

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS - MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

THESE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Filière : Sciences Agronomiques

OPTION : BIOTECHNOLOGIE VEGETALE

Présentée par Mme :

AMARI Nesrine Ouda

Etude Phytochimique, Potentiel Antioxydant et Activité
antifongique de *Thymelaea hirsuta* (Cas des dermatophytes)

Soutenu le :

Devant le Jury :

BOUDEROUA	Kaddour	Professeur	Président	Univ. Mostaganem
MEHDADI	Zoheir	Professeur	Examineur	Univ. Sidi Bel abbés
HEDDADJI	Miloud	Professeur	Examineur	Univ. Oran
BEKADA	Ahmed Mohammed Ali	Professeur	Examineur	C. Univ. Relizane
BERKANI	Abdellah	Professeur	Directeur de thèse	Univ. Mostaganem
BOUZOUINA	Mohammed	MC(b)	Co-directeur de thèse	Univ. Mostaganem

Année universitaire : 2014/2015

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse Mr BERKANI Abdellah Professeur à l'université de Mostaganem et le Docteur Bouzouina Mohamed co-directeur de thèse pour avoir accepté de m'encadrer et de me diriger, pour leurs soutiens, leurs encouragements ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont accordée en réalisant ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes Remerciements vont aussi à Mr Kaddour BOUDEROUA, Professeur à l'université de Mostaganem pour l'honneur qu'il m'a fait en présidant mon jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Messieurs Brahim LOTMANI, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Zoheir MEHDADI Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Sidi Belabès), HEDDADJI professeur à l'université d'Oran pour l'honneur qu'ils m'ont fait pour lire et juger mon travail.

Mes chaleureux remerciements vont au professeur Djebli Noredine pour son aide précieux

Mes remerciements :

Au Professeur Jean-Philippe BOUCHARA, qui m'a accepté et accueilli dans son laboratoire de parasitologie, mycologie du CHU d'Anger. Toute ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, ses encouragements, ses aides et toute sa sympathie dont j'ai bénéficié durant mon séjour.

Au Dr Anne LANDREAU. Merci pour votre disponibilité, vos conseils, vos encouragements et vos aides.

Mes remerciements à Julia, Gaëlle, Charlotte, les 2 Sarah, Anièce, Patrick, Maxim pour leurs gentilleses à mon égard lors de mon séjour à ANGERS.

Mes remerciements vont également au Docteur Elaffifi.

Je remercie tous le personnel de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rennes en France (Laboratoire physiologie, environnement et génétique pour l'animal et les systèmes d'élevage (PÉGASE), INRA de Rennes, France).

Au Professeur Patrick CHAIMBAULT, qui m'a accueilli dans son Laboratoire de Chimie et Physique – Approche Multiéchelle des Milieux Complexes (LCP-A2MC, Université de Lorraine-site de Metz) pour la préparation des échantillons. Toute ma gratitude pour son apport en phytochimie, ses suggestions, sa grande sympathie et tout le soutien dont j'ai bénéficié.

Au Dr Loïc pour son aide durant mon séjour à Metz.

Mes remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, je citerai Mrs Abdelkader SOUANE, Mohamed BELKHALOUA M'hamed, BELEBNA et Melle Nadia KETROUSSI.

Enfin, je voudrais rendre hommage à l'être le plus cher à mes yeux, celui qui sera éternellement à mes côtés : mon mari

Dédicaces

Je dédie ce travail,

✿ *A mes chers parents*

✿ *A mon époux*

✿ *A mes frères et sœurs*

✿ *A mes enfants.*

**TABLE DES
MATIÈRES**

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : <i>Thymelaea hirsuta</i>	4
I-1- Généralité.....	4
I-2- Description botanique.....	5
I-3- Biologie et Ecologie.....	7
I-4- Classification.....	7
I-4-1- Classification botanique.....	7
I-4-2- Classification phylogénétique.....	8
I-5- Composition chimique et utilisation.....	9
Chapitre II : Médecine traditionnelle	12
II-1-Historique.....	12
II-2- Définition.....	13
II-3- La phytothérapie.....	13
II-4- Les métabolites secondaires des plantes.....	13
II-4-1- Composés phénoliques.....	14
II-4-1--1- Flavonoïdes.....	14
II-4-1--2- Tannins.....	14
II-4-1--3- Acides phénoliques.....	15
II-4-1--4- Les coumarines.....	15
II-4-1--5- Quinones.....	15
II-4-2- Composés terpéniques.....	15
II-4-2-1- Stéroïdes, Stérols et Terpénoïdes.....	15
II-4-2-2- Saponosides.....	16
II-4-2-3- Huiles essentielles.....	16
II-5- Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires.....	16
Chapitre III: Les dermatophytes	18
III-1- Définition.....	18
III-2 Classification.....	18
III-2-1- Place dans la systématique.....	18
III-2-2- Morphologie.....	18

III-2-2-1- En vie parasitaire.....	18
III-2-2-2- En culture.....	19
III-3- Nutrition des dermatophytes.....	19
III-4- Origine et modalités de contamination.....	20
III-5- Les dermatophytoses.....	22
III-5-1- Les teignes et les sycosis.....	22
III-5-2- Les mycoses unguéales.....	22
III-5-3- Les dermatophytoses de la peau glabre.....	23
III-5-4- les dermatophytides.....	23
Chapitre IV : Les antioxydants.....	24
IV-1- Les radicaux libres.....	24
IV-1-1- Définition.....	24
IV-1-2- Principaux radicaux libres.....	24
IV-1-2-1- Anion -radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$).....	24
IV-1-2-2- peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2).....	24
IV-1-2-3- Radical hydroxyle (HO^{\bullet}).....	25
IV-1-2-4- Oxyde nitrique (NO^{\bullet}).....	25
IV-2- Le stress oxydatif.....	25
IV-2-1- Définition.....	25
IV-2-2- Origine du stress.....	25
IV-3- Définition d'un Antioxydant.....	26
IV-3-1- Mécanisme d'action.....	26
IV-3-2- Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action.....	26
IV-3-3- Classification des antioxydants suivant la nature chimique.....	27
IV-3-3-1- Les antioxydants naturels.....	28
IV-3-3-1-1- Les antioxydants enzymatiques.....	28
IV-3-3-1-1- a- Les superoxydes dismutases (SOD).....	28
IV-3-3-1-1- b- Les catalases.....	28
IV-3-3-1-1- c- Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX).....	28
IV-3-3-1-2- Les antioxydants non enzymatiques.....	28
Etude expérimentale	
Chapitre I: Matériel et méthodes.....	30

I-1- Matériels.....	30
I-1-1- Site et conditions d'échantillonnage.....	30
I-1-2- Drogue végétale.....	30
I-2- Méthodes.....	30
I-2-1- Préparation des extraits.....	30
I-2-2- Compositions chimiques.....	31
I-2-2-1- Screening phytochimique.....	31
I-2-2-1-1- Flavonoïdes.....	31
I-2-2-1-2- Stérols et triterpènes.....	32
I-2-2-1-3- Caroténoïdes.....	32
I-2-2-1-4- Tanins.....	32
I-2-2-1-5- Saponosides.....	33
I-2-2-1-6- Coumarines.....	33
I-2-2-1-7- Anthocyanes.....	33
I-2-2-1-8- Proanthocyanidols.....	33
I-2-2-1-9- Quinones.....	33
I-2-2-1-10- Mucilages.....	34
I-2-2-1-11- Oses et holosides.....	34
I-2-2-1-12- Composés réducteurs.....	34
I-2-2-1-13- Stupéfiants.....	34
I-2-2-1-14- Protéines.....	34
I-2-2-1-15- Hétérosides cardiotonique.....	35
I-2-2-1-16- Hétérosides cyanogénique.....	35
I-2-2-1-17- Dérivés anthracéniques.....	35
I-2-2-1-18- Alcaloïdes.....	36
I-2-2-2- Analyse phytochimique.....	37
I-2-2-2-1- Détermination des composés phénoliques totaux.....	37
I-2-2-2-2- Détermination des flavonoïdes totaux.....	37
I-2-2-2-3- Détermination des sucres totaux.....	38
I-2-2-2-4- Détermination des sucres réducteurs.....	38
I-2-2-2-5- Détermination des tanins condensés.....	38
I-2-2-2-6-Analyses chromatographiques.....	39
I-2-2-2-6-1- Chromatographie sur couche mince.....	39
I-2-2-2-6-2- Détermination des lipides.....	39

I-2-2-2-6-2-1- Extraction des lipides totaux.....	40
I-2-2-2-6-2-2- Détermination du profil des acides gras.....	40
I-2-2-2-6-3- Profilage par LC-MS et LC-MS/MS avec source Electrospray (ESI).....	41
I-2-3-Activités biologiques.....	43
I-2-3-1- Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante.....	43
I-2-3-1-1- Test du piégeage des radicaux DPPH.....	43
I-2-3-1-2- Test du piégeage des radicaux ABTS ⁺	44
I-2-3-1-3- Test de la réduction de fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	45
I-2-3-2- Evaluation, <i>in vitro</i> , de l'activité antifongique.....	45
I-2-3-2-1- Microorganismes utilisés et conditions de culture.....	45
I-2-3-2-2- Test de microdilution.....	46
I-2-3-2-2-1- Préparation des suspensions de spores.....	46
I-2-3-2-2-2- Préparation et ensemencement du milieu de culture liquide.....	46
I-2-3-2-2-3- Evaluation de l'activité antifongique.....	47
I-2-3-2-3- Concentration fongicide minimale.....	47
I-2-4- Analyses statistiques.....	47
Chapitre II: Résultats et discussion.....	49
II-1- Analyse quantitative.....	49
II-1-1- Composés phénoliques totaux.....	49
II-1-2- Flavonoïdes totaux.....	51
II-1-3- Tanins condensés.....	51
II-1-4- Sucres totaux.....	54
II-1-5- Sucres réducteurs.....	54
II-1-6- Lipides.....	57
II-1-6-1- Lipides totaux.....	57
II-1-6-2- Détermination du profil des acides gras.....	57
II-2- Analyse qualitative des extraits du <i>Thymelaea hirsuta</i>	61
II-2-1- Screening phytochimique.....	61
II-2-2- Analyses chromatographiques.....	64
II-2-2-1- Chromatographie sur couche mince.....	64
II-2-2-2- Profilage par LC-MS et LC-MS/MS avec source Electrospray (ESI).....	67
Activités biologiques.....	87
II-3- Activité antifongique.....	87
II-3-1- Taux d'inhibition.....	87

II-3-1-1- <i>Microsporium audouinii</i>	87
II-3-1-1-1- Extrait aqueux de fleurs.....	87
II-3-1-1-2- Extrait aqueux de feuilles.....	87
II-3-1-1-3- Extrait aqueux de brindilles.....	89
II-3-1-1-4- Voriconazole.....	89
II-3-1-2- <i>Trichophyton rubrum</i>	89
II-3-1-2-1- Extrait aqueux de fleurs.....	89
II-3-1-2-2- Extrait aqueux de feuilles.....	92
II-3-1-2-3- Extrait aqueux de brindilles.....	92
II-3-1-2-4- Voriconazole.....	92
II-3-2- Concentrations inhibitrices 80.....	94
II-3-3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	94
II-3-4- Concentrations minimales fongicides (CMF).....	95
II-4- Activité antioxydante	100
Conclusion.....	106
Références bibliographiques.....	109
Annexes	

**LISTE DES
ABRÉVIATIONS**

-----Liste des abréviations-----

°C	: Degré Celsius
E	: Est
g	: Gramme
IC	: Concentration inhibitrice
J.C	: Jésus-Christ
N	: Nord
O.M.S	: Organisation mondiale de la santé
U.V	: Ultra- violet
T°	: Température
µg	: Microgramme
µl	: Microlitre
L	: Litre
mg	: Milligramme
ml	: Millilitre
M	: molaire
mM	: millimole
µmol/l	: micromole par litre
RPMI	: Roswell Park Memory Institute
%	: Pourcentage
AGMI	: Acide gras monoinsaturé
AGPI	: Acide gras polyinsaturé
AlCl ₃	: Chlorure d'aluminium
AQ	: Anthraquinone
DPPH	: 2.2 diphényle-1-picrylhydrazyl
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
mg EQ/g	: milligrammes équivalent quercétine par gramme d'extrait lyophilisat
mg EMA/g	: milligramme équivalent maltose par gramme d'extrait de lyophilisat
mg EAG/g	: milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait lyophilisat
mg EC/g	: milligrammes équivalent catéchine par gramme d'extrait de lyophilisat
% LT	: pourcentage des lipides totaux
AG	: Acide gras
CPG	: Chromatographie phase gazeuse
BF ₃	: trifluorure de bore
ESI	: Electrospray Ionisation
ACN	: acétonitrile
Fe ²⁺	: Ions ferreux
Fe ³⁺	: Ions ferriques
FeCl ₃	: Chlorure de fer
nm	: nanomètre
N	: Normalité
KOH	: Potasse
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
g	: Gramme
H ₂ O	: Eau distillée
H ₂ O ₂	: Le peroxyde d'hydrogène
HO [•]	: Le radical hydroxyle
NH ₄ OH	: Ammoniaque
O ₂	: Oxygène moléculaire
O ₂ ⁻	: Le radical superoxyde

OH	: Hydroxyle
RO	: Le radical alkoxyde
ROO[•]	: Le radical peroxyde
ROOH	: Peroxyde alkyle
SOD	: Superoxyde dismutase
UV	: Ultra-violet
Fe	: feuille
FL	: fleur
Br	: brindille
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CMF	: Concentration minimale fongicide
HCl	: Acide chloridrique
Min	: minute
%	: Pourcentage
MOPS	: acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
ABTS	: 2, 2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid]
CCM	: Chromatographie sur couche mince
GAE	: Equivalent d'acide gallique
H₂SO₄	: Acide sulfurique
TPTZ	: 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine
A	: Absorbance
%I	: Pourcentage d'inhibition

LISTE DES FIGURES

-----Liste des figures-----

Figure 1 : Répartition géographique des <i>Thymelaea</i> . La ligne pointillée indique la limite approximative de l'espèce annuelle <i>T. hirsuta</i> (nord et est).....	4
Figure 2 : Teneurs des extraits aqueux de <i>T. hirsuta</i> en composés phénoliques totaux (Fleurs, = Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....	50
Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	50
Figure 4 : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits aqueux de <i>T. hirsuta</i> (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....	52
Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	52
Figure 6 : Teneurs en tanins condensés des extraits aqueux de <i>T. hirsuta</i> (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....	53
Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	53
Figure 8 : Teneurs en sucres totaux des extraits aqueux de <i>T. hirsuta</i> (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....	55
Figure 9 : Courbe d'étalonnage du maltose.....	55
Figure 10 : Teneurs en sucres réducteurs des extraits aqueux de <i>T. hirsuta</i> (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....	56
Figure 11 : Courbe d'étalonnage du maltose.....	56
Figure 12 : Pourcentage des lipides totaux dans les organes aériens de <i>Thymelaea hirsuta</i> ( = Fleurs,  = Feuilles et  = Brindilles).....	60
Figure 13 : Distribution des acides gras en % (AGS = Acides gras saturés, AGM = Acides gras monoinsaturés, AGPI = Acides gras polyinsaturés, n-3 = Oméga3 et n-6 = Oméga6) dans les organes aériens de <i>Thymelaea hirsuta</i> ( = Fleurs,  = Feuilles et  = Brindilles).....	60
Figure 14 : Chromatographie sur couche mince des extraits aqueux de feuilles, fleurs et brindilles de <i>Thymelaea hirsuta</i> (A = révélation par le Neu et B = révélation physique sous UV à 254nm). Q : Quercétine, Fln : Flavone, Fnone : Flavanone, Fe : feuilles, Br : Brindilles, Fl : Fleurs.....	66

