiose (b) après colonisation par *Cutibacterium acnes* (Marie, 2021).

➤ Colonisation bactérienne :

***Cutibacterium acnes* (Figure 7)** Le *Cutibacterium acnes* active la libération de lipases, de métalloprotéinases matricielles, d'hyaluronidases et les facteurs Christie–Atkins Munch–Petersen CAMP (Marie, 2021). La lipase a un chimiotactisme pour les neutrophiles et peut également hydrolyser les triglycérides dans le sébum pour libérer les acides gras avec un effet pro-inflammatoire et d'hyperkératose. Les protéases et la hyaluronidase aident potentiellement l'invasion de *C. acnes* en dégradant un constituant important de la matrice extracellulaire. Lorsque la matrice extracellulaire se décompose, des cellules inflammatoires telles que les cellules dendritiques, les leucocytes, les neutrophiles et les monocytes s'infiltrant dans la paroi folliculaire et l'inflammation se propage progressivement jusqu'à dans le derme. Un autre processus pathologique de *Cutibacterium acnes* est la formation de biofilms. Un biofilm est une agrégation complexe de bactéries enfermées dans une substance polymère extracellulaire (EPS) sécrétée par des organismes afin d'adhérer à la surface de la peau. L'EPS est un système qui régule la croissance et le métabolisme des microorganismes et confère une résistance aux cellules inflammatoires et aux agents antibactériens de l'hôte (Mias et al., 2023).

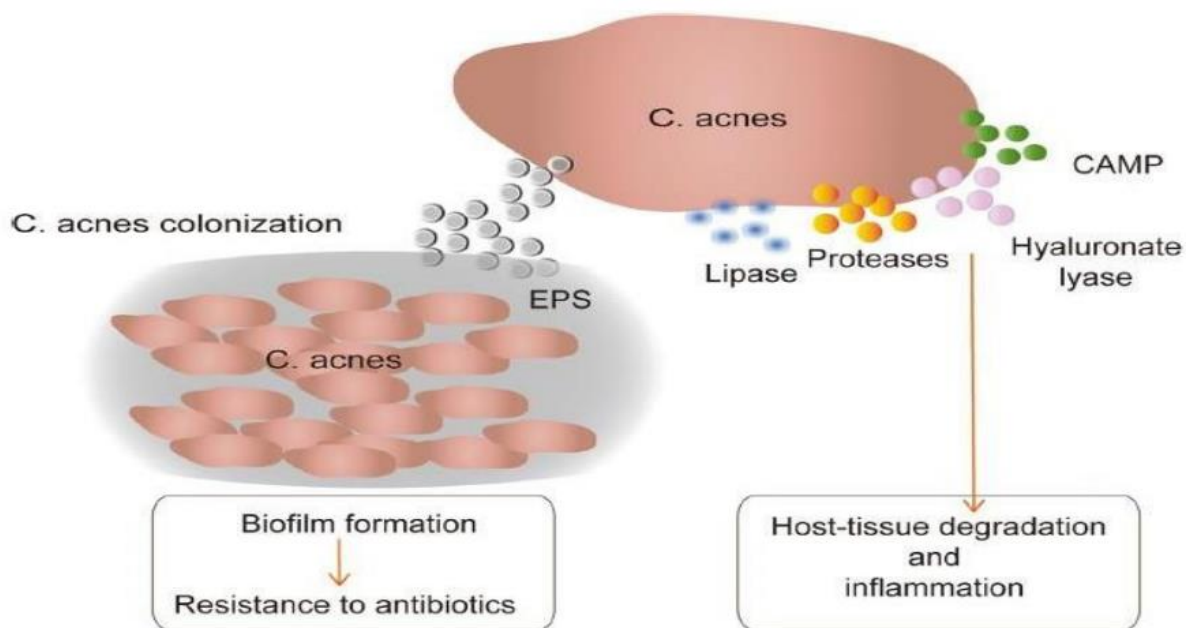


Figure 7 : Les principaux processus pathologiques induits par *Cutibacterium acnes* dans l'acné vulgaire (Mias et al., 2023).

➤ Inflammation

L'inflammation joue un rôle important dans l'apparition et le développement de l'acné vulgaire. IGF-1 et *Cutibacterium acnes* sont les facteurs les plus importants pour induire une réponse inflammatoire dans l'acné. Par ailleurs, les androgènes peuvent avoir des effets similaires, car les androgènes peuvent augmenter le taux d'IGF-1 dans le sang. Après la stimulation de l'IGF-1, les sébocytes libèrent des cytokines et des MMP et recrutent des cellules inflammatoires dans l'unité pilo-sébacée (Mias et al., 2023).

Le *C. acnes* est identifiée par TLR-2 exprimée sur des cellules de lignée monocyte / macrophage, qui induisent une activité du promoteur IL-20 p40 et la production d'IL-12 et d'IL8.

Cutibacterium acnes régule également l'expression des gènes caspase-1 et NLPR3 tout en induisant l'activation des monocytes-macrophages NLRP3-inflammasome en fonction de l'activité phagocytaire, entraînant la production abondante d'IL-1 β . *Cutibacterium acnes* a également un effet mitotique sur les lymphocytes T. Les lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire adaptative induite par *Cutibacterium acnes* sont les cellules T CD4 +, en particulier les cellules T helper Th1 et Th17. *C. acnes* déclenche la sécrétion d'IL-1 β , IL-6 et la transformation du facteur de croissance β (TGF- β) dans les cellules mononuclées du sang

périphérique induisant une différenciation naïve des cellules T CD4 + CD45RA T en cellules Th17 (**Figure 8**). Ce processus est potentiellement réalisé d'une manière dépendante du complexe majeur d'histocompatibilité II (MHC II). En plus des médiateurs inflammatoires, les neutrophiles interviennent également dans l'inflammation (**Mias et al., 2023**).

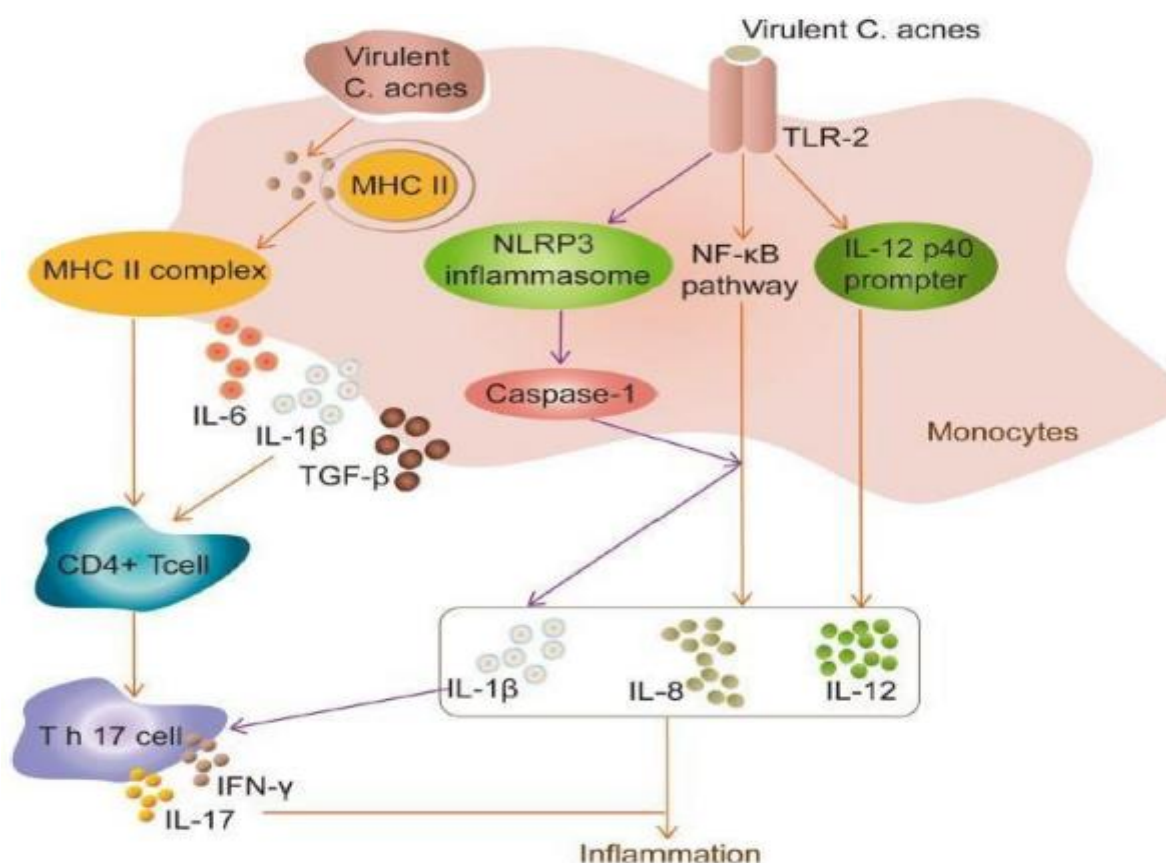


Figure 8 : Cascade de phénomènes inflammatoires au cours de l'acné (Mias et al., 2023).

IV. Méthodes d'élimination des peaux mortes : exfoliation

L'exfoliation est un processus d'élimination des cellules mortes de la surface de la peau et rend la peau plus douce, lisse et souple. Elle aide à améliorer la texture de la peau et améliore l'absorption et la rétention des agents hydratants et restaure le facteur d'hydratation naturel de la peau. Le peeling exfoliant de la peau est également la procédure préférée des dermatologues pour la peau âgée, le photovieillissement, les cicatrices d'acné et le mélasma. Il existe deux types d'exfoliation : mécanique et chimique. L'exfoliation mécanique est un processus d'exfoliation physique qui peut être réalisé en utilisant des gommages avec de petites particules granuleuses exfoliantes et une exfoliation chimique obtenue par des AHA et des BHA (**Behalpade et Gajbhiye, 2022**).

IV.1. Processus naturel d'exfoliation

La peau humaine est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et la couche sous-cutanée. Le processus d'exfoliation et de renouvellement des cellules cutanées se produit dans l'épiderme. La couche cornée est la couche la plus externe de la peau qui empêche la perte d'eau et protège également les tissus sous-jacents des infections et du stress chimique et mécanique. L'exfoliation se produit naturellement lorsque les cellules se détachent de la peau. Le remplacement des cellules cornéennes se produit par un processus d'auto-renouvellement lorsque les cellules épidermiques se déplacent vers le haut à partir de la couche basale, la couche basale, des deux couches suivantes, la couche spinosum et la couche cornée, pour aboutir à la couche cornée. Ce processus prend environ quatre semaines, bien qu'il prenne du temps en cas de vieillissement et d'autres affections cutanées. La desquamation normale se produit de manière invisible lorsque des cornéocytes isolés, ou de très petits agrégats de ceux-ci, se détachent de la surface de la peau et commencent à se détacher (**Behalpade et Gajbhiye, 2022**).

IV.2. Processus d'exfoliation cosmétique

L'exfoliation lente et faible est observée avec le vieillissement et d'autres affections cutanées. L'exfoliation de la surface de la peau peut être renormalisée en utilisant des produits cosmétiques. Le processus d'exfoliation cosmétique aide à éliminer les cellules mortes de la peau, à garder les pores clairs et à éliminer la saleté en fournissant un nettoyage en profondeur qui aide la peau à paraître plus jeune, saine et douce. L'exfoliation cosmétique modifie l'apparence de la surface de la peau, ce qui favorise également la régénération épidermique(**Chilicka et al., 2023**).

IV.2.1. Exfoliation mécanique

Il s'agit d'un processus d'exfoliation physique qui peut être obtenu en utilisant des gommages avec de petites particules granuleuses exfoliantes telles que des coquilles de noix pulvérisées, des noyaux d'abricots, des coquilles de pistaches, des coquilles d'amandes, des cristaux de sel. Chiffons en microfibres, masques en tissu, gommages pour le visage aux microbilles, pierre ponce, éponges et brosses abrasives. Les particules abrasives aident à exfolier les cellules mortes de la peau et à détacher les cornéocytes externes de la couche cornée. Le résultat dépend de la quantité de friction et de la nature de l'abrasif utilisé dans la formulation cosmétique (**Behalpade et Gajbhiye, 2022**). Une exfoliation douce peut être obtenue avec des

exfoliants à base de microbilles. Les microbilles sont fabriquées à partir de polyéthylène, de polypropylène et de polystyrène, mais elles peuvent provoquer une pollution de l'eau par des particules de plastique et sont dangereuses pour les animaux aquatiques dans l'océan et l'eau douce. Plusieurs pays ont interdit l'utilisation de microbilles dans l'industrie des soins personnels (**Behalpade et Gajbhiye, 2022**).

L'exfoliation mécanique dans lequel des procédures cosmétiques légères sont utilisées pour éliminer les cellules mortes de la peau de l'épiderme. Il élimine la couche cornée qui est la couche la plus externe de l'épiderme. Il affecte également les couches plus profondes de l'épiderme et du derme. La microdermabrasion provoque un réarrangement des mélanosomes dans la couche basale de l'épiderme, un aplatissement des crêtes réticulaires à la jonction dermo-épidermique, une augmentation de la densité des fibres de collagène à la jonction dermo-épidermique, ainsi qu'une ectasie vasculaire dans le derme réticulaire. Elle entraîne également la régulation positive des facteurs de transcription de cicatrisation des plaies et des métalloprotéinases de la matrice du derme. La procédure est réalisée en deux parties. Un matériau exfoliant comme des flocons de cristal ou de diamant est utilisé et dans l'autre partie, une aspiration mécanique soulève doucement la peau pendant l'exfoliation. Il s'agit d'une procédure de rajeunissement de la peau simple, facile, indolore et non invasive. La méthode la plus sûre de microdermabrasion consiste à utiliser des cristaux de corindon ou d'oxyde d'aluminium en suspension dans une crème antioxydante (**Sinha, 2023**). Les cristaux d'oxyde d'aluminium ne provoquent pas de réaction allergique et sont chimiquement inertes et ne sont pas absorbés par la peau. De plus, ils ont des propriétés bactéricides qui peuvent être utilisées pour exfolier la peau acnéique.

IV.2.2. Exfoliation chimique

Les méthodes d'exfoliation chimique comprennent les acides, les peelings non acides, les enzymes ou d'autres produits chimiques actifs. Cette exfoliation comprend l'utilisation de crèmes, de lotions, de sérums et de gels. Elles comprennent également des gommages contenant de l'acide salicylique, de l'acide glycolique, des enzymes de fruits, de l'acide citrique ou de l'acide malique qui peuvent être appliqués en concentrations élevées par un dermatologue, mais maintenant dans de nombreuses préparations cosmétiques, ces actifs sont utilisés à faible concentration. L'exfoliation chimique implique l'utilisation de produits contenant de l'acide alpha-hydroxy (AHA) ou de l'acide bêta-hydroxy (BHA) (**Sinha, 2023**). Les enzymes aident à détacher la substance semblable à de la colle qui maintient les cellules ensemble et leur permet de se détacher. L'exfoliation chimique améliore la texture de la peau, réduit les ridules, l'hyperpigmentation et traite l'acné

Les gommages physiques sont désormais remplacés par des peelings chimiques. Les peelings chimiques sont appliqués sur la peau pour éliminer les cellules mortes de la peau et la mélanine. Ils sont utilisés pour créer une blessure à une certaine profondeur de la peau qui stimule la croissance d'une nouvelle peau et améliore ainsi la texture de la surface et l'apparence (**Chilicka et al., 2023**).