- Figure 15 :** Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 593 [M-H]⁻ détecté à 4,93 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de Vicenine-2..... 82
- Figure 16 :** Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 191 [M-H]⁻ détecté à 21,94 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de la Scopolétine.....82
- Figure 17:** Spectre de masse en mode positif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 603 [M+H]⁺ détecté à 9,44 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de la genkwadaphnine..... 83
- Figure 18 :** Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 321 [M-H]⁻ détecté à 23,46 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de l'Edgeworine.....83
- Figure 19 :** Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 657 [M-H]⁻ détecté à 13,13 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de la Rutarensine.....85
- Figure 20 :** Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 417 [M-H]⁻ détecté à 13,19 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de Syringarésinol.....85
- Figure 21 :** Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux des fleurs de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, P<0,05).....88
- Figure 22:** Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux des feuilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, P<0,05)..... 88
- Figure 23:** Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux des brindilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, P<0,05).....90
- Figure 24:** Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité au voriconazole. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, P<0,05).....90
- Figure 25:** Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité à l'extrait aqueux des fleurs de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, P<0,05).....91
- Figure 26:** Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité à l'extrait aqueux des feuilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, P<0,05).....91

Figure 27: Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité à l'extrait aqueux des brindilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....93

Figure 28: Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité au voriconazole. Moyennes suivies de lettres différentes différent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).....93

**LISTE DES
TABLEAUX**

-----Liste des tableaux-----

Tableau 1 : Composition chimique de <i>Thymelaea hirsuta</i>	11
Tableau 2 : Pourcentages des principaux acides gras recensés chez <i>Thymelaea hirsuta</i>	58
Tableau 3 : Profil des acides gras dans les différentes parties de <i>Thymelaea hirsuta</i>	59
Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques des fleurs, feuilles et brindilles de <i>Thymelaea hirsuta</i>	62
Tableau 5 : Rapports frontaux après révélation chimique sous UV à 254nm.....	65
Tableau 6 : Chromatographie sur couche mince des principaux composés phénoliques révélés par le réactif de NEU sous UV 365nm.....	65
Tableau 7 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux de fleur de <i>Thymelaea hirsuta</i> en mode positif et négatif. Tr : temps de rétention. Ref : référence dans laquelle a été trouvée la fragmentation des composés proposés.....	68
Tableau 8 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux de feuille de <i>Thymelaea hirsuta</i> en mode positif et négatif. Tr : temps de rétention. Ref : référence dans laquelle a été trouvée la fragmentation des composés proposés.....	72
Tableau 9 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux de brindilles de <i>Thymelaea hirsuta</i> en mode positif et négatif. Tr : temps de rétention. Réf. : références dans laquelle a été trouvée la fragmentation des composés proposés.....	76
Tableau 10 : IC ₈₀ en µg/ml des extraits de feuilles, fleurs et brindilles de <i>Thymelaea hirsuta</i> et de voriconazole vis-à-vis de <i>Microsporium audouinii</i> et <i>Trichophyton rubrum</i>	96

Tableau 11 : CMI₁₀₀ en µg/ml des extraits des feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta* vis-à-vis de *Microsporum audouinii* et *Trichophyton rubrum*.....96

Tableau 12: Activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en µg/ml de des extraits de feuille, fleur et brindille de *Thymelaea hirsuta* sur *Microsporum audouinii* et *Trichophyton rubrum*.....96

**LISTE DES
PLANCHES**

-----Liste des planches-----

- Planche 1 :** *Thymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher (Photos originales). **A-** feuilles cotonneuses. **B-** fleurs mâles. **C-** fleurs femelles.....6
- Planche 2 :** (Fromage et al., 2010). **A -** *Microsporium audouinii* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B -** *Microsporium audouinii* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso).....21
- Planche 3 :** (Chabasse et al., 2004). **A -** *Trichophyton rubrum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B -** *Trichophyton rubrum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso).....21
- Planche 4 :** **A =** Vue général d'un arbuste de *Thymelaea hirsutra*, **B =** Vue générale de la zone d'échantillonnage.....30
- Planche 5 :** **A :** photo des filaments de *Microsporium audouinii* sans traitement, **B :** photo (original) des filaments tordus de *Microsporium audouinii* traité (sous un microscope inversé).....97

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Alopécie : chute partielle ou totale des cheveux et des poils.

Alterne : feuilles alternes, insérées isolément sur chaque nœud de la tige et à des hauteurs différentes.

Ascomycète : champignon à thalle levuriforme ou septé dont la reproduction sexuée est de manière endogène par production d'ascospores à l'intérieur d'un asque.

Ascospore : spore sexuée produite de manière endogène à l'intérieur d'un asque et caractéristique des ascomycètes.

Autotrophe : organisme qui élabore sa matière organique à partir de composés inorganiques simples.

Bractée : feuille généralement atrophiée située à la base d'une fleur.

Caduc : adjectif qualifiant le feuillage, mais aussi les pièces florales qui tombent à la fin de leur fonction.

Capitule : inflorescence formée de petites fleurs serrées les unes contre les autres, regroupées sur un réceptacle.

Chimiotaxonomie : classification des plantes selon leurs structures, leurs morphologies et leurs compositions chimiques.

Cicatrisant : qui aide à la fermeture des plaies et des lésions.

Chlamydospore : spore asexuée d'un champignon, à paroi épaisse, ne se détachant pas du mycélium.

Conidie : spore assurant la multiplication asexuée des champignons et non capable de mobilité autonome.

Conidiogénèse : ensemble des mécanismes intervenant dans la production des spores asexuées ou conidies.

Corémie : regroupement de plusieurs conidiophores en faisceau agglomérés en mèches, qui fructifient à leur partie apicale.

Cotylédon : ébauche des premières feuilles déjà formées qui apparaissent à la germination.

Décoction : méthode d'extraction des principes actifs d'une préparation généralement végétale par dissolution dans l'eau bouillante.

Dicotylédone : plante issue de la germination d'une graine disposant de deux cotylédons.

Dioïque : plante possédant des fleurs mâles, à étamines et des fleurs femelles, à carpelles, sur des pieds différents.

Eczéma : maladie chronique allergique ou infectieuse de la peau, caractérisée par des lésions consistant en squames couvertes de boutons séreux provoquant des démangeaisons.

Endospore : spore interne, produite à l'intérieur d'une structure fermée.

Entomogame : qualifie un mode de reproduction des plantes dans lequel le pollen est essentiellement véhiculé par des insectes.

Eparse : disposé en divers endroits, dans le désordre (feuilles éparses).

Erythème: congestion cutanée qui donne lieu à une rougeur de la peau.

Filamenteux : qualificatif courant en mycologie pour désigner les champignons qui produisent des filaments par rapport aux levures ou thalle unicellulaire.

Fongicide: matière active ou produit formulé ayant la propriété de tuer les champignons.

Fongistatique : qui inhibe la croissance du champignon sans détruire celui-ci.

Fongitoxique : ou antifongique, substance toxique pour les champignons.

Fusiforme : en forme de fuseau, c'est-à-dire renflé au centre et effilé à chaque extrémité.

Glabre : plante sans poils ni cils.

Hallucinogène : substance chimique psychotrope qui induit des hallucinations, soit, aux doses usuelles, des altérations des perceptions, de la cohérence de la pensée et de la régularité de l'humeur, mais sans confusion mentale persistante ou troubles de la mémoire.

Hermaphrodite : fleur porteuse des deux sexes, mâles et femelles.

Herpès : affection virale cutanée contagieuse, caractérisée par une éruption de vésicules.

Hyphe : (filament mycélien) structure élémentaire du thalle des champignons filamenteux, d'aspect tubulaire septé ou non.

Inflammation : réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à un organisme.

Intertrigo: infection siégeant aux plis de la peau.

Kératine : scléroprotéine complexe, soufrée, de consistance dure, imperméable très répandue dans le monde animal et parfois présent dans la paroi de certains champignons. Chez l'homme, la kératine est abondante dans l'épiderme et les phanères.

Lyophilisation : dessiccation, déshydratation par sublimation opérée à très basse température et sous vide.

Métabolites secondaires : ce sont des substances qui n'interviennent pas directement dans les grandes fonctions des végétaux, mais plutôt interviennent dans le développement des plantes par les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction.

Monoïque : végétal portant sur le même pied des fleurs mâles et des fleurs femelles.

Mycélium : ensemble des hyphes constitutifs de l'appareil végétatif des champignons.

Mycose: maladie causée par un champignon.

Onychomycose : infection des ongles causée par un champignon.

Onyxis: inflammation d'un ongle.

Pédoncule : petite ramification de la tige se terminant par une fleur.

Périanthe : ensemble des enveloppes florales, calice et corolle.

Périonyxis : inflammation des replis périunguéraux.

Phytochimie : (chimie des végétaux) ; science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes.

Piriforme : qui a la forme d'une poire.

Principe actif : molécule qui dans un médicament possède un effet thérapeutique.

Psoriasis: maladie eczémateuse chronique de la peau formant des plaques rouges couvertes de squames.

Purgatif : substance qui facilite le transit intestinal et l'évacuation des selles.

Septé : cloison interne, radiale et verticale.

Sessile : se dit de tout organe inséré sur l'axe directement et sans support.

Sétacé : se dit de tout organe en forme de soie.

Simples : plantes médicinales.

Spore : élément issu de la reproduction sexuée ou asexuée des champignons et destinés à assurer la survie du champignon et sa propagation.

Sporulation : (fructification) aptitude d'un champignon à produire des spores.

Squame : morceau de peau morte qui se détache de l'épiderme notamment suite à une brûlure ou dans le cas d'une dermatose.

Supère : se dit d'un ovaire situé au-dessus du point d'insertion des sépales, pétales et étamines.

Taxon : groupe d'être vivant constituant une unité systématique d'un niveau hiérarchique donné.

Thalle : ensemble de l'appareil végétatif et reproducteur d'un champignon. Il peut être unicellulaire ou filamenteux.

Tomenteux : couvert d'une pubescence très fine et serrée qui donne l'aspect du velours.

Verruqueux : qui comporte des petites excroissances semblables à des verrues.

Vésicant : propriété d'un produit chimique capable d'irriter gravement la peau de manière irréversible.

Vivace : se dit d'une plante qui survit plusieurs années et fleurit chaque année, même si les parties aériennes meurent tous les ans.

RESUME

RESUME

L'Algérie, par sa position géographique, abrite une biodiversité exceptionnelle occupée par d'importantes plantes médicinales. *Thymelaea hirsuta*, espèce endémique, est une plante médicinale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle algérienne pour le traitement de diverses maladies. Le présent travail a porté sur l'étude phytochimique des extraits aqueux issus des fleurs, feuilles et brindilles et l'évaluation, *in vitro*, de leurs activités antifongiques par la méthode de microdilution en milieu liquide, vis-à-vis de deux dermatophytes : *Microsporum audouinii* et *Trichophyton rubrum*, ainsi que l'activité antioxydante, en utilisant les méthodes de l'oxydation du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), pouvoir antioxydant du fer (FRAP) et ABTS test (2, 2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid]). Les résultats phytochimiques montrent que les différents organes, plus particulièrement les fleurs constituent une source privilégiée de molécules biologiquement actives telles que les polyphénols, les lipides, les tanins, les flavonoïdes et les coumarines. Hormis les feuilles, l'effet fongicide révélé a été, surtout, exhibé par l'extrait de fleurs vis-à-vis de *M. audouinii* et *T. rubrum* à partir, respectivement de 125 et 250µg/ml. L'évaluation du pouvoir antioxydant a montré que les différents extraits sont dotés d'un pouvoir antioxydant très important, notamment celui des fleurs (à 8µg/ml, %I_{DPPH}= 90,83±0,32 – %I_{ABTS}=68,63±0,53 – A_{FRAP}=0,810±0,01). Cette étude confirme, scientifiquement, l'usage traditionnel de cette plante et révèle son intérêt dans le cadre d'une exploitation industrielle pharmaceutique.

Mots clés : *Thymelaea hirsuta* – Phytochimie - Extrait aqueux – Activité anti-dermatophytes –
Activité antioxydante.

ABSTRACT

Algeria, with its geographical position, offers an exceptional biodiversity occupied by important medicinal plants. *Thymelaea hirsuta*, endemic species, is a medicinal plant used in Algerian traditional medicine for the treatment of various diseases. This work focused on the phytochemical study of aqueous extracts from flowers, leaves and twigs, and the evaluations, *in vitro*, of their antifungal activities by the microdilution method in liquid culture medium, against two dermatophytic fungi : *Microsporum audouinii* and *Trichophyton rubrum*, and their antioxidant activities, using the methods of oxidizing the radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), iron antioxidant power (FRAP) test and ABTS (2, 2' - azynobis- [3-ethylbenzoline-6-sulfonic acid]) test. The results show that the different phytochemicals organs, especially flowers, are a ideal source of biologically active molecules such as polyphenols, lipids, tannins, flavonoids and coumarins. Except for leaves, revealed fungicidal effect was mostly exhibited by flowers extract against *M. audouinii* and *T. rubrum* from 125 and 250µg/ml, respectively. Antioxidant evaluation power showed that the different extracts possess a very important antioxidant power, particularly that exhibited by flowers (at 8µg/ml, %I_{DPPH}= 90.83±0.32 – %I_{ABTS}=68.63±0.53 – A_{FRAP}=0.810±0.01). This study confirms scientifically the traditional use of this plant, and reveals its interest in the pharmaceutical industry.

Keywords: *Thymelaea hirsuta* - Phytochemistry - Aqueous extract – anti-dermatophytic activity
- Antioxidant Activity.

الملخص

الجزائر بموقعها الاستراتيجي، تحتوي على التنوع البيولوجي مكون خاصة من أهم النباتات الطبية كالمثنان الذي يعتبر نبات مستوطن و نبات طبي يستعمل في الأدوية التقليدية الجزائرية لمعالجة أمراض مختلفة، العمل الحالي ركز على الدراسة الفيزيوكيميائية و هي عبارة على مستخلصات سائلة الناتجة من الزهور، الأوراق و الأغصان، و التقييم في المخبر من خلال أنشطتها ضد الخلوية عن طريق التخفيف في الوسط المائي، من خلال عن البويغات الأودوينية و الشعروية الحمراء، أيضا نشاط مضاد الأكسدة و ذلك باستعمال طرق الأكسدة الجذري 2،2 ديفنيل 1 بيكغيدرازيل ، مضاد الأكسدة الحديد، و الاختبار النتائج أظهرت أن مختلف الأعضاء، خاصة الأزهار تشكل المصدر المميز بالأعضاء الحية النشيطة مثل البوليفينولات، الدهون، البطانة، الفلافونيدات و الكومارين، الى جانب الأوراق تم الكشف عن تأثير مبيد الفطريات بظهور خلاصة الزهور. من خلال البويغات الأودوينية و الشعروية الحمراء ، على التوالي 125 و 250ميكرو غرام/ مل، تقييم مضاد الأكسدة بينت أن الفرق بين الخلاصة مميزة بقابلية مضاد الأكسدة هام جدا بما في ذلك الزهور، هذه الدراسة أكدت علميا الاستعمال التقليدي و أظهرت فائدتها في مجال الصناعات الدوائية و الكميونباتية.

مفاتيح الكلمات : مثنان - كيمياء العقاقير-المستخلص المائي -النشاط المضاد للأكسدة -النشاط المضاد للفطري

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes ont été utilisées par l'homme, depuis la période préhistorique, comme une source principale de nourriture. Ensuite, leur intérêt s'est développé pour être employées comme médicaments et remèdes afin de soigner les différentes maladies (Damintoti, 2005). Selon certaines estimations, environ 60 à 75% de la population mondiale et 80% de la population africaine ont recouru à la médecine traditionnelle. Cette pratique répond à leurs besoins pour lesquelles la majeure partie des thérapies implique l'exploitation de principes actifs de ces plantes (Biyiti et *al.*, 2004 ; Newmann et Cragg, 2007 ; Oyedemi et Afolayan, 2011). Ces dernières produisent une large gamme de composés phytochimiques. Selon les statistiques récentes, les deux tiers des médicaments actuels commercialisés sont d'origine naturelle (Morel, 2011). Ils ont été obtenus par héli-synthèse à partir d'un pharmacophore ou par modification des produits naturels ; composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments possède donc une origine purement synthétique (Verpoorte et *al.*, 2002). Autrement dit, environ 60% des médicaments anticancéreux et 75% des composés destinés pour le traitement des maladies infectieuses sont des produits naturels ou leurs dérivés (Yangthong et *al.*, 2009 ; Kilani-Jaziri et *al.*, 2011). De plus, parmi les 300 000 espèces végétales recensées, seulement 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, parmi lesquelles 6% ont fait l'objet d'examen de leurs activités biologiques (Oyedemi et Afolayan, 2011). Ces informations semblent justifier que les plantes constituent des réservoirs de molécules bioactives encore peu explorées. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme.

Deux groupes de métabolites ont été distingués, primaires et secondaires (Hartmann 2007). Les métabolites primaires sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes : les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Quand aux métabolites secondaires, se sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie et constituent un

groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés anti oxydantes, antifongiques, anti-inflammatoires et/ou mutagènes (Epifano et *al.*, 2007).

La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale, et la recherche trouve dans les plantes des molécules actives nouvelles ou des matières premières pour la hémisynthèse de composés actifs.

De nombreux remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques ont été, pendant longtemps, employés. Alors que l'isolement de principes actifs, au XIXème siècle, a contribué à l'amélioration des connaissances des structures, ce qui a permis de passer progressivement d'une phytothérapie traditionnelle souvent empirique, acceptée parfois avec une certaine méfiance à une thérapie moderne, acceptée scientifiquement.

Aujourd'hui, les agents antioxydants de source naturelle ont suscité un intérêt particulier, car ils peuvent protéger le corps humain contre les maladies causées par les radicaux libres sans effets secondaires ; ceci est contraire aux agents antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroquinone tertiaire (BHQT) largement commercialisés dans l'industrie alimentaires. Leur application provoquent un potentiel risque en toxicité pour la santé humaine. En outre, ils peuvent provoquer des maladies cancérogène, mutagène (Laouini, 2014). Pour cette raison la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle semble être l'un des axes prioritaires ces dernières années.

Plusieurs méthodes ont été fréquemment utilisées pour évaluer les activités antioxydants dans les extraits végétaux. On peut entre autres citer le DPPH (1,1-diphényl-1-picrylhydrazyl), l'ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6sulfonique)), et le FRAP (ferric reducing antioxidant power).

Le règne végétal constitue donc, une source inépuisable de nouvelles molécules utilisables directement comme principes actifs ou pouvant servir comme molécules guides pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

La découverte de nouveaux médicaments d'origine naturelle à action antifongique constitue un axe important de recherche au niveau mondial. En Algérie, les maladies infectieuses d'origine fongique constituent l'une des pathologies, les plus répandues selon des statistiques des maladies.

La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques (Graham et *al.*, 2000 ; Bnouham et *al.*, 2002 ; Gonzalez-Tejero et *al.*, 2008). Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1977). *Thymelaea hirsuta*, plante faisant partie de ces dernières, est utilisée traditionnellement dans les régions paysannes dans le traitement des infections cutanées et dans de nombreuses régions du monde comme antiglycémiant (Brouham et *al.*, 2007), purgatif dans le traitement des rhumes des brebis en médecine vétérinaire, l'hypertension et comme antiseptique (Kwano et *al.*, 2007). Une étude bibliographique, réalisée sur cette espèce, a

montré que l'on ne dispose que de peu d'informations de nature chimique et biologique. Pour pallier ce manque d'informations, l'étude s'est focalisée sur les analyses qualitative et quantitative, les évaluations du potentiel antioxydant et l'activité antifongique des extraits aqueux préparés à partir des différents organes de la partie aérienne de la plante: *Thymelaea hirsuta* (fleurs, feuilles et brindilles).

Les principales parties de ce travail se résument comme suit :

* La première a été essentiellement consacrée aux données bibliographiques, dont le premier chapitre aborde les études antérieures incluant la présentation botanique de la famille des Thymelaeaceae et l'espèce *Thymelaea hirsuta*, ses principaux métabolites secondaires, ses usages traditionnels et ses activités biologiques. Le second présente un rappel sur la médecine traditionnelle. Quant au troisième, porte sur les champignons dermatophytes. Enfin, le quatrième présente une synthèse bibliographique sur l'étude des radicaux libres.

* La deuxième partie traite de la section expérimentale selon différentes techniques (matériels, méthodes, matériels biologiques.....).

* La troisième a été consacrée à la présentation des résultats phytochimiques et biologiques obtenus à partir des fleurs, feuilles et brindilles de *T. hirsuta* et leurs interprétations, suivie de discussion.

Ce travail a été complété par une conclusion donnant une synthèse des résultats obtenus, suivis des perspectives devant faire l'objet de travaux programmés.

PREMIÈRE PARTIE :
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

THYMELAEA

HIRSUTA

I-1- Généralités

La famille des Thymelaeaceae est une famille, appartenant aux Magnoliopsida, composée de quelques 1200 espèces réparties en 67 genres (Ferrari, 2002). Elle constitue l'une des principales familles parmi les neuf formant l'ordre des Malvales (Judd *et al.*, 2002).

En étymologie, les thymélées doivent leur nom générique à une espèce dont les feuilles ressemblent à celles du thym et le fruit à une petite « olive », du grec « elaia » (Beniston, 1984). Les Thymelaeaceae sont représentées par une dizaine d'espèces appartenant aux genres *Thymelaea* et *Daphne* (Bruneton, 1999). Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète (Fig. 1), particulièrement en Afrique, mais sont absents dans les régions aux climats les plus froids (Borris *et al.*, 1988 ; Herbada, 2006 ; Vernon *et al.*, 2007).

Dans les régions Méditerranéennes, *Thymelaea* est un genre comportant environ 31 espèces d'arbustes et d'herbes à feuilles persistantes (Tan, 1980 ; 1982). Dans ce genre, *thymelaea hirsuta* est considérée comme l'espèce la plus typique du littoral (Ressigle *et al.*, 1987).



Figure 1 : Répartition géographique des *Thymelaea*. La ligne pointillée indique la limite approximative de l'espèce annuelle *T. hirsuta* (nord et est).

I-2- Description botanique

Thymelaea hirsuta est une plante vivace ne mesurant pas plus d'un mètre de hauteur (Batanouny, 2005). Sa souche est ligneuse, forte et porte de nombreux rameaux tombants (Pausas et al., 2006) garnis de nombreuses petites feuilles de 6mm environ, ovales presque imbriquées, épaisses, luisantes au-dessus et cotonneuses en dessous (Jeanmonod et Gamisans, 2007) (Planche 1 A).

Dans les conditions climatiques favorables, la floraison débute à partir du mois d'octobre et s'étale jusqu'en avril (Jeanmonod et Gamisans, 2007). La plante porte sur des pieds différents, soit des fleurs unisexuées, soit des fleurs hermaphrodites (Jeanmonod et Gamisans, 2007 ; Shaltout et El keblawy, 1992 ; Dommée et al., 1995, 1990 ; Renner, 2001). Selon Dommée et al. (1984), les pieds bisexués sont d'abord mâles, deviennent femelles ultérieurement. L'abondance de cette catégorie pourrait indiquer l'importance de la monœcie d'une espèce considérée jusqu'à présent comme essentiellement dioïque. Les fleurs de cette plante sont groupées entre 2 et 5 périanthes jaunâtres à l'intérieure, blanches, soyeuses et pubescentes à l'extérieur (Beniston, 1984 ; Somon, 1987). Les petites fleurs de 5mm polygames et sans bractées se trouvent sur les rameaux ou sur les ramifications naissantes, sub-sessiles et insérées les unes à côté des autres par l'intermédiaire d'un court pédicelle sur l'extrémité renflée de l'axe de l'inflorescence ; le pédicelle avec ses longs poils recouvrent la base de la fleur. Le calice pétaloïde, poilu à l'extérieur, glabre à l'intérieure, se divise à la partie supérieure en quatre sépales étalées et huit étamines soudées (**Cuvier, 1825**). Le style filiforme et latéral (Villars, 1807) est terminé par un stigmate légèrement velu (Cuvier, 1825). Deux types de fleurs peuvent être distingués, mâles et femelles. Les fleurs mâles verdâtres ont un calice cylindrique (planche 1 B), alors que celles femelles sont jaunâtres à calice renflé (planche 1 C).

Les fruits sont des baies glabres, consommés par les animaux assurent la dispersion des graines (dispersion zoochore) (Jeanmonod et gamisans, 2007). Ces dernières présentent un tégument extérieur rugueux et assez dur. L'embryon est droit dans un albumen peu abondant (Beniston, 1984).



Planche 1 : *Thymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher (Photos originales). **A-** feuilles cotonneuses. **B-** fleurs mâles. **C-** fleurs femelles.

I-3- Biologie et Ecologie

Thymelaea hirsuta est une plante chaméphyte, frutescente, autotrophe par photosynthèse chlorophyllienne ; vicariante : remplacée dans le même biotope par *Thymelaea tarton-raira* aux environs de Marseille, et entomogame dont la dispersion du pollen est assurée par les insectes (Cornara *et al.*, 2005). Elle est aperçue dans les régions méditerranéennes, saharo-arabique, et dans la côte nord du Sinaï et en Israël (Tackholm, 1974 ; Risk, 1987 ; Shaltout et El-shourbagy, 1989 ; Veste *et al.*, 2008). Selon Shenbrot (2004), *Thymelaea hirsuta* est présente dans la partie méridionale des montagnes centrales du Néguev où les précipitations annuelles sont de l'ordre de 180 à 300mm.

La diversité des conditions climatiques, ajoutée à celle des situations édaphiques (nature des substrats et des sols, valeur de pentes) expliquent la très grande variété de formations végétales et conditionnent, par conséquent, leur répartitions (Shaltout et Ayyad, 1988 ; Shaltout *et al.*, 1989 ; Shaltout, 1992 ; El keblawy *et al.*, 1996) ; les éléments nutritifs de *Thymelaea hirsuta* au printemps sont sensiblement plus élevés que ceux présents en été. Ce constat est lié à la différence des éléments nutritifs disponibles dans le sol, la salinité des sols et la quantité de roches exposées. Ces facteurs semblent être les plus importants, influençant à la fois la phytomasse et la teneur minérale de la plante (Shaltout, 1992). Il semble que la salinité du sol, sa faible teneur en humidité et ses températures extrêmes favorisent les activités phénologiques de *Thymelaea hirsuta* (Shaltout, 1987).

La survie de *Thymelaea hirsuta* est assurée par la reproduction sexuelle qui s'est avérée être le seul moyen de régénérer naturellement les populations, par contre la reproduction végétative est difficile à mettre en œuvre (Minuto *et al.*, 2004).

I-4- Classification

I-4-1- Classification botanique

Règne :	Végétale
Sous règne :	Tracheobionta
Embranchement :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous classe :	Rosidae
Ordre :	Malvales
Famille :	Thymelaeaceae
Genre :	<i>Thymelaea</i>
Espèce :	<i>T. hirsuta</i> (L.) Endl., 1847

La position taxonomique des Thymelaeaceae a toujours été sujette à caution, comme l'ont relevé Borris *et al.* (1988), avant même l'avènement des classifications phylogénétiques

moléculaires. Engler et Gilg (1924) ont d'abord placé cette famille dans le sous-ordre des Thymelaeineae, de l'ordre des Myrtiflorae, ensemble avec les Geissolomataceae, les Penaeaceae, les Oliniaceae et les Elaeagnaceae. Melchior (1964) et Wagenitz (1964), dans la 12ème édition du *Syllabus der Pflanzenfamilien* d'Engler, ont déplacé les Oliniaceae dans le sous-ordre des Myrtinae et élevé le reste des Thymelaeineae au rang d'ordre, sous l'appellation de Thymelaeales. Cet ordre a été validé par la suite par Gundersen (1950), avec cependant la ré-introduction des Oliniaceae, considérant également les Geissolomataceae comme faisant partie des Penaeaceae. Hutchinson (1967) supprime les Oliniaceae des Thymelaeales, mais y introduit les Nyctaginaceae et divise les Thymelaeaceae d'Engler en trois familles : Thymelaeaceae, Gonystylaceae et Aquilariaceae. Quant à Cronquist (1968), il inclut les Thymelaeaceae, les Penaeaceae, les Oliniaceae et dix autres familles dans l'ordre des Myrtales de la sous-classe des Rosidae.

L'étude de la morphologie florale des Thymelaeaceae a mis en évidence la confusion régnant dans les relations taxonomiques au sein de cette famille (Heining, 1951). Il a été affirmé que les Thymelaeaceae peuvent être apparentées aux Tiliaceae ou aux Flacourtiaceae. Alors que les caractéristiques de morphologie pollinique ont amené à justifier que les Thymelaeaceae peuvent être très fortement apparentées aux membres crotonoïdes des Euphorbiaceae et aux Buxaceae, mais pas aux familles des Celastraceae, Combretaceae, Dichapetalaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Penaeaceae, Proteaceae et Tiliaceae (Erdtman, 1952).

I-4-2- Classification phylogénétique

La dernière décennie a vu se développer la cladistique moderne, ou systématique moléculaire, basée sur l'analyse des séquences de gène ou d'ADN (Van der bank et *al.*, 2002 ; Herbada, 2006) dont le principe fondamental est que la preuve d'une parenté phylogénétique entre différents taxons n'est fournie que s'ils partagent les mêmes caractères dérivés (synapomorphies). Ainsi, la délimitation de l'ordre des Malvales par Alverson et *al.* (1998), reprise par l'APG (1998) (Angiosperm Phylogeny Group), où s'y trouve les Thymelaeaceae, qui étaient jusque-là souvent associées aux Myrtales. La classification des Thymelaeaceae dans l'ordre des Malvales « étendu » est d'ailleurs confortée par d'autres caractères, comme par exemple la présence d'acides gras cyclopropaniques (Vickery, 1980 ; 1981), de cellules mucilagineuses et d'écorces fibreuses robustes dans cette famille (Dahlgren et Thorne, 1984).

Classification phylogénétique des Thymelaeaceae (Anonyme, 2005) :

Classe	:	Rosopsida
S/Classe	:	Rosidae
Ordre	:	Malvales
Famille	:	Thymelaeaceae

I-5- Composition chimique et utilisation

Les thymelaeaceae ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques (Borris *et al.*, 1988 ; Baba *et al.*, 1987 ; Yanz *et al.*, 1987). Les esters diterpéniques de type tiglane, daphnane sont la classe de composés les plus caractéristiques des thymelaeaceae. Ces métabolites peuvent se retrouver dans toutes les parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fruits et graines) (Ferrari, 2002). Ce sont des purgatifs violents qui déclenchent par contact avec la peau ou les muqueuses une réaction inflammatoire intense (Brooks *et al.*, 1990) et des effets neurotrophiques (He *et al.*, 2002 ; Moosavi *et al.*, 2005) et anticancéreux (Abou-karam *et al.*, 1998). Selon Brooks *et al.* (1990) et Miyamae *et al.* (2009), des diterpènes daphnanes ont été isolés à partir des feuilles et des rameaux de *Thymelaea hirsuta*. Cependant, Kawano *et al.* (2007) en fractionnant l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Thymelaea hirsuta* ont constaté qu'une fraction a considérablement diminué la synthèse de la mélanine, sans qu'il y ait eu cytotoxicité dans les cellules B16. Celle-ci contient des daphnanes comme composant principal, lesquels sont des diterpènes tricycliques, présents naturellement sous forme d'orthoester (Evans *et al.*, 1978).