L'effet exfoliant du peeling chimique conduit à la croissance épidermique et à la stimulation du collagène ainsi qu'à la répartition uniforme de la mélanine. Ils améliorent le processus de renouvellement cellulaire et augmentent également la teneur en humidité de la peau. Les peelings chimiques sont classés en fonction de la profondeur d'action qui peut être superficielle, moyenne et profonde. Après l'application, la peau commence à se débarrasser des cellules mortes de la peau. Le peeling révèle une peau saine, lisse et radieuse. Les exfoliants chimiques dissolvent la colle qui maintient les cellules mortes de la peau ensemble et pénètrent dans la couche supérieure de la peau pour éliminer complètement la peau blanche squameuse (**Behalade et Gajbhiye, 2022**).

➤ Mécanisme d'action des peelings chimiques

Les peelings superficiels pénètrent uniquement dans la couche épidermique tandis que les peelings de profondeur moyenne peuvent pénétrer dans tout l'épiderme et le derme papillaire et les peelings profonds sont utilisés pour contrôler les lésions tissulaires du derme mi-réticulaire et parfois également de l'hypoderme (**Behalade et Gajbhiye, 2022**). Comme les peelings superficiels agissent sur l'épiderme, ils stimulent le renouvellement des kératinocytes

de la couche basale et entraînent une inflammation du derme supérieur qui entraîne une stimulation de la nucléogénèse qui active les fibroblastes qui entraînent la synthèse de nouveau collagène de type I et IV ainsi que de fibres d'élastine. Les peelings à l'acide glycolique ont tendance à induire la libération d'interleukine-1 α dans l'épiderme. Les substances actives utilisées pour les peelings superficiels sont les acides α -hydroxy : acide glycolique (dérivé du sucre de canne), acide lactique (dérivé du lait), acide malique (dérivé des pommes), acide citrique (dérivé des fruits), acide tartrique (dérivé du raisin). Acides ayant un poids moléculaire plus élevé, tels que l'acide mandélique et l'acide benzilique (**Behalade et Gajbhiye, 2022**).

Ils sont connus pour provoquer une précipitation importante de protéines qui entraîne une nécrose coagulative des cellules et produit un œdème et une homogénéisation du derme papillaire. Une desquamation se produit en 5 jours et redevient normale après une semaine. L'acide trichloracétique TCA (35-50%) est principalement utilisé comme agent de peeling de profondeur moyenne. Il peut également être utilisé à 35 % en combinaison avec de l'acide glycolique à 70 % et une solution de Jessner. Le peeling profond est rarement pratiqué en raison du temps d'arrêt nécessaire à la guérison et des effets indésirables. La solution de peeling profond pénètre dans le derme réticulaire moyen et produit du nouveau collagène. Cette combinaison composée d'huile de croton et de phénol en concentrations variables. Elle peut améliorer l'acné atrophique mais nécessite une surveillance. La majorité de ces peelings produisent une coagulation des protéines, une régénération épidermique et une synthèse de collagène et d'élastine. Ces résultats persistent pendant des années une fois le traitement terminé (**Chilicka et al., 2023**).

V. Génération du stress oxydatif au niveau de la peau

Les espèces réactives d'oxygène, souvent appelés radicaux libres ou oxydants, comprennent les ROS, les RNS, les espèces réactives du soufre et les espèces réactives du carbone (**Chen et al., 2021**). ROS et RNS, tels que le radical anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxyde nitrique (NO) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$), sont nocifs pour la peau (**Chen et al., 2021**). Les ROS et RNS peuvent être produits au cours de processus métaboliques intracellulaires tels que la chaîne de transport d'électrons.

Les mitochondries sont une source importante de ROS dans la plupart des cellules de mammifères. Les ROS sont générés en tant que sous-produits du métabolisme mitochondrial

normal via des réactions respiratoires en chaîne. Le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est le ROS mitochondrial proximal et la production de $O_2^{\cdot-}$ au sein de la matrice mitochondriale, de l'espace intermembranaire et de la membrane externe, conduit à la formation de H_2O_2 à partir de la dismutation catalysée par le superoxyde dismutase (SOD). Un peu d' $O_2^{\cdot-}$ peut réagir directement avec $NO^{\cdot}$ pour former $ONOO^-$ (Chen et al., 2021). Les ROS produites peuvent déclencher l'induction de pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) au sein de mitochondries individuelles dans des systèmes cellulaires intacts. Le mPTP déclenché par les ROS, associé à une stimulation supplémentaire de la formation de ROS, a été appelé « libération de ROS induite par les ROS » (RIRR) (Zorov et al., 2014). Le fer et les dérivés du fer, tels que l'hème ou les amas fer-soufre, sont incorporés dans les sous-unités de la chaîne de transport d'électrons mitochondriales et sont essentiels au fonctionnement des enzymes productrices de ROS telles que les NADPH oxydases, la xanthine oxydase, les lipoxygénases et le cytochrome P450 (Dixon et al., 2014).

Les ROS présents dans la peau peuvent également être induits de manière extrinsèque par les UVA, les UVB, la lumière visible, les spectres infrarouges, les polluants et le stress psychologique. Les humains possèdent un système de défense antioxydant inné, comprenant différentes enzymes antioxydantes telles que la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase, ainsi que des antioxydants non enzymatiques, tels que le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C) et le tocophérol (vitamine E), qui neutralisent les radicaux. Cependant, le système inné peut être submergé, ce qui conduit à un état de stress oxydatif qui peut être causé par plusieurs facteurs.

V.1. UV/lumière visible/rayonnement infrarouge

Les rayons UV sont les principaux initiateurs de la génération de ROS dans la peau. Le spectre d'action pour la génération de ROS est principalement présent dans la gamme UVA (320-400 nm), et certains spectres chevauchent la gamme UVB. Niveaux mesurables de H_2O_2 et $^{\cdot}OH$ ont été observés dans les 15 minutes suivant l'exposition aux UV, et ils continuent d'augmenter jusqu'à 60 minutes. La génération de ROS après irradiation par UVA et UVB nécessite l'absorption de photons par des molécules photo sensibilisatrices endogènes, telles que les cytochromes, la riboflavine, l'hème et la porphyrine. La photo sensibilisateur excité réagit ensuite avec l'oxygène, entraînant la génération de ROS, notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et l'oxygène singulet (1O_2). La SOD convertit l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , qui peut facilement

traverser les membranes cellulaires en conjonction avec des métaux de transition tels que Fe(II) ou Cu(II), qui conduisent à la génération du radical hydroxyle hautement toxique ($\bullet\text{OH}$). En outre, la lumière visible, avec des longueurs d'onde allant de 400 à 700 nm, peut produire des ROS dans la peau. La formation de $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$, et l'oxygène singulet provenant de la lumière visible a également été rapporté (**Dumbuya et al., 2020**).

En outre, le rayonnement infrarouge d'une longueur d'onde de 700 à 4 000 nm, provenant de sources naturelles (rayonnement solaire), ainsi que celui émis par des appareils thérapeutiques et cosmétiques sont également capable d'induire des ROS, en particulier dans les mitochondries. Ces ROS sont finalement converties en chaleur et autres réactions via la protéine de choc thermique MP-1, comme dans le cas du spectre infrarouge (**Chen et al., 2021**).

V.2. Pollutions

Les polluants environnementaux, tels que les particules provenant de la combustion de carburants (par exemple, les gaz d'échappement de l'essence ou du diesel), contiennent des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dont certains sont hautement photoréactifs et peuvent induire un fort stress oxydatif sous exposition aux UV. Les oxydes d'azote, tels que NO et NO₂, sont principalement émis par le transport et la combustion de combustibles solides. Les oxydes d'azote issus de la pollution atmosphérique peuvent favoriser de manière significative l'oxydation de la surface de la peau en association avec le superoxyde produit par photoactivation de divers chromophores, y compris les constituants des particules PM. L'ozone (O₃) est généré lorsque des polluants tels que l'oxyde nitreux (NO_x) et les composés organiques volatils réagissent avec les rayons UV. Bien que l'O₃ ne puisse pas pénétrer dans la peau, il induit un stress oxydatif via la formation de produits de peroxydation lipidique dans les couches superficielles de la peau (**Clatici et al., 2018**). Il réagit rapidement avec le sébum à la surface de la couche cornée, produisant une variété de produits chimiques tels que des carbonyles et des aldéhydes réactifs. En plus de cela, l'O₃ peut également épuiser les antioxydants essentiels, tels que la vitamine E et la vitamine C, dans la peau (**Valacchi et al., 2015**).

V.3. Impact du stress oxydatif sur la pigmentation cutanée

Les mécanismes de régulation qui conduisent à la pigmentation de la peau sont compliqués. De nombreuses données suggèrent que le stress oxydatif induit par les UV et les dommages à l'ADN dans les cellules de la peau, ainsi que la réparation des dommages à l'ADN, déclenchent des signaux cellulaires qui favorisent la mélanogénèse. Un certain nombre d'études

ont démontré une association entre le stress oxydatif et l'aggravation de la mélanogénèse médiée par les UVA. Cela se produit via une surproduction d'oxydants réactifs, tels que H_2O_2 et ERNs, en particulier NO (D'Orazio *et al.*, 2013).

VI. Antioxydants dans la peau

VI.1. Antioxydants enzymatiques

- **La superoxyde dismutase (SOD):** enzyme antioxydante ubiquitaire (mitochondrie, cytosol) qui catalyse la dismutation de l' $O_2^\bullet$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Sharma *et al.*, 2021) ;
- **La catalase (CAT) :** elle permet la conversion du peroxyde d'hydrogène en en oxygène et en eau (Sharma *et al.*, 2021) ;
- **La glutathion peroxydase (GPx) :** c'est une enzyme antioxydante qui converti le peroxyde d'hydrogène présence du glutathion réduit pour donner de l'eau et le glutathionoxydé

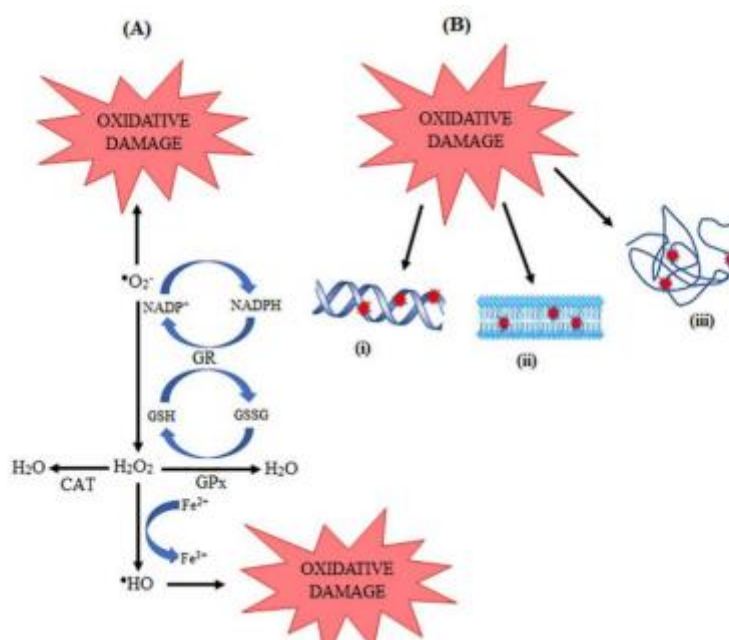


Figure 9 : Enzymes antioxydantes dans la peau (Sharma *et al.*, 2021).

La SOD, la GPx et la CAT se trouvent dans les couches cutanées (A) pour protéger les macromolécules cutanées des dommages oxydatifs (B) qui comprennent : i) les dommages oxydatifs des nucléotides, ii) la peroxydation lipidique et iii) la carbonylation des protéines.

VI.2 Antioxydants non enzymatiques

- **Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont un groupe de composés phytochimiques présents naturellement sous forme de pigments organiques. Parmi la grande quantité de composés caroténoïdes présents dans la nature, les humains consomment environ 30 caroténoïdes dans leur alimentation. Les caroténoïdes sont bien connus pour leurs propriétés antioxydantes, avec une grande capacité à éteindre 1 O_2 et à piéger les radicaux peroxydes (**Sandmann, 2019**). Une fois ingérés, les caroténoïdes sont absorbés par divers tissus, dont la peau, dont le niveau augmente avec l'augmentation de la consommation de fruits et légumes (**Matsumoto et al., 2020**). Les composés détectés dans la peau sont le bêta-carotène, le lycopène, la zéaxanthine et la lutéine (**Obana et al., 2020**). Ces composés protègent la peau contre les effets néfastes du 1 O_2 , produit dans la peau après une exposition aux rayons UV (**Sandmann, 2019**).

➤ Vitamine C

La vitamine C Appelée aussi l'acide L-ascorbique, c'est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire, ainsi que le foie et les muscles, mais avec de faible concentration. Elle peut piéger directement l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle $\text{HO}^\bullet$, l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via la peroxydase. En plus, elle permet la régénération de la forme non radicalaire de la vitamine E. La vit C a notamment un rôle antioxydant au niveau des tissus oculaires, en particulier la rétine, où elle participe à la dégradation du H_2O_2 . Elle peut recycler l' α -tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides. (**Kaźmierczak-Barańska et al., 2020**).

Tous ces systèmes antioxydants participent de ce fait à maintenir en quelque sorte l'homéostasie du milieu intérieur à travers la régulation du fonctionnement du système immunitaire.

➤ Vitamine E

La vitamine E est un antioxydant brise-chaîne important de première intention, localisé dans le compartiment lipidique de la peau, 87 % de la vitamine E totale de l'épiderme étant constituée d' α -tocophérol. Sa concentration dans l'épiderme est supérieure de 90 % à celle du derme, avec un gradient du niveau le plus élevé que l'on retrouve dans la couche la plus profonde de la couche cornée ainsi que dans la sécrétion des glandes sébacées. Cela est probablement dû à l'exposition directe de l'épiderme aux agressions environnementales. Les conséquences d'une exposition à court et à long terme de la peau à un environnement hostile comprennent l'érythème, l'épaississement de la peau, les rides et un risque accru de cancer de

la peau (Ali et al., 2020). Les radicaux peroxydes formés lors de l'exposition aux rayons UV ou aux produits chimiques présents dans l'air réagissent plus efficacement avec la vitamine E qu'avec les acides gras polyinsaturés, générant des radicaux tocophéryle. La vitamine C soutient l'activité antioxydante de la vitamine E en reconvertissant le radical tocophérol à son état réduit, c'est-à-dire l' α -tocophérol. Ces mécanismes protègent la structure lipidique et les matières de la peau (Ali et al., 2020).

VIII.1. Généralités sur le cacaoyer

VIII.1.1. Position systématique du cacaoyer

D'après Gopaulchan, et al., (2019), la taxonomie du cacaoyer est :

Règne :	Végétal
Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Dilleniidae
Ordre :	Malvales
Famille :	Malvaceae
Genre :	<i>Theobroma</i>
Espèce :	<i>Theobroma cacao</i>



Figure 10 : Plante de Cacao (Agouak, 2023)

VIII.1.2. Diversités morphogéographiques du cacaoyer

VIII.1.2.1. Type Criollo

Le type Criollo est une variété originaire d'Amérique centrale et du Mexique. Aujourd'hui on le retrouve également aux Antilles, en Colombie et à Madagascar. Le Venezuela demeure un site réputé pour sa production de « Criollo modernes ». Dans les vallées de Chuao y Choroni, les arbres ressemblent beaucoup au Criollo du Nicaragua, dont il pourrait provenir. Il n'y a pas eu d'introduction directe de Criollo en Afrique de l'Ouest et Centrale. Les Criollo ont une croissance lente, produisent un cacao « fèves à casse claire » (absence de pigmentation), très aromatique, qui ne présente qu'une amertume légère. Leurs fruits allongés avec une pointe acuminée, une surface lisse ou rugueuse, rouge ou verte avant maturité, et un cortex peu lignifié. Les fèves sont généralement grandes et épaisses, de couleur blanche ou rosée. Cependant les arbres se caractérisent par une productivité limitée, un manque de vigueur,

une grande sensibilité aux maladies et aux insectes ainsi qu'une faible capacité d'adaptation à des conditions qui diffèrent de celles de leurs sites respectifs de collecte (**Motamayor et al., 2016b**). Pour ces raisons, cette variété n'est actuellement que très peu cultivée et de plus sous des formes hybrides (Criollo modernes).



Figure 11: Cabosse de cacao de variété Criollo (Agouak, 2023).

VIII.1.2.2. Type Forastero

Les cacaoyers les plus cultivés et les plus répandus à travers le monde sont des hybrides de Bas Amazoniens. Leurs cabosses sont de dimensions moyennes, de couleur verte devenant jaune à maturité. Elles possèdent une base légèrement étranglée en goulot de bouteille, une surface lisse très superficiellement sillonnée. Les fèves sont de taille moyenne, couleur violet foncé. Ces variétés doivent leur succès à leur homogénéité, leurs bonnes caractéristiques agronomiques et leur excellente capacité d'adaptation à de nouveaux territoires (**Motamayor et al., 2016b**). Ce type de cacao représente environ 80% de la production mondiale et est produit principalement en Afrique et en Amérique latine.



Figure 12: Cabosses de cacao de variétés Forastero (Agouak, 2023)

VIII.1.2.3. Type Trinitario

Les Trinitario, connus uniquement à l'état cultivé, possèdent des caractéristiques intermédiaires entre les Criollo et les Forastero. Ils ont été sélectionnés à Trinité et sont issus des croisements naturels entre des Criollo d'origine inconnue, qui constitueraient la première plantation de l'île, et des Forastero probablement originaires de l'Etat de Bolivar au Venezuela, introduits à la suite de la quasi-destruction des premières plantations en 1927 (**Motamayor et al., 2016a**). En première génération, les arbres peuvent être vigoureux et hautement productifs. La couleur des fèves, entre le blanc des Criollo et le sombre des Forastero, en fait des produits recherchés pour la fabrication de poudres. La première population connue de Trinitario a été développée il y a environ 250 ans à Trinidad. Elle fut introduite d'abord au Venezuela puis en Equateur et enfin au 19^{ème} siècle sur le continent américain (**Motamayor et al., 2016a**). Aujourd'hui des Trinitario sont cultivés dans tous les pays où furent autrefois cultivés les Criollo (Mexique et Amérique Centrale, Trinidad et îles Caraïbes, Colombie et Venezuela). Les Trinitario sont peu présents en Afrique, à l'exception du Cameroun qui se distingue des autres pays producteurs par l'existence d'une population importante de cacaoyers de ce type.



Figure 13: Cabosses de cacao de variétés Trinitario (Agouak, 2023).

VIII-1-3 Travaux antérieurs sur les coques de cacao

Une cabosse de cacao sont constituées des graines (fèves, d'une pulpe et d'une coque qui est la parties externe la partie externe. Nous nous intéresserons à la coque.

Les coques de cacao sont utilisées pour la fabrication des aliments de certains animaux. En effet, les coques séchées sont incorporées pour produire des aliments des volailles avec une teneur de 10%, des porcs 25% et des moutons 40%. Après séchage, les cabosses vides peuvent être brûlées et produire des minéraux (40% de potassium).

De plus, les coques de cacao peuvent servir à la production de charbon actif, un matériau pris pour ses propriétés absorbantes (Fisal, 2005), la production de gomme (Samuel, 2006), de potasse utilisée dans la saponification et de colorants alimentaires (Figueira, 1993). Sur le plan compositionnel les études antérieures révèlent que, les coques de cacao ont une teneur en hydrates de carbone (32,3%, lignine (21,44%, sucres (19,2%), protéines (8,6%) et minéraux (27,7%) (Vriesmann, 2011). D'autres études antérieures ont mis en évidence la richesse des coques de cacao en polyphénols, notamment les flavonoïdes (karim et al., 2017).



Figure 14 : Cabosse brisée ouverte pour montrer les fèves entourées de pulpe mucilagineuse (Oddoye et al., 2013).

MATERIELS ET METHODES

I. Matériel biologique, matériel végétal et préparation des extraits

I.1. Matériel biologique animal

Pour l'accomplissement de ce travail des rats et souris de type Wistar albinos de l'animalerie du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie de l'université de Yaoundé 1 ont été utilisés respectivement de source pour le prélèvement du foie et l'isolement des macrophages primaires.

I.2. Matériel végétal

Pour ce travail le matériel végétal était constitué des coques de cacao de variétés *Trinitario* et *Forasttero* récoltées dans la région du centre Cameroun (SODECAO). Ces coques ont été découpées, séchées à l'air libre pendant trois à six semaines, finement broyées à l'aide d'un moulin électrique puis la poudre obtenue a été emballée et conservée à température ambiante au laboratoire pour son utilisation

I.3. Préparations des extraits

I.3.1. Préparation des extraits aqueux

➤ Décoction

Cinquante grammes (50g) de poudre des écorces de coques de cacao ont été introduits dans 500mL d'eau pendant 30 minutes et refroidi ensuite à température ambiante. Les mélanges obtenus ont été filtrés au moyen du papier Whatman N°1 et Les extraits finaux obtenus, ont été séchés à l'étuve à 50°C.

➤ Macération

Cent grammes (100g) de poudre des écorces de coques de cacao ont été introduits dans 1000mL de l'eau distillée et laissé macérer pendant 48 h. Les mélanges obtenus ont été décantés et filtrés au moyen du papier Whatman N°1 et Les extraits finaux obtenus, ont été séchés à l'étuve à 50°C.

I.3.2. Préparation de l'extrait éthanolique

Cent grammes (100g) de poudre des écorces de coques de cacao ont été introduits dans 1000mL d'éthanol (95 %) et laissés macérer pendant 48 h. Les mélanges obtenus ont été décantés et filtrés au moyen du papier Whatman N°1 et Les extraits finaux obtenus, ont été séchés à l'étuve à 50°C.

I.3.3. Préparation de l'extrait hydro-éthanolique

Cent grammes (100g) de poudre des écorces de coques de cacao ont été introduits dans 1000mL d'un mélange hydro-éthanolique dans les proportions 50:50 v/v et laissés macérer

pendant 24 h. Les mélanges obtenus ont été décantés et filtrés au moyen du papier Whatman N°1 et les extraits finaux obtenus, ont été séchés à l'étuve à 50°C.

Pour les différentes préparations le rendement d'extraction a été calculé selon la formule :

$$Rd(\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait obtenu}}{\text{Masse de la poudre initiale}} \times 100$$

II. Criblage phytochimique et dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux

II.1. Criblage phytochimique

Afin de détecter les groupes de métabolites secondaires présents dans nos différents extraits de plantes, des tests colorimétriques qualitatifs et spécifiques ont été effectués. Pour chacun de ces tests les extraits ont été préparés à 1mg/ml.

II.1.1. Test des phénols : réaction au FeCl_3 (Prabhavathi et al., 2016)

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 2 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 5 %. Après agitation, l'apparition d'une coloration bleue indiquait la présence des phénols.

II.1.2. Test des flavonoïdes : réaction au NaOH en milieu acide (Prabhavathi et al., 2016)

Trois gouttes d'une solution aqueuse de NaOH 20 % ont été mélangées à 2 ml d'extrait. Après agitation, la formation d'une coloration jaune intense qui disparaissait par ajout de 3 gouttes d'une solution aqueuse de HCl 70 % indiquait la présence des flavonoïdes.

II.1.3. Test des coumarines : réaction au NaOH (Savithramma et al., 2011)

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 3 ml d'une solution aqueuse de NaOH 10 %. Après agitation, l'apparition d'une coloration jaune indiquait la présence des coumarines.

II.1.4. Test des tannins : réaction au FeCl_3 (Prabhavathi et al., 2016)

Deux millilitres d'extrait ont été ajoutés à 1 ml d'une solution alcoolique de FeCl_3 10 %. Après agitation, l'apparition d'une coloration noire indiquait la présence des tannins.

II.1.5. Test des anthocyanes: réaction au NH_3 en milieu acide (Savithramma et al., 2011)

Un millilitre d'extrait a été ajouté à 2 ml d'une solution aqueuse de HCl 2 N. Après agitation et ajout de 1 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque 25 %, l'apparition d'une coloration violette-rouge virant au bleu-violet indiquait la présence des anthocyanes.

II.1.6. Test des terpénoïdes: réaction de précipitation au HCl (Prabhavathi et al., 2016)

Demi-millilitre de chloroforme a été ajouté à 1 ml d'extrait. Après agitation et ajout de 5 gouttes de HCl concentré, l'apparition d'un précipité brun-rougeâtre indiquait la présence des terpénoïdes.

II.1.7. Test des saponines : réaction à l'eau distillée (Savithramma et al., 2011)

Deux millilitres d'extrait a été ajouté à 6 ml d'eau distillée. Après agitation vigoureuse, la formation d'une mousse persistante indiquait la présence des saponines.

II.1.8. Mise en évidence des quinones (Réaction de Borntraëger)

Un aliquote d'extrait est dissout dans 5 ml de HCl dilué au 1/5 et chauffée au bain-marie bouillant pendant 30 min, puis extrait avec 20 ml de CHCl₃ après refroidissement. A la phase organique sont additionnés 0,5 ml de NH₄OH diluée à 50 %. L'apparition d'une teinte allant du rouge au violet indique une réaction positive.

II.2. Dosage des composés phénoliques totaux (Dhar et al., 2012)

Principe :

Il est basé sur le transfert des électrons dans un milieu alcalin à partir des composés phénoliques et de toutes autres espèces réductrices au molybdène.

Mode opératoire :

Dans chaque tube, nous avons introduit 2000µL d'eau distillé, 100µL d'extrait à 100 µg/ml et 200µl de la solution de Folin-ciocalteu (2N). La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été faite à une concentration fixée à 100µg/ml à différents volumes (0, 20, 40, 60, 80, 100 µL) et en complétant les volumes 100µL avec du méthanol pur puis 200µL de Folin-ciocalteu ont également été ajouté.

Le mélange est mis au repos pendant 3 min, puis Nous avons ajouté 1000 µl de carbonate de Sodium 20%. Le mélange est incubé 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. La densité optique a été lue à 700 nm. Les teneurs en polyphénols totaux ont été exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) en utilisant la droite d'étalonnage. Le mode opératoire est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Etalonnage des polyphénols

N° de tubes	Blanc	1	2	3	4	5
Acide gallique (100 µg/Ml) (µL)	/	20	40	60	80	100
Méthanol (µL)	100	80	60	40	20	/

Eau distillée (µL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Folin-ciocalteu 2N (µL)	200	200	200	200	200	200
Mélanger. Laisser 3 minutes à température ambiante. Ajouter.						
NaHCO ₃ 20% (m/v) (µL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Mélanger. Laisser à température ambiante à l'obscurité pendant 1h et lire la DO à 700nm contre le blanc.						
Acide gallique (µg)	0	1	2	3	4	5

II.3. Dosage des flavonoïdes (Dhar *et al.*, 2012)

Principe :

Les flavonoïdes en présence du chlorure d'aluminium donnent des complexes de couleur jaune qui absorbent à 430 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présents dans le milieu réactionnel.

Mode opératoire :

Dans les tubes blanc et tests ont été respectivement introduits, 500µL de méthanol et 500µL de la solution d'extrait ensuite 500µL de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 2% (m/v) a été introduits dans chacun des tubes. L'ensemble des tubes est mélangé à l'aide du vortex puis ont été incubé à température ambiante pendant 1h et les densités optiques de la coloration jaune lues à 430 nm contre le blanc. Le dosage a été réalisé en triple et la Quercétine a été utilisée comme étalon. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en milligrammes équivalents de Quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) en utilisant la droite d'étalonnage.

Tableau 2 : Etalonnage des flavonoïdes

N° de tubes	Blanc	1	2	3	4	5
Quercétine (10µg/ml) (µL)	/	100	200	300	400	500
Méthanol (µL)	500	400	300	200	100	/
AlCl ₃ 2% (m/v) (µL)	500	500	500	500	500	500
Mélanger. Laisser à température ambiante pendant 1h et lire la DO à 430nm contre le blanc.						
Quercétine (µg)	0	1	2	3	4	5

III. Détermination du potentiel antioxydant des extraits de coques de cacao

Au moment des analyses, chaque extrait de plante a été dissous dans leurs solvants d'extraction respective et testé en double aux concentrations finales de 0,1, 1, 10, 100 et 1000 µg/ml. Le composé de référence utilisé était l'acide ascorbique qui a été testée aux mêmes concentrations que les extraits de plantes. Chaque expérience a été réalisée en triplicat.

III.1. Evaluation de l'effet des extraits de coques de cacao sur l'inhibition de la peroxydation lipidique (Xiao *et al.*, 2009)

III.1.1. Préparation de l'homogénat de foie

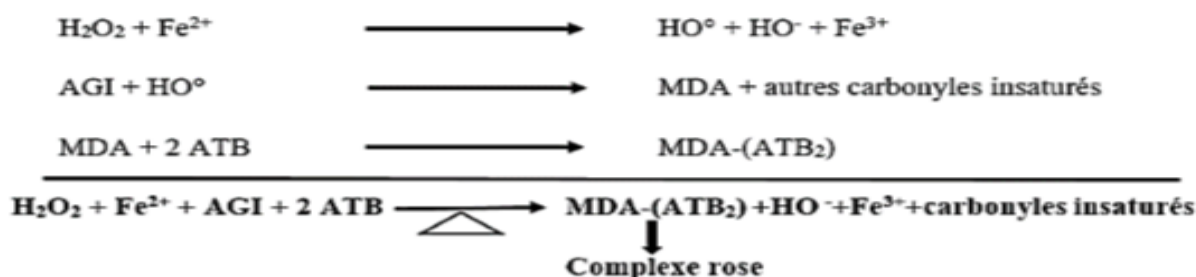
Deux rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les foies ont été excisés. Le reste de la manipulation s'est effectué dans la glace. Les organes ont été lavés dans une solution d'eau physiologique NaCl 0,9% puis, essorés et pesés. Une fois les masses des foies connues, ils ont été découpés en petit morceaux et broyés à l'aide du piston en téflon de l'appareil de Potter et du sable de fontaine Bleau. Les homogénat 10% dans une solution de KCl 1,15% ont ainsi été préparés en tenant compte du poids des foies, puis réparti dans plusieurs tubes et centrifugé (2000trs/min, 10min, 4°C). Chaque surnageant a été recueilli et le volume noté. Suivant le nombre de dosages à effectuer, des aliquotes ont été préparés, puis conservé au congélateur jusqu'à utilisation.

III.1.2. Induction de la peroxydation lipidique

Principe :

Couplée au Fe²⁺, le H₂O₂ libère le radical hydroxyle (HO•) qui attaque les liaisons éthyléniques des acides gras insaturés (AGI) pour les oxyder. Il se forme des substances

réactives à l'acide thiobarbiturique (ATB) dont le Malonedialdehyde (MDA) qui réagit en milieu acide et à chaud avec deux molécules de ATB pour former un complexe rose qui absorbe à 532 nm suivant l'équation ci-dessous.