En outre, les coumarines constituent une autre classe de métabolites secondaires des Thymelaeaceae, intéressante du point de vue taxonomique. Dans cette famille, ils se trouvent sous forme de coumarines simples, de di- et trimères de coumarines avec liaison C-C ou éther ou à structure dibenzofurannique, ou de coumarinolignanes (Ferrari, 2002). Parmi les coumarines simples, caractéristiques des Thymelaeaceae, on trouve la daphnétine (Ergenç, 1968) et ses dérivés 7- β -D-glucoside (Nakabayashi, 1954) et 8- β -D-glucoside (Kosheleva *et al.*, 1968). L'étude de *Thymelaea hirsuta* Endl., par Rizk *et al.* (1975) a permis de mettre en évidence des coumarines très répandues chez les végétaux supérieurs : l'esculétine, la scopolétine et l'ombelliférone (Tab. 1). Leur présence dans la famille des Thymelaeaceae en a fait donc un marqueur chimiotaxonomique de valeur (Ferrari, 2002). Tandon *et al.* (1977) ont été les premiers à isoler une tricoumarine chez les Thymelaeaceae, la wikstrosine tirée de *Wikstroemia viridiflora* Meissn., dont la structure n'a jamais été entièrement élucidée. Tandis que Rizk *et al.* (1984) signalent la présence de deux dérivés aromatiques isolés à partir des feuilles et des brindilles de *Thymelaea hirsuta* (Tab. 1).

La caractéristique frappante des Thymelaeaceae réside dans la diversité de leur métabolisme flavonoïdique, produit naturel antioxydant et anti-tumoraux (Trigui et *al.*, 2013 ; Akrouit et *al.*, 2011), ceci peut expliquer le fait qu'elle possède différentes propriétés pharmacologiques, surtout pour leurs parties aériennes (Dahou et *al.*, 2003). On y rencontre, en effet, aussi bien des flavones, des flavonols, des flavanones, des C-glycosylflavones, que des biflavonoïdes. Les flavonoïdes les plus courants chez les Thymelaeaceae sont les dérivés O-glycosylés et méthylés de l'apigénine, de la genkwanine, du kaempférol et de la lutéoline (Ferrari, 2002). Les C-glycosylflavones orientine, vitexine et isovitexine ont également été mises en évidence chez certaines *Daphne* et *Thymelaea* (Borris et *al.*, 1988). Touati (1985) a identifié un flavonol chez *Thymelaea hirsuta*, celle-ci contient aussi du kaempférol-3-B coumaroylglucoside (=Tillose) (Ismail, 1978) et d'anthocyanidols (Dohou et *al.*, 2003). Les flavones sont apparemment plus abondants que les flavonols chez la plante, Touati (1985) a noté une grande vitesse de dégradation de ces molécules qui doivent être fortement hydroxylées chez *Thymelaea hirsuta*. Par contre, Nawwar et *al.* (1977) mentionnent la présence d'une di-C-glycosylapigénine : la vicénine-2 dans ses feuilles.

Les stérols sont courants chez les Thymelaeaceae, principalement représentés par le β -sitostérol, qui est ubiquitaire dans le règne végétale (Borris et *al.*, 1988). Les travaux de García Granados et Buruaga (1980) ont permis d'isoler le cholestérol ; stérol caractéristique des vertébrés supérieurs, à partir des feuilles de *Thymelaea hirsuta* ainsi que des triterpènes de type dammarane (lanostérol), lupane (lupépol et bétuline), oléanane (β -amyrine et érythrodiol) et sesquiterpènes (Kadri et *al.*, 2011).

Levin (1976) a observé la présence des alcaloïdes chez 36% des espèces de thymelaeacées, alors que Touati (1985) a signalé que *Thymelaea hirsuta* n'en contient pas. Quant aux tannins, ils semblent être peu courants dans la famille des thymelaeaceae. Lorsqu'ils apparaissent, il s'agit généralement de dérivés du leucocyanidol (Hegnauer, 1973). Alors que les feuilles de *Thymelaea hirsuta* contiennent des tannins de type gallique (El Beiheiry, 2000).

Ferrari (2002) affirme que les thymelaeaceae ne sont pas une famille à saponines.

Tableau 1 : Composition chimique de *Thymelaea hirsuta*.

Organes étudiés	Molécules extraites	Références
Feuilles	Thyméol ((C ₃ H ₂ O) _n)	Saleh et al., 1965
	Stigmasterol, β-Sitosterol, Alcool aliphatique C ₁₂ H ₂₂ O, Lactone C ₁₉ H ₁₈ O ₆	Gharbo et al., 1970
	Alcanes en C ₂₇ à ₃₁ , alcanols en C ₂₂ , ₂₄ , ₂₆ et ₂₈ , β-Sitostérol et Campesterol	Rizk et al., 1974
	Daphnorine, Daphnorétine, Daphnine, Daphnétine, Daphnétine-glucoside, Ombelliférone, Scopolétine et Esculétine (coumarines)	Rizk et al., 1975
	2-vicénine (C-flavone)	Nawwar et al., 1977
	Tilioside (3- <i>p</i> -coumaroylglucosylkaempférol) (flavanol)	Ismail, 1978
	Lupéol, β-Sitostérol, Phytol, β-amyrine, Bétuline, Erythrodiol, Cholestérol et Lanostérol	Garcia-Granados et Saenz de Buruaga, 1980
	Tanins	El-Beheiry, 2000
feuilles et brindilles	5,12-dihydroxy-6,7-époxy-résiniféronol	Rizk et al., 1984
	Gnidicine, Gnitrine, Genkwadaphnine, 12- <i>O</i> heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7 époxyrésiniféronol-9,13,14-orthobenzoate et 12- <i>O</i> butényl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol-9,13,14-orthobenzoate (diterpènes daphnane)	Brooks et al., 1990
racines	Daphnorétine (éther de dicoumaryl)	Abou-Karam et al., 1998

CHAPITRE II :
MÉDECINE
TRADITIONNELLE

II- Médecine traditionnelle

II-1- Historique

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines ; elles contiennent de nombreux composants de valeur thérapeutique. Récemment, le fait d'accepter la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles a encourager certains chercheurs à s'intéresser à l'activité antimicrobienne des plantes médicinales (Nostro et *al.*, 2000). Par contre, en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, de nombreuses personnes cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et bien sûr avec un coût moins élevé (Schnaubelt, 1998).

Depuis toujours, grâce à la richesse de leur métabolisme secondaire, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments. Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique (8000 ans avant Jésus-Christ). L'observation liée à l'expérience et à la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (Fouché et *al.*, 2000).

Dans les civilisations chinoises et indiennes (médecine ayurvédique), l'utilisation médicinale présente des traces très anciennes. Le premier livre en matière médicale, le Shen Nung Ben Cao Jing ("traité des plantes médicinales de l'empereur Shen Nung") fut rédigé vers 2900 avant J-C. 4000 ans avant J-C., les populations babyloniennes et sumériennes utilisaient les plantes pour se soigner ; 600 tablettes d'argiles mentionnent 1000 plantes pour leurs vertus curatives et plus de 800 remèdes sont décrits par les Égyptiens (Fouché et *al.*, 2000). Le soin de la peau a commencé 3000 ans avant J-C, quand les Égyptiens ont enregistré en forme hiéroglyphique le soin de la peau sur des peintures de mur de temple (Dweck, 2002).

Les grands médecins grecs, dont le plus célèbre est Hippocrate (5 siècles avant J-C.) classe les plantes dans son ouvrage *Historia plantarum* (Fouché et *al.*, 2000).

A l'apogée de l'empire arabe (dont les frontières aient de l'Inde à l'Espagne), tous les documents écrits furent réunis à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque (entre le 7^{ème} et le 9^{ème} siècle). Les arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie, Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrit le "*canon de la médecine*". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'au environ de 1650, Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très

complet somme des simples, ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (Fouché et *al.*, 2000).

II-2- Définition

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), la médecine traditionnelle est la somme totale des connaissances, compétences et pratiques reposant rationnellement ou non, sur les théories, les croyances et les expériences propres à une culture. Elle est utilisée pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies en s'appuyant exclusivement sur les expériences vécues et les observations transmises de génération en génération (oralement ou par écrit) (Adjanhoun et *al.*, 1980).

II-3- La phytothérapie

La phytothérapie, du mot grec "pluton" plante et "therapeia" traitement, signifie traitement par les plantes (Chabrier, 2010). C'est une pratique très ancienne, qui consiste à l'utilisation des propriétés pharmacologiques des plantes médicinales grâce aux nombreux et divers principes actifs qu'elles renferment (Iserin et *al.*, 2001).

L'utilisation des plantes en thérapeutique (phytothérapie) connaît actuellement un regain d'intérêt au près du public (Diallo, 2005). Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent (Marc, 2001). Par ailleurs, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de celles utilisées en médecine traditionnelle (Diallo, 2005).

Aujourd'hui, les plantes retrouvent leur place dans notre vie quotidienne (Flemming, 1997), plus particulièrement dans les pays en voie de développement, on se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes (Waridel, 2003).

L'industrie pharmaceutique, elle-même, s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiquement active. Cette source semble inépuisable puisque seul une petite partie des 400000 espèces végétales connus ont été investiguées sur les plantes phytochimiques et pharmacologiques, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (Hostettmann et *al.*, 1998b).

II-4- Les métabolites secondaires des plantes

Les plantes possèdent des métabolites secondaires par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et bien que leurs rôles soient encore mal connus, ils semblent intervenir dans les relations qu'entretient la plante avec l'organisme vivant qui l'entourent. Ils sont des éléments essentiels de la coévolution des plantes et les organismes vivants. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (Krief, 2003).

La relation entre les métabolismes réside dans la production de petites molécules par le métabolisme primaire, constituant les molécules de départ pour les différentes voies du métabolisme secondaire (Bratt, 2000). Parmi, les métabolites secondaires, on distingue :

II-4-1- Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Haslam, 1993). La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques auquel sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyle libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (Harborne, 1994).

II-4-1--1- Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (Edenharder et Grünhage, 2003) et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbone, qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2 benzopyrane, ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao et *al.*, 2004). La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation, de méthylation, du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C (Yao et *al.*, 2004 ; Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et aurones (Havsteen, 2002 ; Edenharder et Grünhage, 2003).

II-4-1--2- Tanins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines (Haslam, 1996 ; Cowan, 1999).

Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991). On distingue deux groupes de tanins différents par leurs structures et par leurs origines biogénétiques :

- **Tanins hydrolysables** qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide ellagique dans le cas des tanins classiquement dénommés ellagitannins (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999).

- **Tanins condensés ou tanins catechiques ou proanthocyanidols** qui se diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables, car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule, et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Bruneton, 1999).

II-4-1--3- Acides phénoliques

Petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être également estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides. Leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (Garnero, 2000).

II-4-1--4- Coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques constitués d'un benzène et des noyaux à pyrènes. Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres (Cowan, 1999).

II-4-1--5- Quinones

Les quinones sont des molécules très réactives, à noyaux aromatiques, avec deux substitutions cétoniques (Cowan, 1999). Elles sont des composés qui régénèrent des radicaux libres, et par conséquent se complexent irréversiblement aux acides aminés nucléophiles des protéines (Stern et al., 1996). Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Cowan, 1999).

II-4-2- Composés terpéniques

II-4-2-1- Stéroïdes, Stérols et Terpénoides

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoides constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux, ils regroupent plusieurs sous familles. Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles (Bruneton, 1993). Ils se présentent sous forme d'alcool libre (Sitostérol), ou sous forme des esters associés par le glucose (Glucoside stérols) (Gaignautl et al., 1997).

Parmi les stérols ou phytostérols les plus fréquemment rencontrés chez les végétaux on cite : le stigmastérol et le β -sitostérol. Ils représentent 80% des stérols biosynthétisés à la surface du globe terrestre (Gaignautl et al., 1997).

Les stéroïdes et les triterpènes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2- méthyl butadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes (Paris et Moyse 1965).

II-4-2-2- Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, appartenant aux stérols ou triterpènes. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes, ils sont caractérisés par leur action tensioactive (Bruneton, 1999). Ils sont composés de deux parties :

- Une partie hydrophile, formée d'un ou de plusieurs sucres, eux-mêmes de nature variée ;
- Une partie aglycone et lipophile (dite sapogénine), qui est soit un résidu de triterpène, soit un résidu de stéroïde (Dacosta, 2003).

II-4-2-3- Huiles essentielles

Les huiles volatiles, ou essences aromatiques végétales nommées huiles essentielles car elles renferment la "Quinta essentia", la fragrance de la plante (Lamarti et *al.*, 1994), sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales et minérales. Lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras : elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (Coraline et *al.*, 2006). Les plantes aromatiques synthétisent naturellement les huiles sous forme de métabolites secondaires par des cellules sécrétrices qui contiennent de la chlorophylle, elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante dans d'autres parties ; le bois, les fruits, les écorces, les graines et les racines et sont conservées dans les cellules sécrétrices, les cavités, les canaux, les cellules épidermiques ou dans les trichomes glandulaires (Bakkali et *al.*, 2008). Cependant la quantité d'huile produite est très variable selon les espèces et elles sont souvent colorées (Coraline et *al.*, 2006).

II-5- Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro-intestinales, antioxydantes.... (Harborne, 1998 ; Bruneton, 1999).

Parmi les principaux métabolites secondaires, les flavonoïdes qui sont des composés qui possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes (Rice-Evans, 1995). Ils sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (Dixon et *al.*, 1983), et par conséquent agissent comme substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes (Cowan, 1999 ; Recio et *al.*, 1989).

Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celles des flavonoïdes vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés

vasoprotectrices et anti-oedémateuse. Il s'agit, en outre, de composés veino-actifs doués d'une propriété vitaminique P (Bruneton, 1999).

Les acides phénols sont anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, hépato - protecteurs et immunostimulants (Bruneton, 1999).

Les coumarines connues pour ses propriétés anti-oedémateuses, ont fait l'objet d'études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés car elle est rapidement métabolisée au niveau du foie en 7-hydroxycoumarine (Fujioka et *al.*, 1999). Il n'est pas exclu que les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques attribués au frêne soient dues aux coumarines (Chen et *al.*, 1995 ; Garcia-Agaezet *al.*, 2000). L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques (Resch et *al.*, 1998), antivirale (Yoshikawa et *al.*, 1994) et antimicrobienne (Kayser et Kolodziej, 1997).

Les tanins favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (Kansole, 2009).

Les corps terpéniques sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques (Bruneton, 1999). Contrairement aux huiles essentielles, ils ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti, 2009). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques a été largement décrite *in vitro* ainsi que les activités antispasmodique, diurétique (Hans, 2007), antioxydante et anti-inflammatoire et également un fort pouvoir antifongique (Giordani et Kaloustian, 2006 ; De Billerbeck, 2007 ; Juhas, 2009).

CHAPITRE III :
DERMATOPHYTES

III- Les dermatophytes

III-1- Définition

Les dermatophytes sont des ascomycètes appartenant à l'ordre des *Onygenales*, à la famille des *Arthrodermataceae* et au genre *Arthroderma* (Currah, 1985), qui présentent une affinité pour la kératine (espèces kératinophiles) qu'ils sont capables d'envahir grâce à des enzymes lytiques (Kah, 2011). Ce sont des champignons microscopiques filamenteux cosmopolites (Chabasse et Contet-Audonneau, 2011) au thalle septé se multipliant sur le mode sexué, produisant des ascospores (Chabasse et *al.*, 2004). La reproduction asexuée s'effectue, pour les dermatophytes, sur le mode thalique solitaire et conduit à la production de deux types de spores ou conidies (également appelées aleuries) : des spores unicellulaires appelées microconidies ou microaleuries et des spores pluricellulaires, à base tronquée et cloisonnée transversalement comme les macroconidies ou macroaleuries (Chabasse et *al.*, 2004).