Mode opératoire :

Dans chaque tube à essai, ont été introduit successivement 50 µl d'extrait, 1 ml d'homogénat de foie de rats 10%, 50 µl de FeCl₂ 0,5 mM et 50 µl de H₂O₂ 0,5 mM. Dans le tube blanc, le FeCl₂ et H₂O₂ ont été remplacé par 100 µl KCl 1,15% tandis que dans le tube témoin négatif, le solvant d'extraction a été utilisé à la place de l'extrait et pour le tube standard l'acide ascorbique a été utilisé. Les mélanges ont été incubés (1 heure, 37° C). Après incubation, 1ml d'acide trichloracétique (ATC 15%) et 1ml d'ATB 0,67% ont été ajoutés dans tous les tubes et portés à ébullition au bain-marie pendant 15 minutes. Après refroidissement et centrifugation (3000 trs/min, 5 min, 4°C), les surnageant ont été récupérés et l'absorbance de la coloration rose lue à 532 nm contre le blanc. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés en utilisant la formule ci -dessous.

$$\% \text{inhibition de la peroxydation lipidique} = \frac{\text{DO témoin} - \text{DO essai}}{\text{DO témoin}} \times 100$$

DO témoin : absorbance du tube témoin négatif

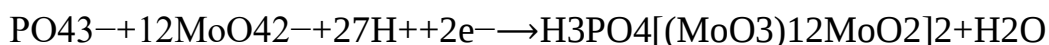
DO essai : absorbance du tube de l'essai

L'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait ou d'acide ascorbique utilisé nous a permis de déterminer les IC₅₀ en µg/ml.

III.2. Evaluation de la capacité antioxydante totale des extraits (Kumar et Hemerlather, 2011)

Principe :

Les phosphates en présence de molybdate d'ammonium en excès donnent un complexe phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PO}_4[(\text{MoO}_3)]_{12}$). En présence d'un réducteur, Ce complexe est réduit en un complexe phosphomolyb-2-molybdique ($\text{H}_3\text{PO}_4[(\text{MoO}_3)_{12}\text{MoO}_2]_2$) de couleur bleu qui absorbe à 695 nm.



Mode opératoire :

Dans chaque tube à essai nous avons introduit successivement : 50 µl de chaque extrait de coque de cacao 1ml d'acide sulfurique 0,6 M, 1050µl de phosphate de sodium 28 mM, 1050 µl de molybdate d'ammonium 4 mM. Les tubes ont été bouchés avec les billes et chauffés pendant 90 min puis refroidis sur un courant d'eau froide. L'absorbance du mélange de coloration bleue a été mesurée à 695 nm.

La capacité antioxydante totale des extraits exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique/mg d'extrait été déterminée à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe 3**).

IV. Détermination du potentiel anti-inflammatoire des extraits de coques de cacao

IV.1. Obtention des Macrophages

L'isolement des macrophages primaire de souris a commencé par leur élicitation par injection intra-péritonéale de 0,5 ml d'une solution d'amidon 2 % (agent inflammatoire) (**Titus et al., 1995**). Quatre jours après injection, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale. Par la suite, nous avons injecté à l'aide d'une seringue, 5 ml de tampon PBS (0.1 M, pH 7,4) chez la souris dans la cavité péritonéale de l'animal pour la collecte des macrophages. Après massage de la cavité abdominale, le tampon injecté est ensuite aspiré lentement. La solution obtenue contenant les macrophages a été introduite dans les tubes Falcon de 15 ml et conservée dans la glace. Le fluide obtenu a été centrifugé (3000 trs/min, 4°C, 10 min) et le surnageant éliminé. Le culot obtenu contenant les cellules a été récupéré. Les hématies ont été éliminées par choc osmotique (**Bansal, 1987**) en suspendant les cellules dans 1 ml d'une solution hypotonique de NaCl 0,05 M pendant 1 min. Ensuite, l'isotonicité a été rétablie par ajout de 1 ml de NaCl 0,25 M. Le mélange a été de nouveau centrifugé (3000 trs/min, 4°C, 10 min), et le

culot obtenu contenant en majorité les macrophages a été suspendu dans 2 mL de milieu de culture DMEM et maintenu dans la glace.

IV.2. Test au bleu trypan (Bansal, 1987)

Principe :

La molécule de bleu trypan a tendance à infiltrer les cellules. Une fois dans la cellule, son exclusion dans le milieu extracellulaire se fait par un mécanisme nécessitant de l'énergie. Seules les cellules possédant une source d'ATP sont capables de mettre en place un tel mécanisme. Ainsi, une cellule vivante expulsera la molécule de bleu trypan et apparaîtra brillante au microscope tandis qu'une cellule morte n'aura pas les moyens de la rejeter et restera bleue.

Mode opératoire :

Dans un tube Eppendorf de 1.5 ml, nous avons introduit successivement 25 µl de suspension cellulaire puis 225 µL de la solution de bleu trypan (0,2 % dans le NaCl 0,9%). Le mélange a été homogénéisé et 20 µL ont été introduits dans une cellule de Malassez et recouverts d'une lamelle. Les cellules ont enfin été observées au microscope optique (objectif : 40X) et comptées. La concentration des cellules/ml de milieu a été déterminée à l'aide de la formule ci-après.

$$N = n \times 100 \times 10^3 \times Fd$$

- **N** = nombre de macrophages par mL de milieu (cellules/mL)
- **n** = nombre de cellules comptées à l'aide des cellules de Malassez
- **Fd** = facteur de dilution

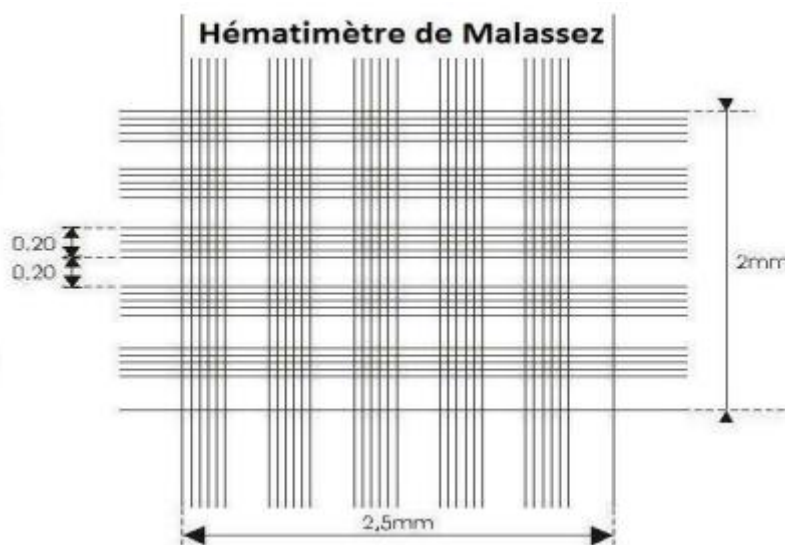


Figure 15: Hématimètre de malassez

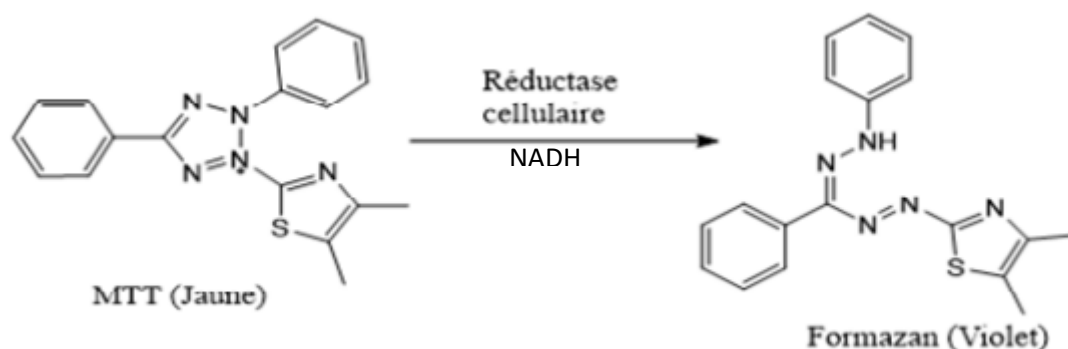
IV.3. Mise en incubation des macrophages

Après comptage des cellules par l'hématimètre de Malassez, les cellules ont été réparties dans différents puits à raison de 10^4 cellules/ml. En effet, dans les puits tests et témoins positifs, 150 μ L de cellules ont été introduit avec 50 μ L de *Saccharomyces cerevisiae* (250 μ g/ml) ; dans les puits du blanc 150 μ L de cellules ont été introduit avec 50 μ L de DMEM. La microplaque a été incubée pendant 1h à 37°C (5% de CO₂), puis 50 μ L d'extrait à différentes concentrations (0.1, 1, 10, 50 et 100 μ g/ml) ont été ajoutées dans les puits tests et 50 μ L de DMEM ont été ajouté dans les puits du témoin positif et 50 μ L de baicalin pour le standard. La microplaque a été de nouveau incubée pendant 3h à 37°C (5% de CO₂). Les surnageants ont été utilisés pour les tests des dosages de l'oxyde nitrique tandis que les culots ont été utilisés pour les tests de dosages de l'enzyme lipoxygénase.

IV.4. Test de viabilité des macrophages au 2-(4-iodophényl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phényl-2H-tétrazolium (Cedillorivera et al., 1992)

Principe :

Le MTT est un réactif utilisé pour évaluer l'activité des déshydrogénases NADH dépendantes. Cette enzyme est capable de réduire le sel de tétrazolium de couleur jaune en un produit formazan bleu violet qui absorbe avec un maximum à une longueur d'onde de 550 nm. Seules les cellules avec une mitochondrie fonctionnelle peuvent réduire le MTT.



Mode opératoire :

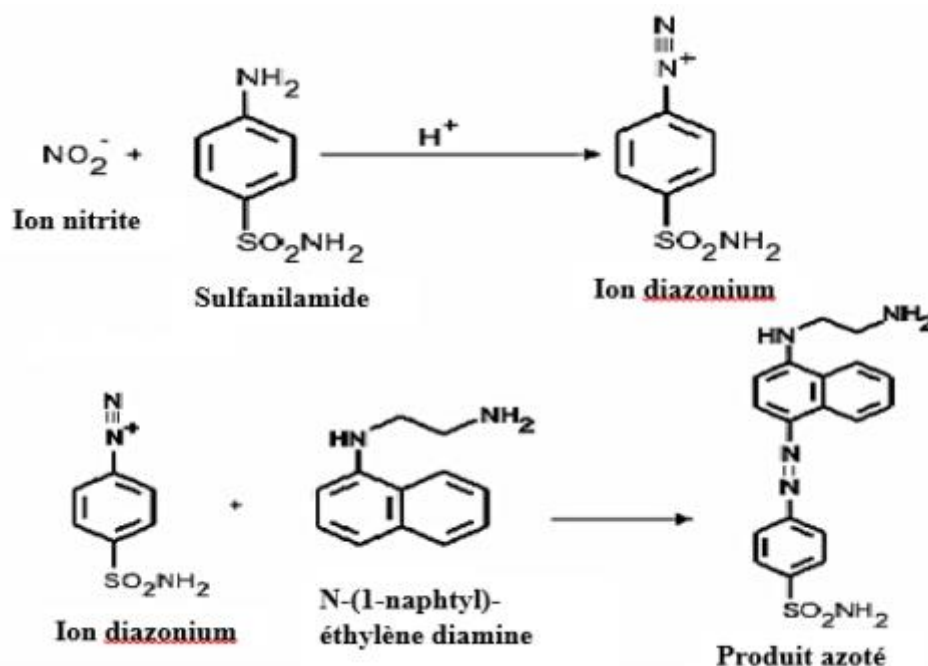
Le culot cellulaire issu des différentes incubations a été repris dans 100 μ L d'une solution d'INT (0,2 mg/ml dans le PBS) et le mélange a été incubé à 37°C pendant 1h 30 min, puis le surnageant a été éliminé et 100 μ L d'isopropanol acidifié ont été ajoutés dans chaque tube pour dissoudre les cristaux de formazan formés. Enfin, l'absorbance de la solution rose a été lue à 490 nm contre la solution d'isopropanol acidifié. Les pourcentages de viabilité cellulaire ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{témoin}}} \times 100$$

IV.5. Evaluation de l'effet des extraits de coques de cacao sur la production d'oxyde Nitrique par les macrophages (Sun *et al.*, 2003).

Principe :

Ce test repose sur la réaction de diazotation de Griess décrite en 1879. Le sulfanilamide et naphthyl éthylène diamine dihydrochloride (NED) compétissent pour le Nitrate dans la réaction acide. Au cours de la phagocytose, le monoxyde d'azote formé se complexe avec le réactif de Griess pour former un composé de coloration jaune qui absorbe à 550 nm.



Mode opératoire :

Les surnageants obtenus précédemment ont été utilisés. 100 μl de surnageant ont été mélangés avec 100 μl du réactif de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl éthylène diamine dihydrochloride dans 2.5% v/v d'acide phosphorique). Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min et l'absorbance a été mesurée à 550 nm. La quantité de nitrite est mesurée par rapport à la courbe standard de nitrate de sodium.

Le pourcentage d'inhibition de la production de l'oxyde nitrique a été calculé selon la formule.

$$\% \text{inhibition} = \frac{\text{DO témoin} - \text{DO essai}}{\text{DO témoin}} \times 100$$

IV.6. Evaluation de l'effet des extraits de coques de cacao et de sur l'activité de la 5-lipoxygénase (Yougbaré-Ziebrou *et al.*, 2015)

Principe :

La 5-lipoxygénase est l'une des enzymes majeures impliquées dans le processus inflammatoire de par sa catalyse de l'oxydation des lipides membranaires (acide arachidonique, acide linoléique) en vue de la production de médiateurs pro-inflammatoires, ceci

Mode opératoire :

La méthode a été utilisée avec quelques modifications comme suit. Dans chaque tube à essai, nous avons introduit successivement : 250 µL de L-tyrosine 1,5 mM, 500 µL de tampon phosphate (pH 6,8, 0,1 M). Après pré-incubation pendant 15 min à 37°C, nous avons ajouté 64 50 µL d'extrait de plante ou de la vitamine C (témoin positif) et 100 µL de solution enzymatique 31 unités/ml maintenue à 37°C. Les tubes blancs contenaient le tampon à la place de l'enzyme et les tubes témoins négatifs du DMSO (100%) à la place de l'extrait. L'ensemble a été incubé pendant 45 min à 25°C. La densité optique du mélange a été lue à 490 nm contre le blanc. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule.

$$\% \text{inhibition} = \frac{\text{DO témoin} - \text{DO essai}}{\text{DO témoin}} \times 10$$

VI. METHODE DE SELECTION DES MEILLEURS EXTRAITS

L'extrait a été sélectionné suivant les valeurs croissantes de la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) de leurs potentiels antioxydants, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse. Ensuite, un score a été calculé comme moyenne des rangs occupés par chaque extrait. L'extrait présentant globalement le plus petit score des activités biologiques évaluées a été retenue pour la formulation d'une crème exfoliante et d'un savon anti-acné.

VII. Essai de formulation d'une crème exfoliante et d'un savon anti-acné

L'extrait sélectionné comme plus antioxydant, anti-inflammatoire et anti- mélanogénèse ont été utilisés pour la préparation d'une crème exfoliante et savon anti-acné.