III-2- Classification

Il y a plusieurs systèmes bien connus et généralement acceptés de subdivision du « *Regnum fungorum* ».

III-2-1- Place dans la systématique

Sabouraud, en 1910, élabore une première classification des dermatophytes. Celle-ci, fondée sur les caractères culturels et morphologiques à l'état frais des champignons, est encore la plus couramment utilisée, bien que des modifications aient été apportées (Ajello, 1967 ; Badillet, 1975).

Selon la classification de De Hoog et *al.* (1989), les dermatophytes appartiennent :

Règne : Fungi (être vivants Eucaryotes hétérotrophes à structure acellulaire syncytiale).

Classe : Ascomycètes (champignon à mycélium cloisonné à reproduction sexué avec formation d'asques contenant des ascospores).

Ordre : Onygenales (reproduction asexuée par aleurioconidies et / ou arthroconidies).

Famille : Arthrodermataceae (ascospores lisses).

Genre : 1. *Epidermophyton*, 2. *Microsporum*, 3. *Tricophyton*.

III-2-2- Morphologie

III-2-2-1- En vie parasitaire

Les filaments sont mycéliens cloisonnés de 2 à 4µm, plus ou moins ramifiés, ainsi que des arthroconidies provenant de leur fragmentation, de taille variable (2 à 12µm de diamètre). La disposition des filaments et des arthroconidies au sein des poils parasités permet de distinguer deux types d'infection pilaire :

- **Type ecotothrix** : les filaments sont à l'intérieur du poil et les arthroconidies étant à l'extérieur ;
- **Type endoethrix** : les filaments et les arthroconidies sont à l'intérieur du poil, une variante de ce type, le type favique est caractérisé par un petit nombre de filaments qui se fragmentent pour former des « targes faviques » qui sont des amas plus ou moins polygonaux d'arthroconidies (Guillet, 2002).

III-2-2-2- En culture

Les dermatophytes étant classés selon l'aspect microscopique et macroscopique des colonies obtenues (Aboulmakarim et *al.*, 2010 ; Chabasse et *al.*, 2004).

- **Aspect macroscopique**

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu de Sabouraud peut être glabre ou au contraire duveteux, voir cotonneux, ou bien encore poudreux. La couleur du pigment visible au recto de la culture varie selon le dermatophyte en cause. Elle est en générale blanchâtre, jaunâtre ou rosée. Le verso est quant à lui jaune, orange pourpre ou brun (Guillet, 2002).

- **Aspects microscopiques**

- Le genre *Epidermophyton* (Sabouraud. 1907) est caractérisé par l'absence de microconidies et par la présence de macroconidies à paroi mince en forme de massue.
- Le genre *Microsporum* (Gruby. 1843) est caractérisé par des macroconidies rondes ou piriformes, mais souvent rondes.
- Le genre *Trichophyton* (Mamstem. 1845) est défini par la présence des macroconidies plus petites, à parois lisses et minces et des microconidies, rondes ou piriformes selon les espèces (Chabasse et *al.*, 2004).

III- 3- Nutrition des dermatophytes

Les dermatophytes produisent des enzymes protéolytiques qui lysent la kératine, les kératinases, grâce auxquelles ils décomposent les tissus et débris kératinisés, en rompant les ponts disulfures unissant deux chaînes peptidiques : ils sont kératophyles, on les trouve donc en vie parasitaire dans les couches kératinisées de l'épiderme et les phanères.

L'envahissement pileaire commence par la germination des arthroconidies à la surface de la peau et se poursuit par le développement des filaments dans la gaine interne des follicules jusqu'à la frange d'Adamsan, qui sépare la zone kératinisée du poil de la zone de croissance. Les éléments fongiques sont ensuite entraînés vers le haut par la croissance du poil (Philipot, 1977 ; Saez et Battesti, 1972).

III-4- Origine et modalités de contamination

Selon Chabasse et Miegerville (2006), l'origine de la contamination de l'homme peut être humaine (espèce anthropophiles), animale (espèce zoophiles) ou tellurique (espèce géophile) :

- Les espèces anthropophiles dont la transmission est interhumaine et peut être indirecte par l'intermédiaire d'objets vecteurs (peigne, linge, chaussures) ou de supports inertes (carrelage, tapis et saunas etc.) contenant des débris de kératine humaine virulente (cheveux, fragments d'ongles et squames parasités). Exemple : *Microsporum audouinii* (Planche 2), *Trichophyton rubrum* (Planche 3), *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (Biabiany, 2011).

- Les espèces Zoophiles se transmettent à l'homme par le contact d'un animal contaminé ou par l'intermédiaire de ses poils parasités. Ex : *Microsporum canis* (Feuilhade *et al.*, 2002 ; Candolfi *et al.*, 2007).

- Les espèces Géophiles ou telluriques parasitent accidentellement l'homme à la suite d'une blessure tellurique. Ex : *Microsporum gypseum* (Chabasse *et al.*, 2004).

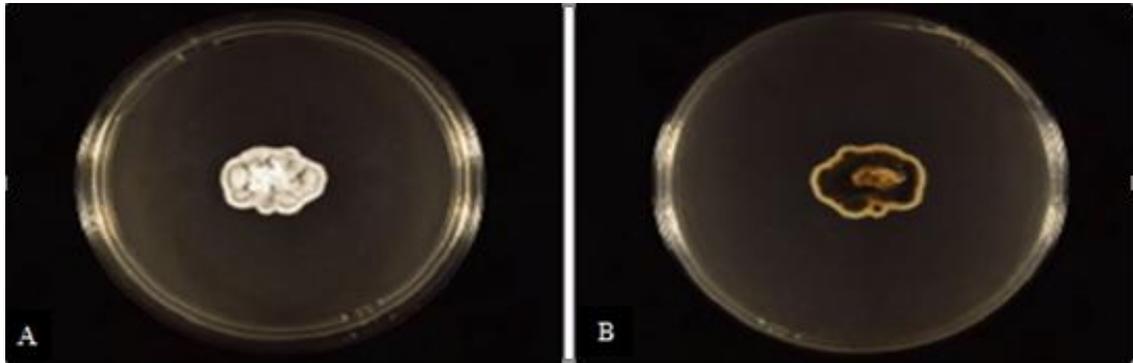


Planche 2 : (Fromage et al., 2010). **A** - *Microsporum audouinii* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B** - *Microsporum audouinii* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso).

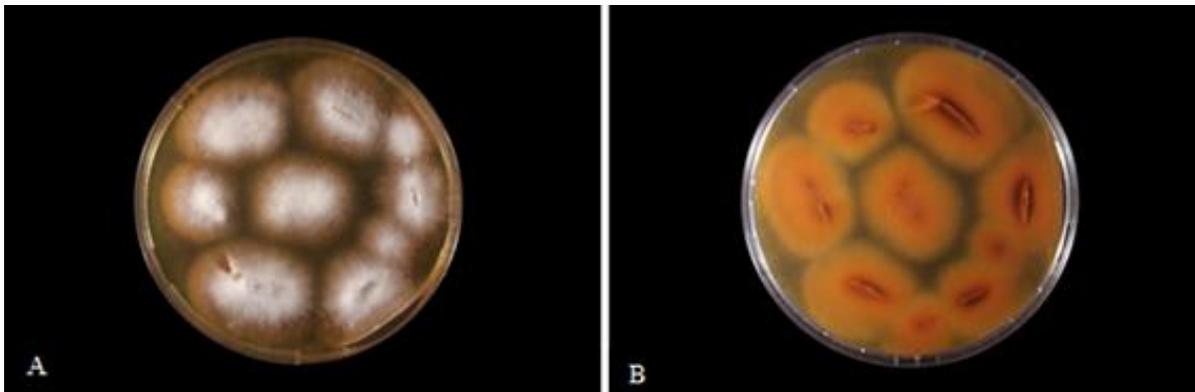


Planche 3 : (Chabasse et al., 2004). **A** - *Trichophyton rubrum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (recto), **B** - *Trichophyton rubrum* sur Sabouraud. Aspect macroscopique (verso)

III-5- Les dermatophytoses

Les dermatophytoses sont des mycoses cosmopolites dues aux dermatophytes intéressant l'épiderme et les phanères, très exceptionnellement les tissus profonds. Ces champignons sont kératinophyles, c'est-à-dire qu'ils attaquent avec prédilection la kératine de la couche cornée de la peau, des poils, des cheveux et des ongles chez l'être humain, de la peau, des poils et des griffes chez l'animal (Feuilhade et *al.*, 2002).

III-5- 1- Les teignes et les sycosis

Ce sont des lésions qui correspondent à l'atteinte des cheveux pour les teignes, (Chabasse et *al.*, 2004 ; Cisse et *al.*, 2006), le sexe masculin est le plus atteint (Oudaina et *al.*, 2011). une teigne du cuir chevelu apparaît lorsqu'un dermatophyte du genre *Microsporum* et *Trichophyton* envahi le cheveu (Chabasse et Contet-Audonnet 2013 ; Lateur, 2004), les modalités d'envahissement de celui-ci peuvent être à l'origine d'une cassure du cheveu (teigne tondante), d'une réaction inflammatoire (teigne suppurée) ou d'une alopecie définitive (teigne favique) (Maslin et *al.*, 2005).

Les sycosis : atteinte inflammatoire folliculaire de la barbe et de la moustache (Chabasse et *al.*, 2004) par un dermatophyte, similaires aux teignes inflammatoires : lésions érythémateuses, suppurées, avec expulsion des poils parasités (Chabasse et *al.*, 2004 ; Candolfi et *al.*, 2007).

III-5- 2- Les mycoses unguéales

Les onychomycoses sont les maladies les plus fréquentes de l'ongle (Feuilhade et *al.*, 2002), débutent habituellement par un périonyx (ou par onychie), secondairement apparaît un onyxis, avec d'abord atteinte de la partie proximale de l'ongle, puis extension vers ses bords latéraux et distaux (Chabasse et *al.*, 2004).

L'envahissement de l'ongle par un dermatophyte est à l'origine d'un onyxis fongique, sans atteinte du bourrelet péri-unguéal. Ce sont les ongles des pieds qui sont principalement touchés (Chabasse et *al.*, 2008), mais ceux des mains peuvent l'être aussi. On en distingue différents aspects cliniques :

- **Onychomycose sous unguéale distale** : par attaque du bord libre de l'ongle (Lanouette, 2005 ; Chabasse et Miegerville, 2005, 2006 ; Candolfi et *al.*, 2007).

- **Onychomycose sous unguéale proximale** : L'infection débute par une tâche blanchâtre à la base de l'ongle, puis s'étend à tout l'ongle (Lanouette, 2005 ; Candolfi et *al.*, 2007).

- **Leuconychie superficielle** : par attaque directe de la tablette superficielle de l'ongle, en un point quelconque de l'ongle (Chabasse et Miegerville, 2006 ; Candolfi et *al.*, 2007).

- **Onychomycodystrophie totale** : destruction complète de l'ongle par évolution des formes précédentes (Lanouette, 2005 ; Chabasse et Miegerville, 2006 ; Candolfi et *al.*, 2007).

III-5- 3- Les dermatophytoses de la peau glabre

On entend par " peau glabre" le revêtement cutané dépourvu de poils et de cheveux, à l'exception des paumes des mains et des paumes des pieds, y compris chez le jeune enfant (Rispaill, 2005). Les infections de la peau glabre sont dues le plus souvent à *Trichophyton rubrum*, réalisant des placards érythémateux ou érythémato-squameux psoriasiforme (Blaque-Belair, 1981).

Selon Candolfi et al. (2007), parmi les dermatophytoses de la peau glabre, les intertrigos dermatophytiques sont des atteintes des plis par un dermatophyte, ils peuvent toucher tous les plis du corps tel que:

- Lésions des petits plis : elles touchent surtout les pieds réalisant un intertrigo interdigito-plantaire (appelé aussi pied d'athlète) dues à *Trichophyton*, *Epidermophyton* mais aussi à *Candida albicans*.

- Intertrigo des grands plis : parmi les grands plis (inguinaux, inter fessiers ...) c'est l'intertrigo inguinal qui est le plus fréquemment rencontré. La lésion prend l'aspect d'un bourrelet squameux, en ailes de papillon ou asymétrique prurigineux due à *Epidermophyton* ou *Trichophyton rubrum*.

III- 5- 4- Les dermatophytides

Les dermatophytides sont des réactions allergiques provoquées par un dermatophyte (Candolfi et al., 2007 ; Chabasse et Pihet, 2008).

CHAPITRE IV :
ANTIOXYDANTS

IV-1- Les radicaux libres

IV-1-1- Définition

On définit comme radical libre (RL), n'importe quelle molécule indépendante contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) (Christopher et *al.*, 1995). Les radicaux libres (RLs) sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une « réaction en chaîne » débute lorsqu'un RL attaque la molécule stable la plus proche en lui « volant » son électron, et la « molécule attaquée » devient alors elle-même un RL (Martinez-Cayuela, 1995). Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (Anderson et *al.*, 1996 ; Fosting, 2004).

Présent dans l'air pour environ une partie sur cinq, l'oxygène est indispensable à la vie de la plupart des êtres vivants. Il possède deux électrons non appariés, ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes, Il est donc peu toxique par lui-même (Dacosta, 2003). Mais sous l'action des radiations ionisantes, de rayons UV, de métaux de transition « fer, cuivre...etc. » ou au cours de certaines réactions enzymatiques, des formes hautement réactives de l'oxygène apparaissent, on les désigne souvent comme espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou reactive oxygen species (ROS), selon la terminologie anglaise (Novelli, 1997 ; Bartosikova et *al.*, 2003).

IV-1-2- Principaux radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène sont des radicaux libres ou des entités chimiques ayant au moins un atome d'oxygène et possédant un ou plusieurs électron (s) libre (s) les rendant instables (Halliwell, 1999). Les espèces réactives de l'oxygène les plus couramment rencontrées sont : le radical hydroxyl (OH^\bullet), le radical superoxyde (O_2^\bullet), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxyde nitrique (NO^\bullet). (Le symbole \bullet indique la présence d'un électron célibataire.)

IV-1-2-1- Anion -radical superoxyde (O_2^\bullet)

Est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus. Il semble être impliqué dans la protéolyse non enzymatique du collagène.

IV-1-2-2- Peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)

Provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. IL s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant.

IV-1-2-3- Le radical hydroxyle (HO[•])

Est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec les ions métalliques comme par exemple le Fer. Avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. (Potterat, 1997 ; Dacosta, 2003 ; Hennebelle, 2006)

Il attaque presque toutes les molécules dans le corps. À cause de sa réactivité, il ne diffuse pas loin de son point de synthèse. Ce radical est à l'origine du début de la peroxydation des lipides des membranes cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1985 ; Halliwell, 1991). Les produits de cette peroxydation sont mutagéniques et cancérigènes (Miyake et *al.*, 1999). Le radical hydroxyle est formé *in vivo* par des irradiations à grande énergie qui catalysent le processus de retrait de l'eau hémolytique ou dans un métal (Fenton et réaction Haber-Weiss) (Halliwell, 1991 ; Halliwell et Gutteridge, 1987). Ce radical réagit réciproquement avec les bases puriques et pyrimidiques de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et provoque la destruction de ce dernier. Cette espèce de l'oxygène réactive peut complexer les atomes d'hydrogène des molécules biologiques, comme les thiols pour former des radicaux soufrés capables de se lier à l'Oxygène pour produire des radicaux de l'oxysulfure qui causent la dégradation de ces molécules biologiques (Halliwell, 1991).