VII-1- Essai de formulation d'un crème exfoliante

Méthode

Dans un bol, mélangez 2 cuillères le sucre de canne et une cuillère de poudre de maïs pour former la base exfoliante. Ajoutez une cuillère d'huile de coco ou olive à la base exfoliante. Mélangez bien jusqu'à obtenir une texture homogène. Incorporez une cuillère par principe actif l'extrait FAE à la concentration 100µg/ml (voir **annexe 3** pour le choix de la concentration).

VII-2- Essai de formulation d'un savon anti-acné

Méthode

Mélanger 1kg de soude dans 2L d'eau distillée, puis laisser refroidir le mélange dans la glace pendant 1h. Ensuite, verser progressivement 0,5L de soude initialement préparé dans 1L d'huile de palme. Ajouter à tour de rôle 150mg de principe actif, la glycérine et le parfum.

VIII. Analyse des données

L'analyse statistique des valeurs obtenues a été réalisée à l'aide du logiciel Graphpad Prism 8.0.2. Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne $\pm$ écart-type et les différentes valeurs ont été comparées à l'aide du test d'analyse des variances « one-way ANOVA » suivi du test de comparaison multiple de Turkey et les différences ont été considérées comme significatives pour une p-value $p < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS

I. RENDEMENTS DE PREPARATION DES EXTRAITS

Au terme des préparations, les extraits ont été pesés et les rendements d'extractions calculés en rapportant la masse de chaque extrait (aqueux, éthanolique et hydro-éthanolique) obtenu à celle de la poudre de départ. Les valeurs obtenues sont présentées dans les tableaux... ci-dessous.

Tableau 3 : Rendements d'extraction

EXTRAITS	RENDEMENTS D'EXTRACTION (%)
TA	10,88
TE	5,67
TAE	8,36
FA	10,51
FE	6,11
FAE	7,8

T : Trinitario, F : Forastero, A : aqueux, E : éthanolique, AE : hydro-éthanolique.

Il en ressort de ce tableau que les extraits aqueux ont le meilleur rendement d'extraction que les extraits éthanoliques et hydro-éthanolique.

II. Criblage phytochimique et dosage des composés phenoliques et des flavonoïdes totaux

II.1. Criblage phytochimique

Tableau 4 : Résultats du screening phytochimique

EXTRAITS	TA	TE	TAE	FA	FE	FAE
COMPOSES PHENOLIQUES	+	+	+	+	+	+
FLAVONOÏDES	+	+	+	+	+	+
TANNINS	+	+	+	+	-	+
SAPONINES	+	+	+	+	+	+
COUMARINES	-	-	+	+	-	+
ANTHOCYANES	-	-	-	+	-	+
QUINONES	-	-	-	-	-	-
TERPENOÏDES	+	+	+	+	+	+

+ : présent ; - : absent

T : Trinitario, F : Forastero, A : aqueux, E : éthanolique, AE : hydro-éthanolique.

Ce tableau nous montre en effet que ces extraits contiennent de nombreux métabolites secondaires biologiquement actifs.

II.2. Taux de composés phénoliques totaux et des flavonoïdes des extraits de plante

Les composés phénoliques et les flavonoïdes étant des composés aux activités biologiques avérés, leurs taux ont été évalués dans les différents extraits de plantes et les résultats obtenus sont représenté sur la **Figure A (voir annexe 4)**.

De cette figure il en ressort que les taux de composés phénoliques et de flavonoïdes varient en fonction des extraits avec l'extrait **FAE** présentant les meilleures teneurs en ces composés.

III. Potentiels antioxydants des extraits

III.1. Potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique

Le potentiel antioxydant a été évaluée en déterminant l'effet des extraits sur les radicaux libres, les métaux et la peroxydation lipidique en utilisant les extraits aux concentrations finales de 0,1 ; 1 ; 10 et 100 et 1000µg/ml ; suivi du dosage des composés phénoliques et les flavonoïdes totaux.

La capacité des différents extraits de coques de cacao et de l'acide ascorbique à inhiber la peroxydation des lipides membranaires a été effective. Ces résultats sont représentés sur la **Figure B (voir annexe 4)**.

Cette figure montre que le potentiel inhibiteur des extraits et de l'acide ascorbique vis-à-vis de la peroxydation lipidique évolue de manière concentration dépendante. Cette tendance nous a permis de déterminer les CI_{50} représentés dans le tableau ci-dessous

Tableau 5 : CI_{50} de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique par les extraits de Coques de cacao.

EXTRAITS	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
TA	$53,1 \pm 0,93^{bcdefg}$
TE	$22,6 \pm 0,29^{acfg}$
TAE	$37,2 \pm 0,12^{abdefg}$
FA	$21,2 \pm 0,3^{acfg}$
FE	$22,2 \pm 0,21^{acfg}$
FAE	$6,7 \pm 0,07^{abcdeg}$
AA	$4,4 \pm 0,09^{abcde}$

Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$). *a,b,c,d,e,f,g* : différences significatives par rapport à TA,TE,TAE,FA,FE,FAE et AA (AA : acide ascorbique). *T* : Trinitario, *F* : Forastero, *A* : aqueux, *E* : éthanolique, *AE* : hydro-éthanolique.

Dans ce tableau, nous remarquons que l'extrait **FAE** présente la meilleure activité inhibitrice de la peroxydation lipidique de manière comparative au composé standard (acide ascorbique).

III.2. Capacité antioxydante totale

La détermination de la capacité antioxydante totale s'est faite par la méthode du phosphomolybdène, les résultats exprimés en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait de plante (mgEq AA/g d'extrait) **figure C (voir annexe 4)**.

Ce graphe montre la capacité antioxydante totale de ces extraits en (mgEq AA/g d'extrait) évaluée à travers la réduction du complexe phosphomolybdique. Ceci avec l'extrait **FAE** présentant la meilleure capacité.

IV. Potentiel anti-inflammatoire des extraits

IV.1. Obtention des macrophages et cytotoxicité des extraits sur la culture

IV.1.1. Isolement des macrophages

Les macrophages isolés ont été incubés et comptés en effectuant le test de viabilité cellulaire au bleu trypan, dont la viabilité moyenne était de 98.33%

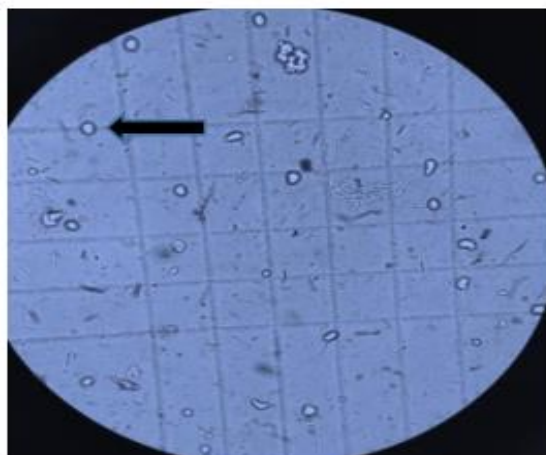


Figure 16: Photographie des macrophages observés sur une cellule de Malassez

IV.1.2. Cytotoxicité des extraits sur la culture primaire des macrophages au MTT

L'évaluation de la cytotoxicité des extraits sur les macrophages primaires a été faite au MTT (à différentes concentrations d'extraits) et les résultats suivants ont été obtenus :

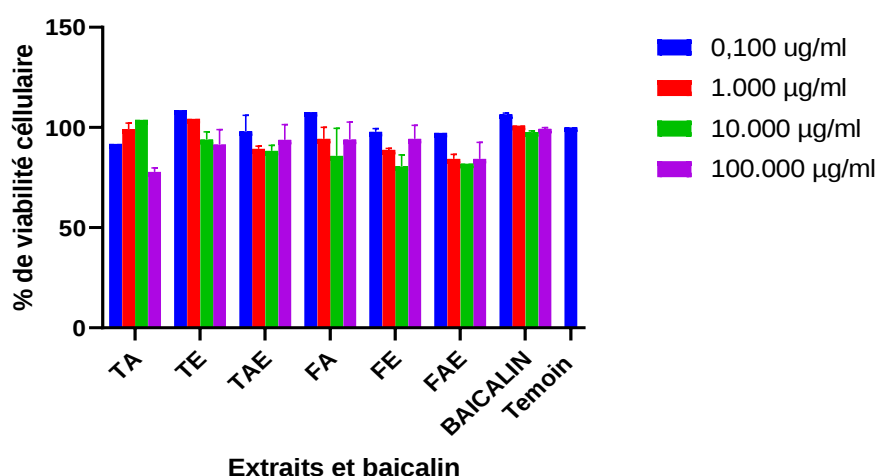


Figure 17 : Effet des composés sur la viabilité des macrophages

Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$). *T* : Trinitario, *F* : Forastero, *A* : aqueux, *E* : éthanolique, *AE* : hydro-éthanolique.

De cette figure il en ressort que les extraits aux différentes concentrations n'ont pas significativement affecté la viabilité des macrophages en culture.

IV.1.3. Effet des extraits de plante sur la production de l'oxyde Nitrique par les macrophages

Le potentiel inhibiteur des extraits à l'égard de la production de l'oxyde nitrique a été évalué sur les macrophages de souris activés par *saccharomyces cerevisiae*. La quantité de NO° a été mesurée suivant la réaction de diazotation de Griess et les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure D** (voir **annexe 4**).

On constate une baisse significative de la production de l'oxyde nitrique (NO°) par les macrophages activés en présence d'extraits par rapport au témoin.

Tableau 6 : CI₅₀ du potentiel inhibiteur des différents extraits sur la production du NO°.

EXTRAITS	CI ₅₀ (µg/ml)
TA	ND
TE	5,91±1,36 ^{bf}
TAE	11,93±2,1 ^{acdef}
FA	4,34±0,74 ^{bf}
FE	5,67±1,75 ^{bf}
FAE	4,31±1,43 ^{bf}
BAICALIN	0,12±0,02 ^{abcde}

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type (n=3). a,b,c,d,e,f : différences significatives par rapport à TE,TAE,FA,FE,FAE et baicalin. **T** : Trinitario, **F** : Forastero, **A** : aqueux, **E** : éthanolique, **AE** : hydro-éthanolique.

Ce tableau montre que les extraits **FA** et **FAE** présentent une meilleure activité inhibitrice de la synthèse de ce médiateur par rapport aux autres extraits.

IV.1.4. Effet des extraits de plantes sur l'activité de la 5-lipoxygénase de macrophages

L'activité inhibitrice des extraits de plantes sur la 5-lipoxygénase des macrophages de souris a été mesurée par oxydation de l'acide linoléique et les résultats sont représentés sur la **Figure E** (voir **annexe 4**).

Ainsi nous constatons une diminution de l'activité de cette enzyme en présence de nos extraits et de manière concentration dépendante. Le **tableau 7** nous présente les concentrations inhibitrice 50 (CI₅₀) de ces extraits sur l'activité de la 5-lipoxygénase.

Tableau 7 : CI_{50} du potentiel inhibiteur des différents extraits sur l'activité du 5-lipoxygenase.

EXTRAITS	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
TA	ND
TE	$3,93 \pm 0,38^{bef}$
TAE	$8,05 \pm 0,23^{acdef}$
FA	$2,09 \pm 0,59^{bef}$
FE	$2,29 \pm 0,17^{bef}$
FAE	$0,41 \pm 0,02^{abcd}$
BAICALIN	$0,71 \pm 0,15^{abcd}$

Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$). *a,b,c,d,e,f* : différences significatives par rapport à TE,TAE,FA,FE,FAE et baicalin. *b* : significativement moins actifs que le standard. *T* : Trinitario, *F* : Forastero, *A* : aqueux, *E* : éthanolique, *AE* : hydro-éthanolique ; *ND* : non déterminé

Ce tableau montre que l'extrait **FAE** présente une meilleure activité inhibitrice de la synthèse de ce médiateur par rapport aux autres extraits et au standard (baicalin).

V.1. Effet des extraits de plantes sur l'activité de la tyrosinase

L'activité inhibitrice des extraits de plantes sur la tyrosinase a été mesurée par oxydation de la L-tyrosine en dopaquinone et les résultats sont **Figure F** (voir **annexe 4**).

Ainsi nous constatons une diminution de l'activité de cette enzyme en présence de nos extraits et de manière concentration dépendante. Le **tableau 8** nous présente les concentrations inhibitrices 50 (CI_{50}) de ces extraits sur l'activité de la tyrosinase.

Tableau 8 : CI_{50} du potentiel inhibiteur des différents extraits sur la tyrosinase.

EXTRAITS	TA	TE	TAE	FA	FE	FAE	AA
CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	ND	$137,47 \pm 30,96^{bcd}$	ND	ND	$332,2 \pm 15,36^{acd}$	$53,85 \pm 7,76^{ab}$	$43,23 \pm 6,46^{ab}$

Les valeurs sont exprimées en moyennes $\pm$ écart-type ($n=3$). *a,b,c,d* : différences significatives par rapport à TE,FE,FAE et AA(acide ascorbique). *T* : Trinitario, *F* : Forastero, *A* : aqueux, *E* : éthanolique, *AE* : hydro-éthanolique, *ND* : non déterminé.

Ce tableau montre que l'extrait **FAE** présente une meilleure activité inhibitrice de la synthèse de ce médiateur par rapport aux autres extraits et comparativement au standard (acide ascorbique).

V. Méthode sélection du meilleur extrait

- ☐ Sélection du meilleur extrait antioxydant, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse

Tableau 9 : calcul des scores

EXTRAITS	TA	TE	TAE	FA	FE	FAE
MDA	6	4	5	2	3	1
NO	6	4	5	2	3	1
5-LOX	6	4	5	2	3	1
TYR	ND	2	ND	ND	2	1
Score	24	14	19	9	11	4

- ✓ L'extrait de *FORASTERO* obtenu par macération hydro-éthanolique (**FAE**) présente les meilleures propriétés antioxydantes, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse.

VI. Essai de formulation d'un gommage exfoliant et d'un savon anti-acné

1. Essai de formulation d'un gommage exfoliant et d'un savon anti-acné



Figure 18 : Crème exfoliante et savon anti-acné en cours de formulation.



Figure 19 : Crème exfoliante et savon anti-acné après formulation.

Le savon anti-acné formulé a les caractéristiques suivantes: moussant, odeur agréable, lavant et $\text{Ph} = 5,5$. La crème exfoliante a une texture pâteuse et un $\text{Ph} = 5$.

DISCUSSION

Il existe sur le marché des produits cosmétique une large gamme de produits pour les soins de la peau. Cependant, les problèmes liés à la surproduction et à l'accumulation de peau morte, en particulier l'acné demeurent majeurs et de l'ordre de la santé publique (Marie, 2021). La recherche des nouveaux ingrédients d'origine naturelle, avec une efficacité compétitive et des effets toxiques réduits, continue de connaître une forte croissance dans le monde (Cavinato et al., 2017). Dans le présent travail, nous nous sommes assignés comme objectif de rechercher l'extrait de coques de cacao présentant globalement la meilleure propriété antioxydante, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse pour un essai de formulation d'une crème exfoliante et d'un savon anti-acné. Tout d'abord, la préparation des différents extraits aqueux a été faite par décoction durant 30 minutes et celle des extraits éthanolique et hydro-éthanolique par macération durant 48h. Il ressort de ces préparations que les extraits aqueux présentent les rendements les plus élevés.