IV-1-2-4- Oxyde nitrique (NO[•])

Produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique et joue aussi un rôle de messenger interneuronal. Il peut avoir un rôle néfaste. (Potterat, 1997 ; Dacosta, 2003, Hennebelle, 2006).

IV-2- Le stress oxydatif

IV-2-1- Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd et *al.*, 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999).

IV-2-2- Origine du stress

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants /prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant » (Favier, 2003).

IV-3- Définition d'un Antioxydant

Comme leur nom l'indique, les antioxydants protègent l'organisme de l'oxydation. Ce sont des substances qui sont capables de supprimer, retarder ou empêcher les processus d'oxydation au stade de l'initiation ou de la propagation (Pszczola., 2001 ; Klein et Kurilich., 2000 ; Velioglu *et al.*, 1998). Les antioxydants sont aussi définis comme des substances présentes dans les aliments et qui agissent sur les fonctions physiologiques de l'homme en diminuant de façon significative les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène, des espèces oxygénées azotées, ou des deux (Food and Nutrition Board of the National Academy of Science, 1998).

Shahidi (2002) les définit comme des composés possédant des fonctions capables de complexer les radicaux libres en leur donnant un électron ou un atome d'hydrogène ou en désactivant les ions métalliques et l'oxygène singulet empêchant ainsi leur action pro-oxydante. Les antioxydants sont également considérés comme des substances dont le rôle premier est de prévenir la dégradation induite par la réaction des radicaux libres (Morello *et al.*, 2002).

IV-3-1- Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneur d'atome d'hydrogènes ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (Berset et Cervelier, 1996).

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

IV-3-2- Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Gardès-Albert, 2003).

Groupe I

Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain breaking, piègeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire. Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxylés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO·), en comparaison avec les autres radicaux comme le (RO·) et la faible concentration du piègeur du radical libre dans l'aliment. Un piègeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (Frankel et *al.*, 2000 ; Huang et *al.*, 2005).

Groupe II

Les composés de ce groupe sont catalogués comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piègeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydatives, enzymes antioxydantes et destructeurs des hydroperoxydes.

Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piègeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singulets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller et *al.*, 1996).

IV-3-3- Classification des antioxydants suivant la nature chimique

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation. Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow, 1990 ; Evans et *al.*, 1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées (Namiki, 1990 ; Wanasundara et *al.*, 1994; Larson, 1997 ; Pietta, 2000 ; Moure et *al.*, 2001).

IV-3-3-1- Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Diplock, 1991).

IV-3-3-1-1- Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (La superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

a- Les superoxydes dismutases (SOD)

La famille des superoxydes dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H_2O_2 et O_2 (Antwerpen, 2006).

L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc (Goudable et Favier, 1997).

b- Les catalases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux (Lindau-Sehpar et Shaffer, 1993).

c- Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (Marfak, 2003) : La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG.

Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH : Cette réaction produit du $NADP^+$ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déshydrogénase)

IV-3-3-1-2- Les antioxydants non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans

doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires.

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Trivalle, 2002).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables. La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Bruneton, 1999).

DEUXIÈME PARTIE :

ETUDE

EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I :
MATÉRIELS
ET
MÉTHODES

I- Matériels et méthodes

I-1- Matériels

I-1-1- Site et conditions d'échantillonnage

Le matériel végétal utilisé est composé de feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta*. Ces différents organes ont été cueillis en mars 2012 ; période correspondante à la saison de floraison, dans une zone localisée dans la commune de Jdiouia (Planche 4). Cette dernière est distante de 35Km à l'Est du Chef –lieu de la wilaya de Relizane (Algérie) et située à 83m d'altitude, 35°55'33''N de l'attitude et 0°49'23''E de longitude.

Les prélèvements, réalisés d'une manière aléatoires, ont été transportés dans des sacs en plastique noir jusqu'au laboratoire.



Planche 4 : A = vue général d'un arbuste de *Thymelaea hirsutra*, B = vue générale de la zone d'échantillonnage.

I-1-2- Drogue végétale

Au laboratoire, les rameaux de *Thymelaea hirsuta* fraîchement récoltés ont été étalés à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin de préserver, au maximum, l'intégrité des molécules. Le séchage étant le moyen de conservation le plus simple, sa durée dépend de la teneur en eau dans le végétal, ainsi que la température ambiante.

Après séparation, les différents organes (feuilles, fleurs et brindilles) ont été mis à sécher quelques jours à l'étuve à une température relativement stable de $36 \pm 1^\circ \text{C}$, jusqu'à obtention d'un poids fixe (matière sèche). Ces parties végétatives ont été, ensuite, finement broyées à l'aide d'un mortier en porcelaine. Le broyage a permis de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire et de libérer, en même temps, les organites et les molécules contenues dans la cellule

(Lafont et Duval, 2001). Sous cette forme, la drogue présente une plus grande surface de contact avec le solvant extracteur et permet ainsi d'améliorer le rendement des extractions (Bonnaillie et *al.*, 2012).

Pour son utilisation ultérieure et afin d'empêcher sa photo-oxydation, la drogue a été conservée à l'obscurité dans des bocaux hermétiquement fermés. Les précautions prises visent à réduire les divers mécanismes de dégradation relatifs aux caractères organiques de ses matières premières (Ferrari, 2002), à savoir la dénaturation des métabolites secondaires tels que les huiles étherées (évaporation au delà de 40° C)..... (Kümkele et Lobmeyer, 2007).

I-2- Méthodes

I-2-1- Préparation des extraits

La méthode d'extraction employée est la décoction à 10% (Kumar et *al.*, 2010). 100g de drogue végétale (feuilles, fleurs et brindilles) broyée ont été trempés dans un litre d'eau distillée, ce solvant a été choisi pour son action non destructive (Haya et Amour, 1992). Le mélange, recouvert de papier aluminium a été agité mécaniquement puis porté dans un bain marie à 90° C pendant 1 heure. Après refroidissement, un filtrat a été récupéré dans un flacon opaque hermétiquement fermé à l'aide d'un filtre en microfibrilles de verre de Wattman (Senhaji et *al.*, 2005). La lyophilisation du filtrat constitue la dernière étape de la préparation d'un extrait sec ; celle-ci permet la meilleure conservation de la matière végétale.

I-2-2- Compositions chimiques

I-2-2-1- Screening phytochimique

Un criblage classique a été réalisé en vue de déterminer les grands groupes de composés chimiques présents dans les différentes parties de *Thymelaea hirsuta* (feuilles, fleurs et brindilles). Il est fondé sur des réactions de coloration ou de précipitation à l'aide de réactifs appropriés et a permis de suggérer la présence de certaines classes de phyto-constituants.

Les résultats sont classés selon l'apparition en :

- Réaction franchement positive : + + +
- Réaction positive : + +
- Réaction moyennement positive : +
- Réaction négative : -

I-2-2-1-1- Flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine. A l'infusé à 5% (5ml), ont été ajoutés un acide (5ml de H₂SO₄ à 10%) puis une base (5ml de NH₄OH). Si la

coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacé en milieu basique, cela confirme la présence d'anthocyanes.

- Mise en évidence de la réaction à la cyanidine

Après avoir introduit dans un tube à essai 5ml d'infusé et 5ml d'alcool chlorhydrique (éthanol 95%, eau distillée et HCl concentré à volumes égales), quelques copeaux de magnésium et 1ml d'alcool iso-amylique ont été ajoutés. L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool iso-amylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génines). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les iso-flavones.

- Mise en évidence des Leucoanthocyanes

Une réaction à la cyanidine a été effectuée sans ajouter les copeaux de magnésium et chauffée au bain-marie pendant 15min. La présence de leucoanthocyanes a été indiquée par le développement d'une coloration rouge cerise ou violacée. Les catéchols donnent une teinte brun-rouge.

- Mise en évidence des flavanes

Deux millilitres d'infusé à 10% ont été mélangés à l'acide chlorhydrique concentré renfermant de la vanilline (2%). La réaction positive a été révélée par l'apparition d'une coloration rouge (Harborne, 2005).

I-2-2-1-2- Stérols et triterpènes

Les stérols et les polyterpènes ont été mis en évidence par la réaction de Liebermann. Deux grammes (2g) de poudre végétale ont été mis dans 40ml d'éther. Après une macération de 24 heures, le mélange a été filtré et complété à 20ml (extrait éthérique). Ensuite, 10ml de l'extrait ont été évaporés à sec au bain-marie et le résidu a été repris et dissout avec 1ml d'anhydride acétique, puis 1ml de chloroforme CHCl_3 . Cette solution a été partagée entre deux tubes à essai, l'un servant de témoin, alors que dans le second 2ml de H_2SO_4 concentré ont été coulés. La présence des stérols et des triterpènes a été révélée par la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, et la couche surnageante devenant verte ou violette, comme rapporté par Harborne (2005).

I-2-2-1-3- Caroténoïdes

Après évaporation à sec de 5ml de l'extrait éthéré (préparation précédente), 2 à 3 gouttes d'une solution saturée de trichlorure d'antimoine SbCl_3 ont été ajoutées dans le chloroforme

ou dans le tétrachlorure de carbone (CCl₄). La présence de caroténoïdes a été révélée par le développement d'une coloration bleue devenant rouge par la suite (Harborne, 2005).

I-2-2-1-4- Tanins

La présence des tanins a été mise en évidence par la réaction au chlorure de fer (III) dans l'infusion à 5% par l'addition de quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃) 1%. La réaction au FeCl₃ provoque l'apparition de précipité ou de coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

- Mise en évidence des tanins catéchiques

Cinq millilitres d'infusé ont été ajoutés à 5ml d'HCl concentré. L'ensemble a été porté à ébullition pendant 15min puis filtré sur papier filtre. En présence des tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge soluble dans l'alcool iso-amylique.

- Mise en évidence des tanins galliques par la réaction de Stiasny

Trente millilitres d'infusé ont été ajoutés à 15ml de réactif de Stiasny (10ml de formol 40% et 5ml d' HCl concentré), le mélange a été maintenu au bain-marie à 90° C pendant 15min environ. Après filtration, le filtrat a été saturé par 5g d'acétate de sodium pulvérisée. Ensuite, 1ml goutte à goutte d'une solution de FeCl₃ 1% a été ajouté. La présence des tanins galliques a été montrée par l'obtention d'un précipité (Harborne, 2005).

I-2-2-1-5- Saponosides

Les saponines ont été mises en évidence par le test de mousse dans les décoctés à 1%. 100ml de ce décocté ont été répartis dans 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10 successivement 1, 2,...10ml. Le volume de chaque tube a été ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée puis agité pendant 15 secondes dans le sens de la longueur. Après un repos de 15 minutes, la hauteur de la mousse a été mesurée. Un indice supérieur à 100 a été considéré comme une réaction positive témoignant d'une richesse de la plante en saponosides (Harborne, 2005). Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de l'ordre d'un cm permet de calculer l'indice de mousse.

$$\text{Indice de mousse (Idm)} = 10 / n \times 10^{-2}$$

Où :

n : numéro du tube dans lequel la hauteur de la mousse est égale à 1cm.

I-2-2-1-6- Coumarines

La recherche des coumarines a été basée sur la propriété que possèdent la plupart d'entre elles, de présenter une fluorescence nette aux rayons ultraviolets. Cinq millilitres (5ml) d'extrait éthéré obtenu après une macération de 24 heures ont été évaporés à l'air libre, puis repris avec 2ml d'eau chaude. La solution a été partagée entre 2 tubes à essai. La présence de coumarines s'est manifestée après ajout dans l'un des tubes de 0,5ml de NH₄OH à 25% et observation de la

fluorescence sous UV à 366nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines, l'autre tube sert de témoin (Raman, 2006).

I-2-2-1-7- Anthocyanes

À deux millilitres d'infusé (5%) ont été additionnés à 2ml d'acide chlorhydrique 2N. La présence d'anthocyanes a été montrée par l'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacée par addition d'ammoniac (Senhaji et *al.*, 2005).

I-2-2-1-8- Proanthocyanidols

Deux millilitres d'infusé ont été additionnés à 2ml d'acide chlorhydrique concentré. Ensuite, le mélange a été maintenu au bain-marie bouillant pendant cinq minutes. Une réaction positive s'est manifestée par l'apparition d'une coloration rouge (Senhaji et *al.*, 2005).

I-2-2-1-9- Quinones

Les quinones ont été mises en évidence par la réaction de Brissemoret et Combes. 1g de poudre de la plante a été introduit dans un erlenmeyer de 250ml, puis humecté avec H₂SO₄ dilué à 10%. Ensuite, 20ml d'un mélange à volume égal d'éther et de chloroforme ont été ajoutés et laissé réagir pendant 24 heures. Après filtration, 5ml du filtrat a été placé dans une capsule et évaporé à sec, puis le résidu a été repris par quelques gouttes d'alcool 95°. Une solution d'acétate de Nickel 5% a été ajoutée. Selon la nature de la quinone, il est apparu :

Une coloration bleue et précipité : Benzoquinones ;

Une coloration violette et précipité : Naphtoquinones ;

Une coloration rouge sans précipité : Anthraquinones (Harborne, 2005).

I-2-2-1-10- Mucilages

Après avoir introduit 1ml de décocté (10%) dans un tube à essai, 5ml d'éthanol absolu ont été ajouté, suivi d'une agitation. Le mélange a été reposé pendant une dizaine de minutes et la présence de mucilage dans la drogue a été indiquée par l'obtention de précipité floconneux (Amadou, 2005).

I-2-2-1-11- Oses et holosides

Cinq millilitres de décocté ont été introduits dans un bécher de 100ml et évaporés au bain-marie à sec. Au résidu, il a été ajouté 2 à 3 gouttes de H₂SO₄ concentré. Après 5mn, 3 à 4 gouttes d'éthanol saturé ont été additionnées avec du thymol. La présence d'oses et holosides a été révélée par le développement d'une coloration rouge (Muanda, 2010).

I-2-2-1-12- Composés réducteurs

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans les décoctés par le réactif de Fehling (Annexe I). Après avoir introduit 5ml de décocté dans un bécher de 100ml, la solution a été

évaporée à sec au bain-marie. Au résidu, a été ajouté 1ml de réactif de Fehling (0,5ml de réactif A et 0,5ml de réactif B, mélange extemporané). La présence de composés réducteurs a été révélée par l'obtention d'un précipité rouge-brique (Mogode Debete, 2005).

I-2-2-1-13- Stupéfiants

0,5g de poudre ont été pesés et introduit dans un tube à essai. Ensuite, 5ml d'éther de pétrole ont été ajoutés. Le mélange a subi une agitation pendant 15min. Après décantation de la phase éthéro-pétrolique dans une capsule et évaporation à sec au bain-marie, 3 à 4 gouttes de KOH 5% ont été ajoutés dans l'alcool. La présence de tétrahydrocannabinols a été indiquée par une coloration violette (Diallo, 2005).

I-2-2-1-14- Protéines

Les protéines ont été mises en évidence par la méthode de Lowry. A 1ml d'extrait végétal, 5ml de solution A (98ml de Na_2CO_3 à 2% dans NaOH 0,1N, 1ml de sulfate de cuivre à 1% et 1ml de tartrate double de potassium sodium) ont été additionnés. Après avoir agité et laissé au repos pendant 10 minutes, 0,5ml de réactif de Folin ont été ajoutés. Ensuite, le mélange a été agité énergiquement puis laissé reposer pendant 30 minutes. La présence de protéines a été indiquée par l'apparition d'une coloration bleue (kone, 1998)

I-2-2-1-15- Hétérosides cardiotonique

La solution à analyser a été obtenue par addition à 1g de poudre, 10ml d'alcool 60° et 5ml d'une solution d'acétate de plomb neutre à 10%. Cette solution a été portée au bain-marie bouillant pendant 10 minutes puis filtrée sur coton. Le filtrat a été agité avec 10ml de chloroforme (CHCl_3) sans former d'émulsion (mettre dans une ampoule à décanter). Après une décantation, la phase chloroformique a été soutirée (à l'aide d'une pipette) et partagée entre 3 tubes à essai. Evaporés au bain-marie à sec, les résidus ont été repris avec 0,4ml d'iso-propanol. Dans le tube 1, un millilitre de réactif de Baljet (Annexe I), dans le tube 2, un millilitre de réactif de Kedde (Annexe I) et dans le tube 3, un millilitre de réactif de Raymond-Marthoud (Annexe I) ont été introduits. Quatre gouttes de potasse (KOH 5%) dans l'éthanol ont été ajoutées à chaque tube et observé après une dizaine de minutes. En présence de cardénolides, les colorations suivantes se développent : tube1 : orangée, tube 2 : rouge violacé, tube 3 : violet fugace (Diallo, 2005).

I-2-2-1-16- Hétérosides cyanogénique

Cinq millilitres d'un mélange à volume égal d'eau et de toluène ont été ajoutés dans un tube à essai contenant 1g de poudre végétale. La partie supérieure du tube a été nettoyée puis mis en contact avec le bout du papier Picrosodé (Annexe I) trempé de réactif de Guignard (Annexe I).

Après 10 minutes, le rougissement du papier Picrosodé a été traduit par la présence d'hétéroside cyanogénique ; la couleur rouge est due à l'acide cyanhydrique (Diallo, 2005).

I-2-2-1-17- Dérivés anthracéniques

-Mise en évidence des anthraquinones libres par le test de Bornsträger

A 1 gramme de poudre, 10ml de chloroforme ont été ajoutés. Le mélange a été chauffé pendant 3mn au bain-marie puis filtré à chaud et complété à 10ml. Ensuite, à 1ml de l'extrait chloroformique obtenu, 1ml de NH_4OH dilué a été additionné et agité. La présence d'anthraquinones libres a été indiquée par la coloration plus ou moins rouge.

-Mise en évidence des anthraquinones combinées

- Les O-hétérosides

A partir du résidu de la drogue épuisée par le chloroforme, un hydrolysate a été préparé auquel a été ajouté 10ml d'eau et 1ml d' HCl concentré. Dans un tube à essai, l'ensemble a été ensuite maintenu au bain-marie bouillant pendant 15min. 5ml de l'hydrolysate ont été agités avec 5ml de chloroforme. Après décantation, la phase organique a été soutirée et mise dans un tube à essai. Celle-ci a été agitée avec 1ml de NH_4OH dilué au demi. La présence d'anthraquinone a été révélée par la coloration rouge plus ou moins intense qui indique la présence de génines O-hétérosides. Si la réaction est négative ou faiblement positive, la recherche des O-hétérosides à génine réduite est nécessaire.

- Les O- Hétérosides à génines réduites

Dans un tube à essai, 5ml d'hydrolysate et 3 à 4 gouttes de FeCl_3 (chlorure ferrique) à 10% ont été introduits. Le tout a été porté au bain-marie bouillant pendant 5 minutes puis refroidi sous courant d'eau. Après agitation de la solution avec 5ml de chloroforme, la phase chloroformique a été soutirée et introduite dans un tube à essai contenant 1ml de NH_4OH dilué au demi. Ensuite, le mélange a été agité. En présence de produit d'oxydation anthranol, anthrone, la coloration rouge sera plus intense que précédemment.

- Les C-hétérosides

La phase aqueuse, qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides, a été reprise par 10ml d'eau distillée et 1ml de FeCl_3 10%. Puis, le tube à essai a été maintenu dans un bain-marie bouillant (après ébullition) pendant 30 min. Après refroidissement sous courant d'eau, la solution a été agitée avec 5ml de chloroforme. La phase chloroformique soutirée a été secouée avec 1ml de NH_4OH dilué. L'existence des C-hétérosides est confirmée par la coloration plus ou moins rouge après agitation qui indique la présence de génines C-hétérosides (Diallo, 2005).

I-2-2-1-18- Alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été mis en évidence grâce aux réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Le réactif de Dragendorff (Annexe I) (réactif à l'iodobismuthate de potassium) et le réactif de Mayer (réactif à l'iodomercurate de potassium) ont été utilisés. Une Solution à analyser a été préparée avec 10g de poudre végétale séchée et 50ml de H₂SO₄ 10%. Après agitation, le mélange a été macéré pendant 24 heures à la température du laboratoire puis filtré sur papier filtre et rincé à l'eau distillée de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite, une caractérisation par précipitation a été effectuée. Dans trois tubes à essai, 1ml de filtrat a été introduit et 5 gouttes de réactif de Mayer (Annexe I) dans le premier tube, 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le second et en se servant d'un troisième tube sans réactif comme témoin. Après 15 minutes, la présence des alcaloïdes a été indiquée par la formation d'un précipité : blanc-jaunâtre dans le premier tube, orange dans le deuxième tube et orange abondant dans le tube témoin (Harborne, 2005).

I-2-2-2- Analyse phytochimique

I-2-2-2-1- Détermination des composés phénoliques totaux

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des composés phénoliques totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé (Boizot et Charpentier, 2006).

Les teneurs en phénols totaux des décoctés ont été déterminées par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par Miliauskas et *al.* (2004). Brièvement, 1ml (0,1%) de l'extrait aqueux a été mélangé avec 5ml de Folin Ciocalteu (2M) dilué 10 fois. Après 5 minutes d'incubation, 4ml de carbonate de sodium à concentration de 75g/l ont été additionnés. Un blanc a été préparé avec le lyophilisat végétale en remplacement du réactif avec de l'eau. De même, un étalon a été réalisé avec des concentrations croissantes d'acide gallique (standard) allant de 0 à 6mg/l. Après une heure d'incubation, à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 765nm contre le blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre de type JENWAY 6517. L'expression des résultats a été obtenue à partir de l'équivalence du standard (acide gallique) par gramme de lyophilisat (mg EAG/g).

I-2-2-2- Détermination des flavonoïdes totaux

La teneur des flavonoïdes totaux contenus dans les extraits feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta* a été déterminée en appliquant la méthode décrite par Chang *et al.* (2002).

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner avec le groupement CO un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fer et Aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

Un volume de 0,75ml d' AlCl_3 (2%) a été mélangé à un volume égal d'extrait. Les densités optiques ont été lues à 430nm après 10 minutes d'incubation à l'aide du spectrophotomètre, contre une courbe étalon préalablement tracée avec la quercétine comme substance de référence. Les expressions des résultats ont été obtenues à partir de l'équivalence du standard (quercétine) par gramme de lyophilisat (mg EQ/g).

I-2-2-3- Détermination des sucres totaux

Les sucres totaux ont été dosés en appliquant les techniques de la méthode de dosage direct avec du phénol (Dubois *et al.*, 1956). En présence de l'acide sulfurique concentré, les oses sont déshydratés en composés de la famille des dérivés furfuriques. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner des complexes jaune-orangés. La teneur en sucres totaux a été déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490nm (Goodon, 1997).

Un millilitre de la solution phénolique ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$) à 5% a été ajouté à des concentrations croissantes de la solution standard de maltose (0,1%). Ensuite, 5ml d'acide sulfurique concentré ont été additionnés. Après homogénéisation douce du mélange réactionnel et refroidissement, la densité optique a été mesurée. Les différents décoctés ont été soumis à l'analyse comme dans le cas de la réalisation de l'étalon. L'expression des teneurs en sucres totaux a été obtenue à partir de l'équivalence du standard par milligramme de lyophilisat végétale (mg EMA/g).

I-2-2-4- Détermination des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs (en raison de leurs groupements carbonyle libres $\text{C}=\text{O}$) réagissent avec le DNS (acide di-nitrosalicylique) en le réduisant en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, ce qui se traduit par une coloration orangée. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres réducteurs (Barbin, 2006).

Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode de Miller (1959). Ainsi, 1ml d'échantillon à doser (1%) a été ajouté à 1ml de réactif au DNS (Annexe I). Ensuite, le mélange a été porté à ébullition pendant 5min et refroidi rapidement. Après addition de 10ml d'eau distillée, le contenu

des tubes a été homogénéisé au vortex, et la densité optique a été lue à 540nm. La courbe d'étalonnage a été réalisée avec une solution de maltose de 0 à 1g/l. Les résultats ont été exprimés en équivalent maltose par milligramme de lyophilisat (mg EMA/g).

I-2-2-2-5- Détermination des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été effectué selon la méthode de Broadhurst et Jones (1978), modifiée par Heimler et *al.* (2006). Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de la vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield et *al.*, 2001). Ainsi, 400µl de chaque extrait ont été ajoutés à 3ml d'une solution méthanolique à 4% de vanilline. Ensuite, 1,5ml d'acide chlorhydrique concentré ont été additionnés. Après 15min de réaction, l'absorbance a été lue à 550nm. La concentration des tanins condensés a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (100-1000µg/ml). Les résultats ont été exprimés en équivalent catéchine par milligramme de lyophilisat (mg EC/g).

I-2-2-2-6-Analyses chromatographiques

La chromatographie est une technique d'analyse qualitative et quantitative de la chimie analytique dans laquelle l'échantillon contenant un ou plusieurs composés est adsorbé sur une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée), puis est désorbé par une phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique). Les différents composés de l'échantillon sont séparés en fonction de leurs vitesses d'adsorption-désorption.

I-2-2-2-6-1- Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend des différences d'affinité pour le solvant et pour la phase stationnaire.

Les extraits préparés ont été analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince. Les plaques de silice utilisées sont de dimensions 20 x 20cm (Silica gel 60F₂₅₄, Merck). Des dépôts de 10µl de chaque extrait (100mg/ml) et standards (5mg/ml) ont été effectués. La plaque de silice a été ensuite placée dans une cuve contenant l'éluant suivant : chloroforme : acétate d'éthyle : acide formique (50 :40 :10 v/v/v) (Riov et Gottlieb, 2006). Après migration et développement, les plaques ont été séchées à l'aide d'un sèche-cheveux et observées à la lampe UV à 254 et 365nm puis pulvérisées avec une solution de réactif de NEU (2 - aminoéthylidiphénylborate de sodium à 1% dans le méthanol). Les flavonoïdes affichant une fluorescence jaune ont été visualisés sous UV

à 365nm. Les rapports frontaux Rf obtenus sont comparés au Rf obtenus pour des flavonoïdes standards utilisés comme références.

Le rapport frontal (Rf) a été déterminé pour chaque constituant comme suit :

$$Rf = d/D$$

Où :

d : Distance parcourue par le constituant ;

D : Distance parcourue par le front de l'éluant.

I-2-2-2-6-2- Détermination des lipides

Ce travail a été effectué à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rennes en France (Laboratoire physiologie, environnement et génétique pour l'animal et les systèmes d'élevage (PÉGASE), INRA de Rennes, France 35590).

I-2-2-2-6-2-1- Extraction des lipides totaux

Dans le but de déterminer la quantité des lipides totaux dans des échantillons biologiques, la technique folch a été recommandée. Les lipides extraits par cette technique à froid ne sont pas altérés. Cette méthode a été basée sur l'utilisation des solvants organiques (chloroforme/méthanol) pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires. Après centrifugation, un système biphasique a été obtenu : une phase surnageante contenant tous les composés non-lipidiques, et une phase organique contenant la quasi-totalité des lipides.

Pour se faire 10g de chacun des organes ont été homogénéisés en présence de 6ml de réactif de Folch (4ml de chloroforme et 2ml de méthanol) pendant 2min. Les mélanges obtenus ont été filtrés et les filtrats ainsi obtenus ont été versés dans des ampoules à décanter. La séparation des phases a été effectuée à l'aide de la solution de chlorure de sodium (NaCl) à 73% à raison d'1 volume de NaCl pour 4 du filtrat, suivi d'une agitation de 2h. Après décantation, les phases apparaissent incolores, limpides et séparées par un ménisque ; la phase inférieure (chloroforme - lipides) a été filtrée sur du sulfate de sodium qui a la propriété d'absorber l'eau. Une évaporation sous vide du chloroforme a été opérée, et le pourcentage des lipides totaux (% LT) a été calculé selon l'équation suivante (Folch et *al.*, 1957) :

$$\% \text{ LT} = (\text{Poids ballon plein} - \text{poids ballon vide}) \times 100 / \text{poids de l'échantillon.}$$

I-2-2-2-6-2-2- Détermination du profil des acides gras

-Préparation des esters méthyliques

Dans l'optique de déterminer le profil des AG par chromatographie phase gazeuse (CPG), les lipides ont été préalablement saponifiés, puis méthylés selon le procédé suivant : 20mg de lipides secs mélangés avec 1ml de la solution méthanolique de soude 0,5N ont été enfermés dans un

tube à essai et plongés dans un bain marie à 70°C pendant 15min. Une fois le temps écoulé, le tube a été débouché et 1ml d'une solution de BF₃ 14% (trifluorure de bore) a été ajouté. Le tube a été refermé et mis à méthyler 10min au bain d'eau à 70°C. L'addition de 6ml d'eau distillée a permis de suivre l'extraction des esters par 2ml d'éther de pétrole. Les esters obtenus ont été concentrés sous courant d'azote puis conservés à 4°C pour une ultérieure analyse chromatographique (Morrisson et *al.*, 1964).

-Analyse chromatographique

Les esters méthyliques d'acides gras ont été analysés par un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL. Cet appareil est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (air hydrogène) et muni d'un passeur automatique d'échantillons, et d'une colonne capillaire polaire en silice (longueur de 30 mètres et diamètre de 0,25mm ; Supelco) avec une phase stationnaire de 80% de biscyanopropyl et 20% de cyanopropylphényl siloxane. L'échantillon liquide d'acides gras a été injecté dans la colonne à l'état vaporisé (la température de l'injection est de 220°C). La température de la colonne s'élève par des plateaux (T°1 : 45° C ; T°2 : 195° C ; T°3 : 220°C ; T°4 : 240°C) programmées respectivement pendant 2 - 7 et deux fois 2min avec des augmentations de 20° C/min, 30° C/min et 35° C/min entre les plateaux pour une durée d'analyse totale de 22min, suivie d'un programme de refroidissement. Les acides gras ont été brûlés dans la flamme du détecteur (T° = 240° C). L'identification des différents acides gras a été faite par comparaison des temps de rétention et leur quantification en se référant à l'étalon interne (C17 : 0 permet la quantification des AG). Les acides gras identifiés ont été exprimés en pourcentage des AG totaux.

I-2-2-2-6-3- Profilage par LC-MS et LC-MS/MS avec source Electrospray (ESI)

Les analyses ont été réalisées en collaboration avec l'équipe « chimie bioorganique » (équipe n°8) du Laboratoire de Chimie et Physique – Approche Multiéchelle des Milieux Complexes (LCP-A2MC, Université de Lorraine-site de Metz).

La spectrométrie de masse est une technique de caractérisation chimique qui consiste à mesurer les rapports masse/charge (m/z) des atomes ou des molécules présents dans un échantillon donné (De Hoffmann et Stroobant, 2005) dans le but de les identifier et de déterminer leurs structures chimiques. Il s'agit d'une technique d'analyse de pointe permettant de déterminer les analytes en fonction de leurs masses moléculaires et de leur fragmentation. Le fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ sur une particule chargée. Lorsqu'un échantillon est introduit dans un spectromètre de masse, il est vaporisé et transformé en ions de masses distinctes. L'analyseur permet ensuite de trier l'ensemble des ions générés lors du processus d'ionisation, de mesurer leurs masses, de déterminer leur abondance et, éventuellement, de les

fragmenter pour conduire à des ions de plus faible masse utiles à la confirmation des structures moléculaires (El tahchy. A., 2010).