Par ailleurs, les antioxydants constituent une famille de substances susceptibles de neutraliser les ROS produits par les cellules de la peau (Sarr et al., 2015). L'effet antioxydant des extraits de ces plantes a été évalué par spectrophotométrie en utilisant le modèle d'inhibition de la peroxydation lipidique. Nous avons évalué l'activité inhibitrice de nos extraits sur la peroxydation lipidique induite par le peroxyde d'hydrogène. Il en est ressorti que l'inhibition de la peroxydation a été concentration dépendante pour tous les extraits, l'extrait de variété *Forastero* obtenu par macération hydro-éthanolique ($CI_{50} = 6,7 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$) a montré une inhibition plus efficace bien que significativement moins actif que l'acide ascorbique ($CI_{50} = 4,4 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$). Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus par FOTSOP (2023) qui avait démontré une activité inhibitrice de la peroxydation lipidique à partir des extraits éthanolique des écorces de *Harungana madagascariensis* ($CI_{50} = 25,15 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$). Ensuite la capacité antioxydante totale de nos extraits a été évaluée par la suite à travers la réduction du complexe phosphomolybdique avec une meilleure capacité pour l'extrait de *Forastero* obtenu par macération hydro-éthanolique ($23,003 \pm 0,44 \text{mgEq AA/g d'extrait}$). Ces résultats démontrent que l'extrait hydro-éthanolique de *Forastero* possède la meilleure capacité à réagir en cas de stress oxydatif. Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus par (Gbogbri, 2020) qui avait obtenu un potentiel antioxydant inférieur des poudres fèves de cacao fermentées et non fermentées de variété *Forastero*. Dans le but de pouvoir déterminer les familles de composés

biochimiques pouvant soutenir ces activités, nous avons réalisé les dosages des composés phénoliques totaux et des flavonoïdes, il en résulte que l'extrait macérât hydro-éthanolique de *Forastero* possède la meilleure teneur ($39,57 \pm 0,16 \text{ mgEq AG/g extrait}$) en composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes ($14 \pm 0,09 \text{ mgEq quercetine/g d'extrait}$). En effet, les composés phénoliques et flavonoïdes issus des plantes sont notamment responsable des activités antioxydantes et anti-inflammatoire des produits dermocosmétiques à base de plantes (Sahatpure et Daud, 2018).

L'inflammation joue un rôle important dans de nombreuses maladies, y compris les troubles cutanés et les macrophages sont des cellules clés impliquées dans la réponse inflammatoire.

Au cours du processus inflammatoire, une fois les macrophages activés, ils sont responsables de la production des médiateurs de l'inflammatoires (NO , $\text{TNF}\alpha$, $\text{Il-1}\beta$ / Il-4 , Il-6 , Il-10 , $\text{TGF}\beta$). Ceux-ci peuvent influencer la production ou l'inhibition de la production des EORs et des ENRs, par l'activation des voies enzymatiques (Lipoxygénases, cyclooxygénases). Tout cela est réalisé en vue d'éliminer un agent pathogène Ondua et al., (2018). L'oxyde nitrique (NO°) synthétisé par les cellules endothéliales et la 5-lipoxygénase (5-lox) produite par les leucocytes sont deux de ces molécules qui interviennent dans la cascade inflammatoire au niveau de la peau. Une surproduction de ces médiateurs peut entraîner des anomalies au niveau de la peau telles que des rougeurs, œdèmes, des lésions cutanées et une infiltration excessive de cellules immunitaires dans les tissus (Lin et al., 2017). C'est donc la raison pour laquelle nous avons évalué lors de ce travail l'effet des extraits de coques de cacao sur la production de ces deux éléments. Afin de déterminer la gamme de concentration non toxique de nos extraits, un test de cytotoxicité a été réalisé au préalable à l'aide du MTT. Il s'agit d'un sel de tétrazolium qui cible principalement l'effectivité du processus respiratoire à travers l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Il en ressort que les extraits aux différentes concentrations n'ont pas significativement affecté la viabilité des macrophages en culture. Nous avons constaté une baisse significative ($p < 0,05$) de la quantité de NO° produit par les macrophages par rapport au témoin et de manière concentration dépendante. L'oxyde nitrique est un médiateur pro-inflammatoire synthétisé par la NO synthétase à partir de l'arginine. Il est impliqué dans la vasodilatation des vaisseaux lors de la réaction inflammatoire et joue un rôle important dans le maintien de la fonction barrière de la peau (Julie et al., 2020) ; l'inhibition de sa synthèse est

donc un signe d'une activité anti-inflammatoire ; l'extrait de variété *Forastero* obtenu par macération hydro-éthanolique a ainsi montré la meilleure activité inhibitrice ($CI_{50} = 4,31 \pm 1,43 \mu\text{g}$ d'extrait/ml) bien qu'inférieure à celle du baicalin ($CE_{50} = 0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}$ d'extrait/ml). Ces résultats sont comparables à ceux obtenues par **FOTSOP (2023)** qui avait observés une diminution significative de la quantité de NO produit par des macrophages RAW 264.7 stimulés par le LPS en présence d'extrait décocté de *Psorospermum aurantiacum* ($CI_{50} = 4,33 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$)

Ensuite nous avons évalué l'effet des extraits sur l'activité de la 5-lipoxygénase. Cette enzyme qui permet la synthèse des leucotriènes (LTB₄) responsable du recrutement des cellules immunitaires au site de l'inflammation. Nous avons ainsi pu constater que l'extrait hydroéthanolique de *Forastero* inhibait et de manière concentration dépendante l'activité de la 5-lipoxygénase avec une ($CI_{50} = 0,41 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ d'extrait/ml) significativement plus actif que le baicalin ($CE_{50} = 0,71 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ d'extrait/ml). Ces résultats sont similaires à ceux de **Medoua et al., (2023)** qui avaient également obtenu une baisse significative de l'activité de la 5-lipoxygénase en présence du composé CAM231A101 phomopsinin B ($CI_{50} = 1,72 \pm 0,91 \mu\text{g/ml}$).

En fin nous avons évalué l'effet de nos extraits sur l'activité de la tyrosinase. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de la mélanine responsable de la coloration de la peau. Cependant son dysfonctionnement entraine une surproduction de la mélanine responsable d'une hyperpigmentation et l'accélération du vieillissement cutanée. Nous avons ainsi pu constater que l'extrait de *Forastero* hydro-éthanolique inhibait et de manière concentration dépendante la tyrosinase avec une ($CI_{50} = 53,85 \pm 7,76 \mu\text{g}$ d'extrait/ml) moins actif que l'acide ascorbique ($CI_{50} = 43,23 \pm 6,46 \mu\text{g}$ d'extrait/ml). L'inhibition de cette enzyme par cet extrait pourrait traduire leurs capacités à empêcher l'hyperpigmentation et d'autres troubles pigmentaires dues à une surproduction de cette enzyme. Ces résultats sont similaires à ceux de **Manjia et al., (2017)** qui avaient également obtenu une baisse significative de l'activité de la tyrosinase en présence des extraits de *Harungana madagascariensis*.

Au regard de ce qui précède l'extrait de *Forastero* obtenu par macération hydro-éthanolique a été sélectionnés comme le plus antioxydant, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse pour la formulation d'une crème exfoliante et d'un savon anti-acné PH= 5,5.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

L'objectif général de ce travail était de valoriser les coques de cacao en sélectionnant l'extrait de coques de cacao possédant la meilleure activité antioxydante, anti-inflammatoire ou anti-mélanogénèse pour un essai de formulation d'un produit exfoliant et d'un savon anti-acné. Il en résulte que :

- Les extraits de coques de cacao des variétés *Forastero* et *Trinitario* présentent de nombreux métabolites secondaires notamment les composés phénoliques ;
- L'extrait hydro-éthanolique de *Forastero* possède la meilleure propriété antioxydante à travers l'inhibition de la peroxydation lipidique. Ce même extrait possède les meilleures propriétés anti-inflammatoires à travers l'inhibition de l'activité de la 5-lipoxygénase, la production du NO°, puis anti-mélanogénèse à travers l'inhibition de la tyrosinase ;
- Cet extrait a permis de valoriser les coques de cacao en formulant une crème exfoliante et un savon anti-acné.

PERPECTIVES

Dans le but de mieux approfondir ces travaux, nous envisageons dans un avenir proche de :

- Evaluer les activités antioxydantes, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse des produits formulés ;
- Evaluer le potentiel anti-bactérien et la stabilité dans le temps des produits formulés ;
- Faire un fractionnement bioguidé des poudres de coques de cacao et identifier les molécules bioactives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Assaf, H., Adly, M. A., and Hussein, M. R. (2015).** "Aging and Intrinsic Aging: Pathogenesis and Manifestations," in Textbook of Aging Skin, eds. M. A. Farage, K. W Miller, and H. I. Maibach (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1–12.
2. **Bansal SK (1987).** Carbohydrate metabolism in the rat peritoneal macrophages. *Journal of Biological Sciences*. 12(1) : 415-42.
3. **Behalpage, S., & Gajbhiye, S. (2022).** *Article revue : soins de la peau avec processus d'exfoliation*. 12.
4. **Bouwstra, J. A., Nădăban, A., Bras, W., McCabe, C., Bunge, A., & Gooris, G. S. (2023).** The skin barrier: An extraordinary interface with an exceptional lipid organization. *Progress in Lipid Research*, 92, 101252.
5. **Carré, P. (2021).** About solvents used in the preparation of oils for cosmetic produits complying with the cosmos standard. *OCL (Oilseeds and fats Crops Lipids)* 28, 16.
6. **Cedillorivera, R., Ramirez, A., Munoz, O. (1992).** A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives Medical Research*. 23, 59-61.
7. **Chen, J., Liu, Y., Zhao, Z., & Qiu, J. (2021).** Oxidative stress in the skin : Impact and related protection. *International Journal of Cosmetic Science*, 43(5), 495-509.
8. **Chilicka, K., Gold, M. H., & Nowicka, D. (2023).** Acne vulgaris and the most popular and new cosmetological treatments. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 22(7), 1946-1950.
9. **Clatici VG, Racoceanu D, Dalle C, Voicu C, Tomas-Aragones L, Marron SE, Wollina U, Fica S. (2017).** **Perceived Age and Life Style: The Specific Contributions of Seven Factors Involved in Health and Beauty.** *Maedica (Bucur)*, 12(3):191-201.
10. **Dhar P, Tayade AB, Bajpai PK, Sharma VK, Das SK, Chaurasia OP, Srivastava RB, Singh SB (2012).** Antioxidant capacities and total polyphenol contents of hydroethanolic extract of phytococktail from Trans-Himalaya. *Journal of Food Science*, 77(2) : 156-161.
11. **Dixon SJ, Stockwell BR. (2014).** The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol*, 10(1):9-17.
12. **D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. (2013).** UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*, 14(6):12222-12248.

13. **Evon, L., Ghazaleh, A., Lucy A, S., Lydia F, C., Stefan A. Przyborski, Thomas von, Z and Satomi, M. (2021).** How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing ? *Ageing Research Reviews*. 71, 101456.
14. **Évora, A. S., Adams, M. J., Johnson, S. A., & Zhang, Z. (2021).** Corneocytes : Relationship between Structural and Biomechanical Properties. *Skin Pharmacology and Physiology*, 34(3), 146-161.
15. **Figueira A. (1993).** The use of cocoa pod husk as a source of natural colorants. *Food Chemistry*, 47(2):145-151.
16. **Fisal G. (2005).** Utilization of cocoa pod husk for activated carbon production. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 7(3):101-109.
17. **Fotsop, T.D. (2023).** Potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et anti-mélanogénèse de *Harungana madagascariensis* Lam. et *Psorospermum aurantiacum* Engl. Pour essai de formulation d'un lait corporel. Mémoire de Master. Université de Yaoundé 1, Cameroun.
18. **Gbogbri, G.-F. (2020).** Impact de la fermentation sur les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et immunomodulatrices du cacao. Thèse de doctorat. Université de Montpellier, France.
19. **Gómez-Juaristi, M. L., Bravo G.L.T., Vaquero, M. P., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J. (2011).** Beneficial effects of chocolate on cardiovascular health. *Nutr. Hosp.* 26, 289-292.
20. **Gopaulchan, D., Motilal, L. A., Bekele, F. L., Clause, S., Ariko, J. O., Ejang, H. P., & Umaharan, P. (2019).** Morphological and genetic diversity of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Uganda. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2), 361-375.
21. **Hirobe, T. (2024).** Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica sinica* 32, 200-204.
22. **Hong, C.-T., Wu, H.-C., Chiang, N.-N., Lee, C.-F., Huang, Y.-S., Wang, H.-Y., et al. (2017).** Inhibitory effect of burdock leaves on elastase and tyrosinase activity. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14, 3247–3252.
23. **Julie, R., Fabien, P., Chevalier, Berengere, F et Erone, L. (2020).** Vieillissement et intégrité de la peau: De la biologie cutanée aux stratégies anti-age. *Médecine/sciences* 36(12). 1155-1162.
24. **Kammeyer A, Luiten RM. (2015).** Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*, 21:16-29.

25. Karim, A. A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., & Abdullah, N. A. (2014). Propriétés antioxydantes des cabosses et des coques de cacao. *journal du cacao malaisien* 2, 1-12.
26. Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszevska, K., Adamus-Grabicka, A., & Karwowski, B. T. (2020). Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*, 12(5), 1501.
27. Khavkin, M. F., David ? A. F. Ellis, MD, FRCSC. (2011). Aging skin: Histology, Physiology, and Pathology, Elsevier Inc, 19: 229-234.
28. Kouotou, E. A., Adegbidi, H., Bene Belembe, R., Sieleunou, I., Nansseu, J. R., Kamga, J.-P., & Ndjitoyap Ndam, E. C. (2016). Acné au Cameroun : Qualité de vie et comorbidités psychiatriques. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 143(10), 601-606.
29. Kourouma, S., Gbery, I.P., Ecra, E. J., Sangaré, A., Kaloga, M., Kouassi, I. Y., et al. (2016). Dépigmentation cutanée cosmétique des femmes noires: résultats d'une enquete CAP aa abidjan (Côte d'ivoire). *Pan African Medical Journal* 24.
30. Kumar RB, Karmakar I, Dolai N, Bala A, Mazumder UK, Kar B (2011). Antioxydant and in in-vitro anti-inflammatory activities of *Mimusops elengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. P.976-980.
31. Laverdet, B., Girard, D., and Desmouliere, A. (2018). Physiology of the skin, cutaneous repair and stromal reaction. *Pharmaceutical News*. 581(57), 3-20.
32. Manja, N.j., Njyou, F. N., Apeksha J., Kapil, U., Kavita S., Ranjitsinh, D. V., and Moundipa, F. P. (2019). The anti-aging potential of medicinal plants in Cameroon – *Harungana madagascariensis* Lam. And *Psorospermum aurantiacum* Engl. Prevent in vitro ultraviolet B light-induced skin damage. *European Journal of Integrative Medecine*. 29, 100925.
33. Manosroi, A., Jantrawut, P., Akihisa, T., Manosroi, W., and Manosroi, J. (2010). In vitro anti-aging activities of *Terminalia chebula* gall extract. *Pharmaceutical Biology* 48, 469–481.
34. Matsui, T., & Amagai, M. (2015). Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International Immunology*, 27(6), 269-280.
35. Matsumoto, M., Suganuma, H., Shimizu, S., Hayashi, H., Sawada, K., Tokuda, I., Ihara, K., & Nakaji, S. (2020). Skin Carotenoid Level as an Alternative Marker of Serum

Total Carotenoid Concentration and Vegetable Intake Correlates with Biomarkers of Circulatory Diseases and Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 12(6), 1825.

36. **Manupriya, C., Azmi, K., and Madhu, G. (2020).** Skin Ageing : Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Current Aging Science*.13, 22-30.
37. **Medoua, M. L., Pechangou, N. S., Enang II. E. J. B., Assam Assam, J. P., Njoya, M. E., Njyou, F. N., and Moundipa, F. P. (2023).** Anti-inflammatory and antimicrobial potential of three naturel polyketides isolated from endophytic Fungus *Phomopsis* sp CAM212 againts to dysenteric causing pathogens. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 12(3): 8-21.
38. **Mias, C., Mengeaud, V., Bessou-Touya, S., Duplan, H., 2023.** Recent advances in understanding inflammatory acne: Deciphering the relationship between *Cutibacterium* acnes and Th17 inflammatory pathway. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 37, 3–11.
39. **Mossu G. (1990)** Le cacaoyer. L'amélioration des plantes tropicales. Montpellier, France.160p.
40. **Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Heath, M., & Lanaud, C. (2016a).** Cacao domestication II : Progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity*, 91(3), 322-330.
41. **Motamayor, J. C., Risterucci, A. M., Lopez, P. A., Ortiz, C. F., Moreno, A., & Lanaud, C. (2016b).** Cacao domestication I: The origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity*, 89(5), 380-386.
42. **Oddoye, O.K. E., Agyente-Badu Gyedu-Akoto, C.K. E (2013).** Cocoa and Its ByProducts: Identification and Utilization. In *Chocolate: in Health and Nutrition, Nutrition and Health*. Adrianne Bendich. Chapter 3, 23-37.
43. **Omar, S. S. S., Hadi, H., Mohd Hnif, N., Ahmad, H. M. A., Ng, S, F. (2021).** Lightening Effect of Skin Lightening Cream Containing Piper Betle L. Extract in Human Volunteers. *Cosmetics*. 8, 32.
44. **OMS (2014)** : Stratégie de l'OMS pour la Médecine Traditionnelle pour 2014-2023
45. **Premi S, Wallisch S, Mano CM, Weiner AB, Bacchiocchi A, Wakamatsu K, Bechara EJ, Halaban R, Douki T, Brash DE (2015).** Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*, 347(6224):842-847.

46. **Marie Baeck, 2021.** Cours de dermatologie - Dermatoses inflammatoires.
47. **Prabhavathi RM, Prasad MP, Jayaramu M (2016).** Studies on qualitative and quantitative phytochemical analysis of *Cissus quadrangularis*. *Advances in Applied Science Research*.7(4) : 11-17.
48. **Rachmin, I., Ostrowski, S. M., Weng, Q. Y., & Fisher, D. E. (2020).** Topical treatment strategies to manipulate human skin pigmentation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 153, 65-71.
49. **Sahatpure, N. S., and. Daud, F. S., (2018).** Anti-ageing Herbs-A Review. *International Journal of Scientific Development and Research*. 3, 51-61.
50. **Samuel D (2006).** The potential of cocoa pod gum as a binder in tablet formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32(8):891-898.
51. **Sánchez-Pellicer, P., Navarro-Moratalla, L., Núñez-Delegido, E., Ruzafa-Costas, B., AgüeraSantos, J., Navarro-López, V., 2022.** Acne, Microbiome, and Probiotics: The Gut-Skin Axis. *Microorganisms* 10, 1303.
52. **Sandmann, G. (2019).** Antioxidant Protection from UV- and Light-Stress Related to Carotenoid Structures. *Antioxidants*, 8(7), 219.
53. **Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., Ndiaye, B et Diop, Y. M. (2015).** Etude de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de vitex donoana (Verbenacea). *International Journal of biological and chemical sciences*. 9(3), 1263-1269.
54. **Savithramma N, Linga Rao M, Suhrulatha D (2011).** Screening of Medicinal plants for secondary metabolites. *MiddleEast Journal of science research*. 8 (3): 579-584.
55. **Schneider, M.R., and Paus, R. (2010).** Sebocytes, multifaceted epithelial cells: Lipid production and holocrine secretion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 181–185.
56. **Sharma, G., Shin, E.-J., Sharma, N., Nah, S.-Y., Mai, H. N., Nguyen, B. T., Jeong, J. H., Lei, X. G., & Kim, H.-C. (2021).** Glutathione peroxidase-1 and neuromodulation : Novel potentials of an old enzyme. *Food and Chemical Toxicology*, 148, 111945.
57. **Shin, J., Kim, Y. J., Kwon, O., Kim, N.-I., & Cho, Y. (2016).** Associations among plasma vitamin C, epidermal ceramide and clinical severity of atopic dermatitis. *Nutrition Research and Practice*, 10(4), 398.
58. **Sinha, P. K. (2023).** *Gommage aux agents exfoliants*. 5.

59. **Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H (2003).** Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. 3(1) : 276-284.
60. **Tobin, D. J. (2017).** Introduction to skin aging. Journal of Tissue Viability 26, 37–46.
61. **Tuchayi, S. M., Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., Dessinioti, C., Feldman, S. R., & Zouboulis, C. C. (2015).** Acne vulgaris. Nature Reviews Disease Primers, 1(1), 15029.
62. **Valacchi G, Sticozzi C, Belmonte G, Cervellati F, Demaude J, Chen N, Krol Y, Oresajo C (2015).** Vitamin C Compound Mixtures Prevent Ozone-Induced Oxidative Damage in Human Keratinocytes as Initial Assessment of Pollution Protection. PLoS One, 10(8):e0131097.
63. **Vriesmann LC, Amboni RDMC, Petkowicz CLO (2011).** Cocoa pod husks as a source of dietary fibers: Preparation and characterization. Food Research International, 44(7):2069-2076.
64. **Xiao-Yu S, Zhen-Y UW, Jian-Ren L (2009).** In vitro and vivo antioxidant activity of Pinus Koraiensis seed extracts containing phenolic Compound. Food Chemistry 117(1): 681-689.
65. **Yao, L., Hu, D.-N., Chen, M., & Li, S.-S. (2012).** Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced expression of interleukin-6 by epidermal melanocytes. Archives of Dermatological Research, 304(10), 831-838.
66. **Yougbaré-Ziebrou MN, Ouédraogo N, Lompo M, Bationo H, Yaro B, Gnoula C, Sawadogo WR, Guissou IP (2015).** Activités anti-inflammatoire, analgésiques et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de Saba senegalensis Pichon (Apocynaceae).
67. **Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014).** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev, 94(3):909-950.

ANNEXES

Annexe 1 : liste des équipements de laboratoire utilisé

- ❖ Incubateur à CO₂ 5% ; Hôte à flux laminaire (BBS-H1100) ;
- ❖ Centrifugeuse réfrigérée 5804R de marque Eppendorf ;
- ❖ Bain marie (UNITRONIC 320 OR) ;
- ❖ Microscope optique (OLYMPUS AXIOVERT 40C) ;
- ❖ Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-120-01 et GENESYS) ;
- ❖ Vortex (Karl Hecht KG VM4);
- ❖ pH-mètre ; Agitateur magnétique ; Balance à précision ; Chauffe ballon ; Bain marie ; Etuve (HP-AD070) ; Lecteur de plaque V230 ;
- ❖ Cellule de Malassez ; Tubes Eppendorf ; Tubes Falcon ; Tubes à essai ; micropipettes ; Filtre Nalgen (membrane 0,22µm) ;
- ❖ Trousse à dissection ; Portoirs ; Tubes à essai ; Bécher ; Ballon à fond rond ; Eprouvette ; Pissette ; Embouts.

Annexe 2 : Procédures de préparation des réactifs tests antioxydant, anti-inflammatoire et anti-tyrosinase

1. Etude des propriétés antioxydantes

1.1 Inhibition de la peroxydation lipidique

- Solution de NaCl 0,9% (p/v)
 - Peser 1,8 g de NaCl
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 200 ml.
- Solution de KCl 1,15% (p/v)
 - Peser 5,75 g de KCl
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
- Solution de TCA 15% (p/v)
 - Peser 15 g de TCA
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de TBA 0,67% (p/v)
 - Peser 0,67 g de TBA
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de FeCl₂ 0,5mM
 - Peser 0,2 g de FeCl₂

- Dissoudre dans l'eau distillée qsp 50 ml
- Solution de H_2O_2 0,5mM ($d = 1,11$, %w = 30%)
 - Prélever 161 μ l de H_2O_2
 - Diluer dans l'eau distillée qsp 50 ml

1.2 Dosage des polyphénols totaux

- Solution d'acide chlorogénique 2g/l
 - Peser 0,02 g d'acide chlorogénique
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 10 ml
- Solution de folin-ciocalteux 2 N
 - Prélever 10 ml du réactif de folin-ciocalteux
 - Diluer l'eau distillée qsp 100 ml
- Solution de Na_2CO_3 20% (p/v)
 - Peser 40 g de Na_2CO_3
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 200 ml

1.3 Dosages des flavonoïdes

- Solution de quercétine (étalon): $C_p = 10\mu\text{g/ml}$ et $V_f = 100$ ml
 - Peser 0,001g de Quercétine
 - Dissoudre dans le méthanol qsp 100 ml
- Solution d' $AlCl_3$ 2% (m/v): $V_f = 100$ ml
 - Peser 2g de $AlCl_3$
 - Dissoudre dans le méthanol qsp 100 ml

2. Etude des propriétés anti-inflammatoires

- Solution de tampon phosphate salin (PBS) 0,1 M pH 7,4
 - Peser 3,07g de Na_2HPO_4 , 0,75g de KH_2PO_4 , de 1,268g KCl et 0,54g NaCl
 - Mélanger les différents sels ci-dessus, dissoudre dans environ 180 ml d'eau distillée vérifier le pH à l'aide d'un pH mètre et compléter le volume à 250mL avec de l'eau distillée. Homogénéiser le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique
- Solution d'amidon pour élévation des macrophages

- Peser 0,1g d'amidon
- Dissoudre dans 5mL de PBS
- Solutions de NaCl pour la destruction des érythrocytes
 - ✓ **NaCl 0,05 M, (20mL)**
 - Peser 0,059g de NaCl
 - Dissoudre dans 20mL d'eau distillée
 - ✓ **NaCl 0.25 M (20ml)**
 - Peser 0,29g de NaCl
 - Dissoudre dans 20mL d'eau distillée
- Préparation du milieu de culture (DMEM : Dubelcco's Minimal Essential Medium)

La préparation du milieu de culture se fait dans un environnement aseptique. Pour créer une atmosphère de cette nature dans notre laboratoire, le milieu de culture a été préparé dans un environnement clos en présence des brûleurs de Bunsen.

Pour 1 litre du milieu de culture, on pèse 10g de poudre DMEM et 0,5g de NaHCO_3 . On dissout l'ensemble dans un peu d'eau distillée (300mL environ). On ajoute ensuite l'antibiotique Pénicilline de manière à obtenir les concentrations finales de 100UI/ml respectivement puis le volume est complété à 1 litre avec l'eau distillée et le mélange obtenu est aussitôt filtré sous une unité de filtration fonctionnant en présence d'une pompe à vide ou des unités de microfiltration. Le milieu est immédiatement aliquoté dans les tubes Falcon stériles de 50mL et conservé au frais à 4°C.

- Solutions de bleu Trypan pour coloration
 - ✓ Solution A (eau physiologique):
 - Peser 0,9g de NaCl
 - Dissoudre dans 100mL d'eau distillée qsp
 - ✓ Solution B
 - Peser 0,2g de bleu trypan
 - Dissoudre dans 100mL Solution A qsp
- Préparation de la suspension de levures *Saccharomyces cerevisiae* (5×10^7 cellules/ml) 250µg/ml
 - Peser 0,06g Levures (en poudre)

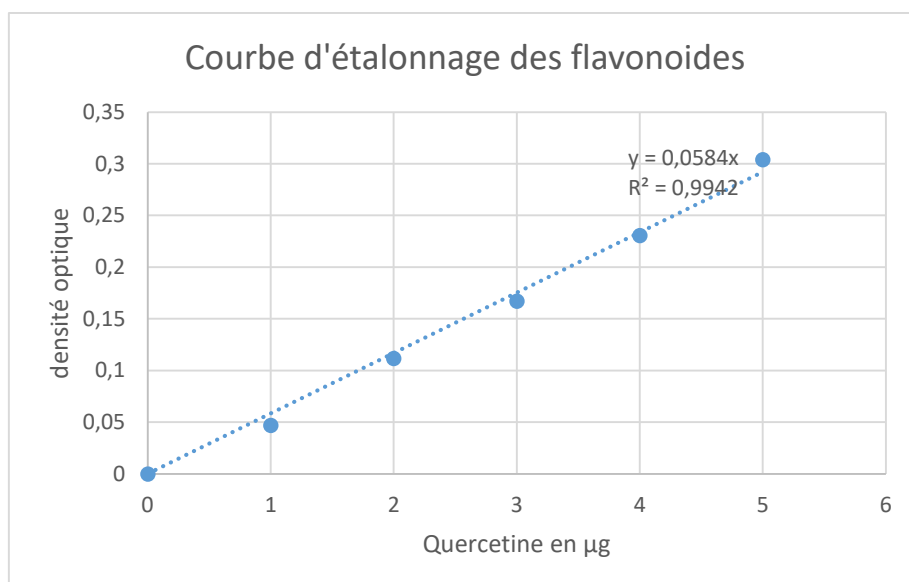
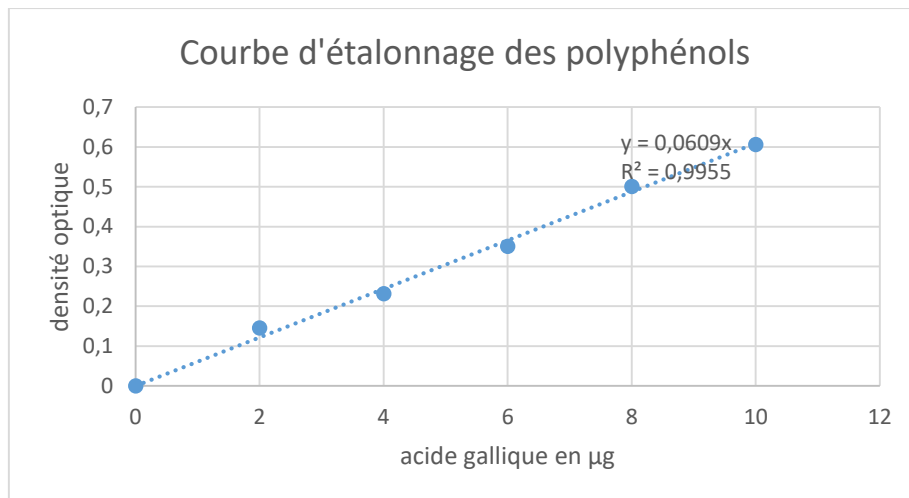
- Dissoudre dans 200mL d'eau distillée
- Solution de MTT
 - Peser 50mg de MTT
 - Dissoudre dans 100ml de PBS
- Solution d'isopropanol acidifiée
 - Prélever un volume de 299mL Isopropanol
 - Diluer dans 1ml de HCl concentré
- Solutions pour dosage de l'activité des NO
 - ✓ Solution de Griess
 - Solution A
 - Peser 0,05g de Naphtyléthylène diamine dihydrochloride
 - Dissoudre dans 50ml d'eau distillée
 - Solution B
 - Peser 0,5g de Sulphanylamide
 - Dissoudre dans 50mL de HPO₄ 2,5%
- Solution de Paranitrophenylphosphate (p-NPP) (10mM)
 - Peser 0,22g de p-NPP
 - Dissoudre dans 100mL d'eau distillée
- Solution étalon de nitrite 100μM ; V = 10 ml
 - Peser 0,69 mg de Nitrite de sodium
 - Dissoudre dans 100mL d'eau distillé
- Solution pour l'inhibition de la lipoxigénase
 - ✓ Solution d'acide linoléique 125μM
 - Prélever 3,895μL d'acide linoléique
 - Diluer dans 100mL de tampon borate 0,1M pH 9 (ajouter 4mL à 95% d'éthanol avant d'y mettre le tampon)
 - ✓ Tampon borate 0, 1 M
 - Peser 12,41g d'acide borique
 - Dissoudre dans 1L d'eau distillée

3. Inhibition de l'activité de la tyrosinase

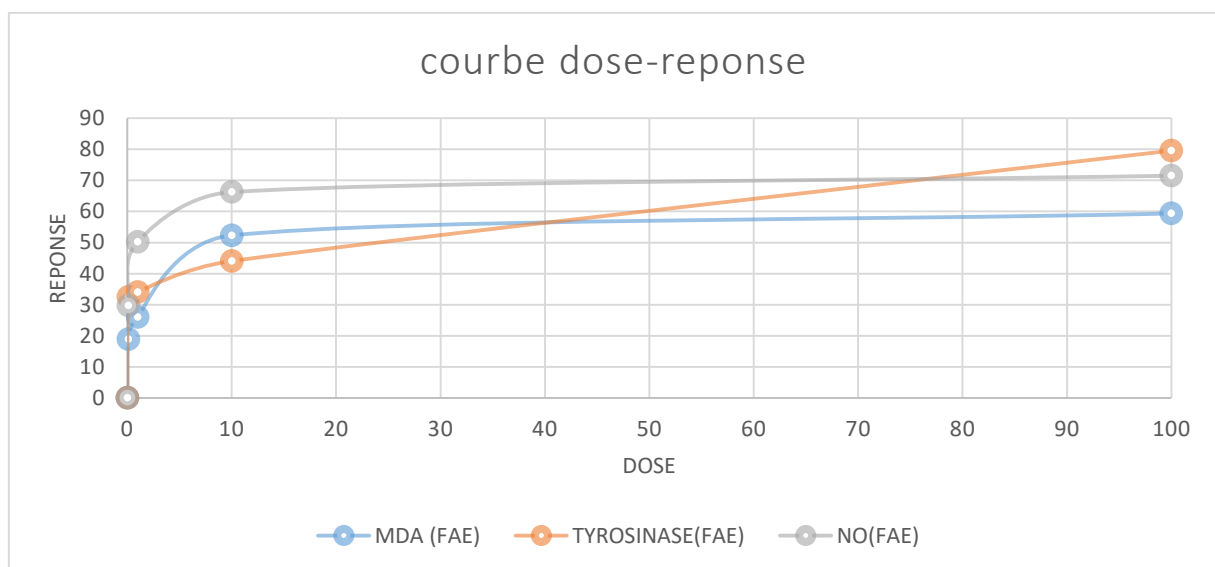
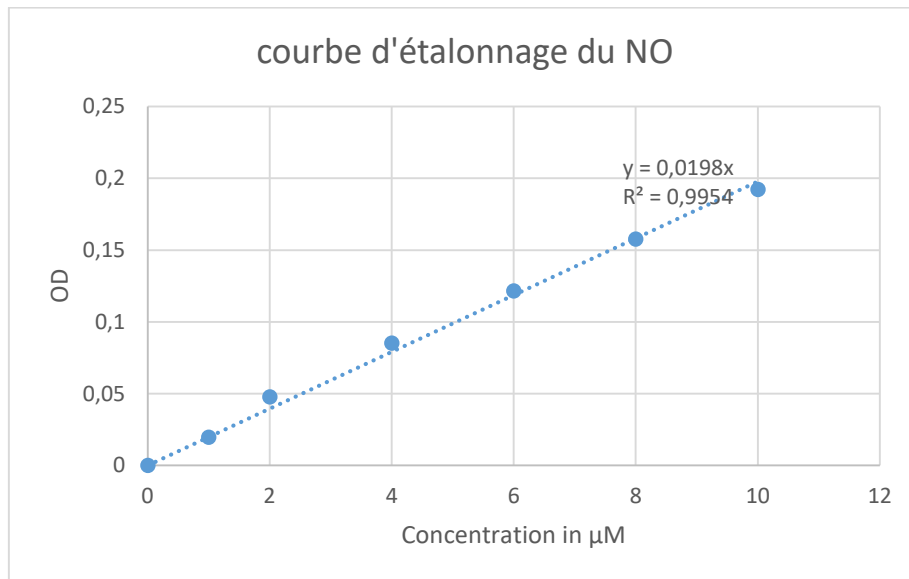
- Solution C : tampon phosphate (pH 6,8 ; 0,1M)

- ✓ Solution A
 - Peser 8,70 g de K_2HPO_4
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
- ✓ Solution B
 - Peser 6,65 g de KH_2PO_4
 - Dissoudre dans l'eau distillée qsp 500 ml
 - Titrer la solution A à l'aide de la solution B jusqu'au pH 6,8.
- Solution enzymatique (tyrosinase 31 U)
 - Introduire 1ml de solution C dans la boîte d'enzyme de 25000 U
 - Laisser dissoudre l'enzyme dans la glace pendant 45 min
 - Prélever 18 μ l de cette solution enzymatique
 - Diluer dans 1600 μ l de la solution C
- Solution de L-tyrosine 1,5 mM
 - Peser 50 mg de L-tyrosine
 - Dissoudre dans la solution C qsp 50 ml

Annexe 3 : Courbes d'étalonnage



VALORISATION DES COQUES DE CACAO PAR PRODUCTION D'EXTRAITS ANTIOXYDANTS, ANTI-INFLAMMATOIRE OU ANTI-MELANOGENESE POUR DES ESSAIS DE FORMULATION DE PRODUITS COSMETIQUES.



Annexe 4 : Graphes



Figure A : taux de composés phenoliques totaux et de flavonoides des extraits de plantes.

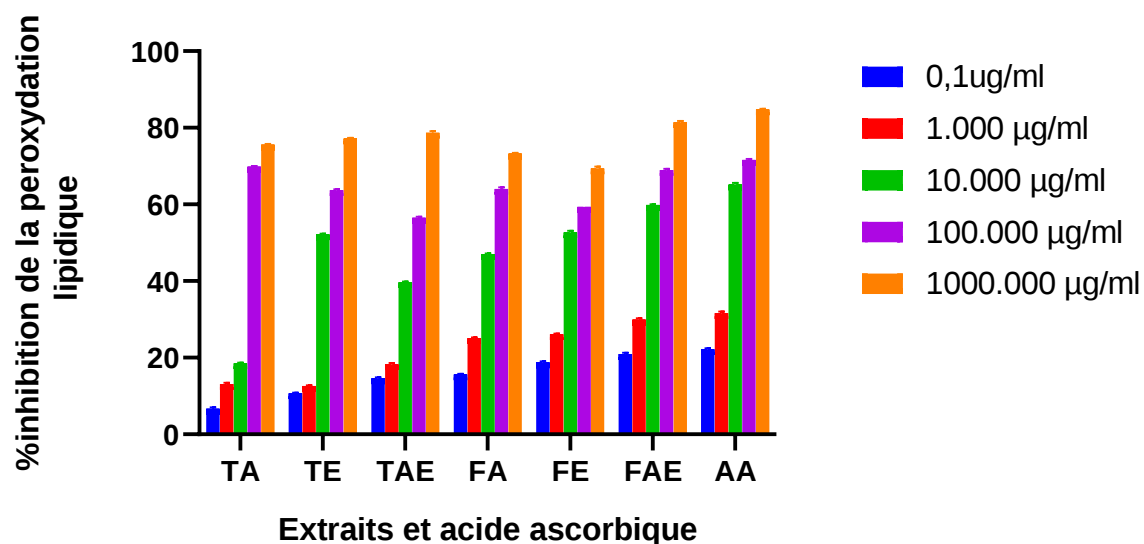


Figure B : Potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique.

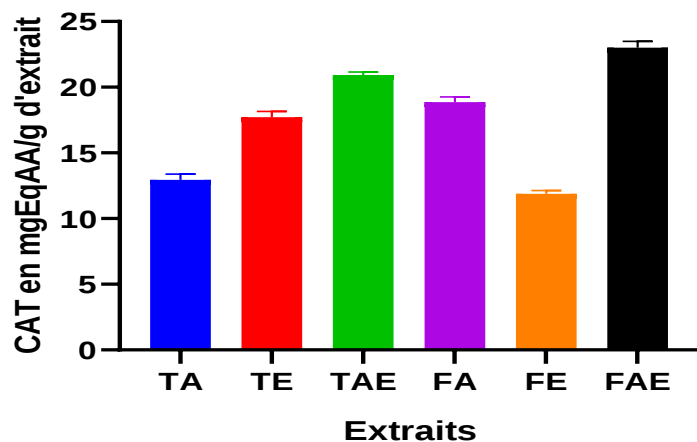


Figure C : capacite antioxydante totale des extraits de coques de cacao.

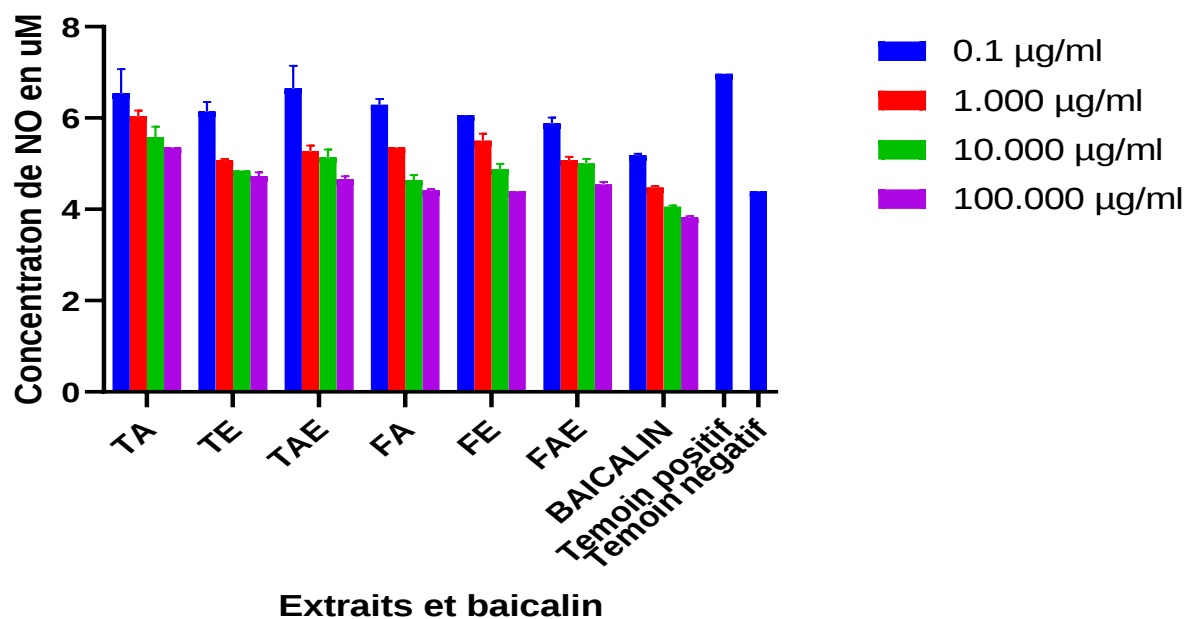


Figure D : Potentiel inhibiteur des differents extraits sur la production du NO°

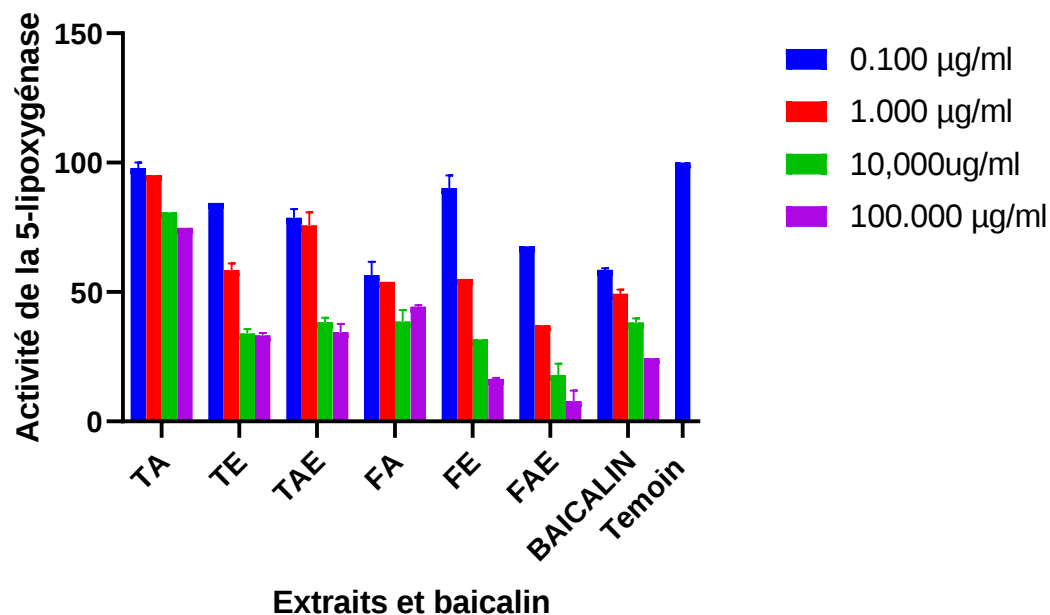


Figure E : Effet des extraits de coques de cacao sur l'activité de la 5-lipoxygénase.

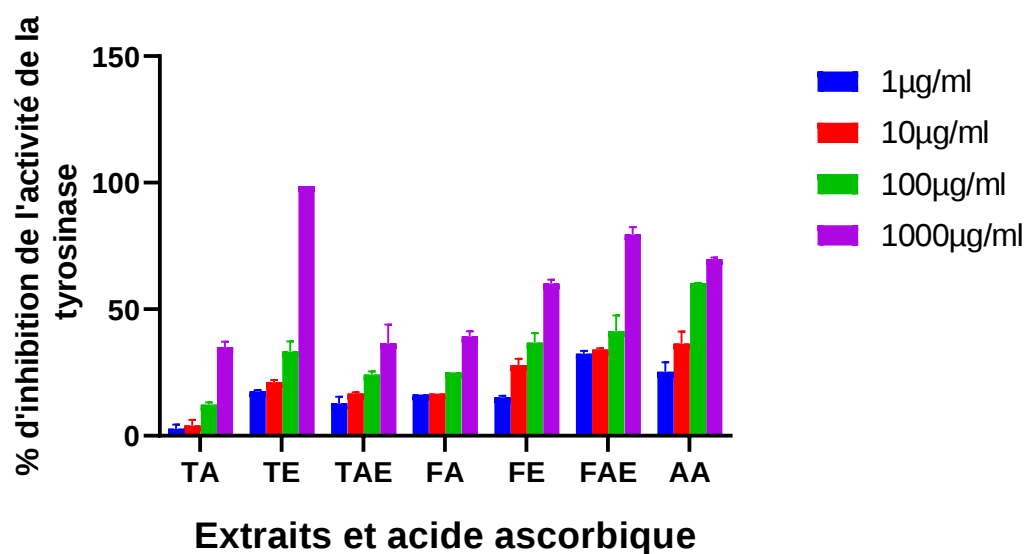


Figure F : Effet des extraits de coques de cacao sur l'activité de la tyrosinase.