L'ionisation par électrospray (ESI, Electrospray Ionisation) repose sur l'introduction de l'échantillon à analyser en solution dans un capillaire porté à un potentiel élevé (positif ou négatif). Sous l'action d'un champ électrique obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6kV entre un capillaire (électrode) et une contre-électrode séparés de 0,3 à 2cm, des charges vont s'accumuler à la surface de l'effluent conduisant à la rupture de celui-ci et à la formation d'un spray de gouttelettes fortement chargées ou «cône de Taylor». Ce processus de nébulisation est en général assisté par un gaz chauffé. Les microgouttelettes ainsi formées vont progressivement rétrécir par évaporation de molécules de solvant, puis éclater sous l'effet d'une densité de charge trop importante, et au final libérer des ions moléculaires protonés ou déprotonés en phase gazeuse. L'interface entre la source ESI et l'analyseur est souvent constituée de série de lentilles voire de quadripôles focalisant et transférant les ions parents jusqu'à l'analyseur. Des flux de gaz (exemple : gaz rideau) sont également ajoutés dans le but d'éviter la contamination de l'électronique de transfert par des espèces neutre (De Hoffmann et Stroobant, 2005). Cette méthode est beaucoup mieux adaptée aux échantillons contenant des composés ioniques à moyennement polaires car elle préserve l'ion moléculaire contrairement aux sources à impact électronique par exemple. L'échantillon peut être infusé (utilisation d'une pompe seringue sans séparation préalable des composés d'un mélange) ou introduit par chromatographie en phase liquide (couplage LC-MS).

Le lyophilisat (5mg) a été repris dans 1ml d'un mélange méthanol-eau (50/50, v/v). L'échantillon est ensuite ultrafiltré (10min à 1000 tour/min sur centrifugeuse Eppendorf) sur concentrateur Amicon Ultra 0,5ml (cut-off 30 kDa, Millipore) avant d'être dilué au $1/10^{\text{ème}}$ dans du méthanol. Vingt μl de l'échantillon final ont été injectés sur la chaîne chromatographique via son injecteur automatique. Les trois extraits aqueux des différents organes de *Thymelaea hirsuta* ont été injectés en mode d'ionisation positif (détection des métabolites polaires neutres et basiques) et en mode négatif (métabolites acides et (poly) phénoliques).

-Conditions de séparation en chromatographie liquide

La séparation chromatographique est réalisée sur une chaîne HPLC Dionex Ultimate 3000, équipée d'une colonne Waters Symmetry Shield phase inverse C18 de diamètre interne de 3,5 mm et de dimensions 4,6mm x 50mm. La phase mobile est composée d'acétonitrile (ACN, solvant "A") et d'eau (solvant "B"). Un gradient linéaire d'une durée de 40min de 20 à 90% d'ACN dans l'eau est programmé pour chaque expérience avec le four de la colonne maintenu à 30° C, le débit de pompe fixé à 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ et un volume d'injection de 20 μl . Entre chaque run, du solvant pur est

injectée avec une phase mobile composée de 20% d'ACN et de 80% d'eau afin de rééquilibrer la colonne.

-Conditions ESI-MS

La chaîne chromatographique est couplée à un spectromètre de masse de type IonTrap modèle LTQ Velos dual Pressure Linear Ion Trap (ThermoFisher Scientific).

Les conditions finales de la source sont les suivantes :

Paramètres	Valeur
Température de source	400 °C
Gaz de nubilisation (a.u.)	60
Gaz auxiliaire (a.u.)	20
Gaz de balayage (a.u.)	5
Potentiel	± 4,60* kV
Température du capillaire	380 °C

* selon la polarité des ions étudiés

-Logiciels

Le système de couplage est piloté par le logiciel *Xcalibur* (Thermo, version 2.2). Ce programme permet de créer des séquences entièrement automatisées. Les exploitations des chromatogrammes ont été réalisées avec le module *Qual Browser* du logiciel *Xcalibur*.

I-2-3-Activités biologiques

I-2-3-1- Evaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits végétaux traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. Trois méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antiradicalaire des extraits : DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) et FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

I-2-3-1-1- Test du piégeage des radicaux DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est défini comme radical libre stable par vertu de la délocalisation de l'électron disponible qui provoque la couleur violette profonde, caractérisée par une absorption. Il réagit avec les groupements amines, les phénols, les acides, les composés hydro-aromatiques, etc... Cette propriété est largement recommandée et utilisée dans la pratique analytique. Quand la solution de DPPH est mélangée à une substance qui peut donner un atome d'hydrogène ou un électron, provoquera sa réduction (1,1-diphényl-2-(2, 4,6- trinitrophenyl)

hydrazine (DPPH₂) avec la perte de la couleur violette et apparition d'une couleur jaune pâle résiduelle due à la présence de groupement picryl (Molyneux, 2004).

La mise en évidence du pouvoir antioxydant, via le test DPPH, a été effectuée par la méthode décrite par Zakaria et al. (2008), où 50µl de chacun des extraits méthanoliques à différentes concentrations ont été mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorbance a été lue à 517nm. Comme précédemment, l'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique a été analysée.

La capacité antioxydante des extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH selon la formule suivante:

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

Où :

A blanc : Absorbance du blanc (absorbance de la solution en absence de molécules testées).

A échantillon : Absorbance de la solution en présence de molécules testées.

I-2-3-1-2- Test du piégeage des radicaux ABTS⁺

Cette méthode est basée sur la décoloration d'un cation radicalaire stable, ABTS⁺ (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) en ABTS en présence de composés antiradicalaires car le cation radicalaire chromophore ABTS⁺ de couleur bleu-vert directement produit par réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium a une absorption maximale à 734 nm (Ré et al., 1999).

A une solution d'ABTS dans l'eau 7mM ont été ajoutées une solution de persulfate de potassium à 2,45mM pour obtenir une concentration finale de 3,5mM. Le mélange a été agité une nuit dans le noir à température ambiante pour former le radical cation ABTS⁺. Avant utilisation, la solution a été diluée dans de l'éthanol afin d'obtenir une absorbance voisine de 0,70 à 734nm.

A cinq millilitres de solution d'ABTS⁺ (immédiatement utilisé après préparation), 50µl de cette solution ont été ajoutés à chaque série d'extrait (0,2, 0,4, 0,6 et 0,8mg/ml). Après 10min d'incubation, l'absorbance des solutions a été mesurée à 734nm (Huang et al., 2011).

La capacité antioxydante des extraits de *Thymelaea hirsuta* a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS suivant l'équation :

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

Où :

A control : Correspond à l'absorbance du control

A échantillon : Absorbance de la solution en présence de molécules testées

A blanc : Correspond à l'absorbance du blanc (5ml éthanol + 50µl de chaque échantillons)

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; Trolox dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test a été répété 3fois. Alors que le control négatif est constitué par 5mL éthanol au lieu de l'échantillon ou de l'antioxydant de synthèse.

I-2-3-1-3- Test de la réduction de fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Utilisé pour la première fois par **Benzie et Strain (1996)**. Le test FRAP implique la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique ((Fe(III)-TPTZ)₂) en un complexe tripyridyltriazine ferreux ((Fe(II)-TPTZ)₂) par un antioxydant.

Le pouvoir réducteur est relié au degré d'hydroxylation et à la présence des liaisons conjuguées des antioxydants. La réaction nécessite un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer et se base totalement sur le transfert d'électron (Prior et *al.*, 2005).

L'apparition d'une couleur bleu intense (spécifique pour la tripyridyltriazine ferreux ((Fe(II)-TPTZ)₂) lors du contact avec les extraits indique la présence des composés antioxydants. Le changement de couleur est mesuré à 593nm et il est directement relié au pouvoir réducteur des antioxydants (Karadag et *al.*, 2009).

Le test FRAP a été conduit conformément à la méthode proposée par Benzie et Strain (1996) avec certaines modifications. Le réactif FRAP a été préparé chaque jour à partir de tampon acétate 300mM (pH 3,6), de chlorure ferrique hexahydraté (FeCl₃.6H₂O) 20mM et de TPTZ 10mM dans HCl 40 mM. Ces solutions ont été mélangées en proportion respectives : 10/1/1 (v/v/v) et le mélange a été chauffé à une température de 37° C. 0,3ml d'extrait de différentes concentrations (0,2, 0,4, 0,6 et 0,8mg/ml), ont été mélangés avec 300µl d'eau ultra pure et ensuite avec 9ml de réactif FRAP. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance a été immédiatement lue à 593nm au spectrophotomètre. Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; Trolox (0 à 300µmol/l) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances qui ont été obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965).

I-2-3-2- Evaluation, *in vitro*, de l'activité antifongique

L'activité antifongique a été évaluée en partenariat avec le *Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasites (GEIPH, UPRES EA 3142)* au laboratoire de parasitologie, mycologie du CHU d'Angers.

I-2-3-2-1- Microorganismes utilisés et conditions de culture

L'activité antifongique a été évaluée sur les souches suivantes, obtenues auprès du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers (LMA) :

- *Microsporium audouinii* LMA 135345238-51.
- *Trichophyton rubrum* LMA 130142992-03

Ces souches ont été isolées de différents patients du laboratoire d'Angers présentant soit une teigne du cuir chevelu (*M. audouinii*), ou alors une atteinte au niveau de la peau (*T. rubrum*).

Les dermatophytes, ont été cultivés à 25° C pendant 7 jours sur milieu Sabouraud dextrose agar (SDA) additionné de chloramphénicol (Annexe II) et de cycloheximide (Actidione® 0,5g/l) pour éviter une éventuelle contamination par les champignons du genre *Aspergillus*.

I-2-3-2-2- Test de microdilution

Le test de microdilution avait pour objectif de déterminer la concentration inhibitrice minimale (CIM) d'un extrait sur la croissance des souches de champignons dermatophytes en milieu liquide. La méthode utilisée a été adaptée selon la norme M38-A2 du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute (2008) (Alomar et *al.*, 2013) ; méthode de référence pour tests de dilution en milieu liquide pour détermination de la sensibilité d'une thérapie antifongique de champignons filamenteux. La voriconazole a été utilisée comme référence pour les deux dermatophytes.

I-2-3-2-2-1- Préparation des suspensions de spores

Après incubation des deux souches, les suspensions de spores ont été préparées à partir du mycélium de cultures âgées de 7 jours pour *M. audouinii* et 10 jours pour *T. rubrum*, qui a été récupéré par raclage de la surface de culture, à l'aide d'une anse stérile, avec 2 x 10ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été ensuite homogénéisée par broyage au Potter mécanique, filtrée (pour retenir les fragments de mycélium et laisser passer les spores), puis la turbidité a été ajustée à une valeur de D.O. de 0,4 à 450nm.

I-2-3-2-2-2- Préparation et ensemencement du milieu de culture liquide

Conformément aux normes pour la détermination de la sensibilité des colonies vis-à-vis des antifongiques ou autres substances que l'on désire tester. Le milieu de culture utilisé est le RPMI-

1640, comme recommandé par le CLSI pour ce type de tests. Il est constitué de RPMI 1640 (Roswell Park Memory Institute), de L-glutamine de concentration finale 2mmol/l, le tout tamponné à pH = 7 par l'acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique (MOPS) préparée dans l'eau distillée stérile à une concentration de 0,165mol/l en concentration finale. Les extraits à tester ont été solubilisés en DMSO 100% à 1mg/ml et 78µg/ml pour la voriconazole.

La méthode en microdilution a été réalisée en triple pour chaque dilution sur des microplaques de 96 puits. Dans chaque puits de la microplaque ont été déposés 195µl de milieu RPMIensemencé avec la suspension de souche fongique et 5µl du composé à tester aux différentes concentrations. Les concentrations finales se répartissent sur une gamme allant de 1000 à 8µg/ml et de 2 à 0,016µg/ml pour l'antifongique de référence (Voriconazole). Parallèlement, des contrôles de croissance et de stérilité ont été réalisés. Pour la croissance, il y a omission du composé testé mais pas de son solvant (5µl de DMSO pur), et pour la stérilité par omission de la suspension fongique. En outre, un contrôle de solubilité du composé pour chaque dilution a été également effectué par omission de la suspension fongique, en vérifiant l'absence de précipitation. La voriconazole, antifongique de référence a été testée selon la même procédure.

Après répartition des essais et contrôles sur les microplaques, celles-ci ont été mises en incubation à 25° C pendant 7 jours pour les deux dermatophytes étudiés.

I-2-3-2-2-3- Evaluation de l'activité antifongique

La croissance a été finalement appréciée par lecture spectrophotométrique (Dynatech Laboratories MRXTC automatic plate reader) du trouble à 450nm. La concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration la plus faible en composé testé provoquant 100 % d'inhibition de croissance du champignon a été ensuite calculée. Cependant, l'appréciation de ce seuil étant difficile en raison d'une croissance résiduelle fongique toujours présente (phénomène de traîne), la CMI₈₀ a été préférée. Sur la moyenne des triplicats, cette concentration est celle qui induit au moins 80% d'inhibition de croissance, par rapport au témoin de croissance qui correspond à 100% en tenant compte du témoin précipitation du composé. Une lecture visuelle des résultats a, également, été effectuée en utilisant le microscope inversé.

I-2-3-2-3- Concentration fongicide minimale

Le protocole du test de concentration fongicide minimale (CFM) a été conduit selon une procédure adaptée de la littérature (Espinel-Ingroff et *al.*, 2002 ; Prado et *al.*, 2008). Après réalisation des tests de microdilution selon les normes CLSI (CLSI, 2008), 10µl de chaque puits montrant une complète inhibition de la croissance fongique ont été prélevés sans agitation et sous-cultivés en triplicata dans une boîte de Pétri sur un milieu Sabouraud dextrose agar stérile. Le puit

de contrôle de croissance de la plaque a été utilisé comme contrôle de croissance de la plaque de Pétri. Les boîtes de Pétri ainsiensemencées ont été mises à incuber à 25° C jusqu'à observer une croissance de la sous-culture de contrôle (avant 5 jours généralement). La CMF a été déterminée comme étant la plus faible concentration à laquelle aucune croissance fongique n'a été observée.

I-2-4- Analyses statistiques

Toutes les mesures ont été données en triplicata. Les données des traitements ont été examinées par l'analyse de la variance (ANOVA mono-factorielle). Les résultats sont présentés en moyennes \pm écarts types. Le test de Student-Neuman-Keuls est utilisé pour comparer ces moyennes, lorsque l'ANOVA montre une signification. $P \leq 0,05$ indique un effet significatif. Les corrélations linéaires bivariées ($P < 0,01$) établies, en utilisant le coefficient de Pearson (r), ont été effectuées avec le logiciel Statistica 7.0.

CHAPITRE II :
RÉSULTATS
ET
DISCUSSION

ETUDE
PHYTOCHIMIQUE

II-1- Analyse quantitative

Les résultats des quantifications des métabolites primaires et secondaires sont représentés dans les figures 2, 4, 6, 8, 10 (Annexe III).

II-1-1- Composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques totaux a été faite selon le procédé spectrophotométrique de Miliauskas et *al.* (2004), en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

La méthode appliquée est considérée comme la meilleure pour le dosage des polyphénols totaux des extraits de plantes (Djeridane et *al.*, 2010), car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent colorée sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (765nm) utilisée (Huang et *al.*, 2005).

Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait "lyophilisat" (mg EAG/g), en utilisant l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage $y = 0,0588x$. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2 et la gamme d'étalonnage dans la figure 3.

Les trois organes de *Thymelaea hirsuta* montrent une différence significative ($F_2 = 46,17$; $P < 0,05$) dans la teneur en phénols totaux. C'est ainsi que les fleurs enregistrent la valeur la plus élevée ($113,96 \pm 9,9$), suivi des brindilles ($93,78 \pm 3,12$), puis des feuilles ($61,12 \pm 1,28$ mg EAG/g). Ces données sont nettement supérieures à celles obtenues par Trigui et *al.* (2013) et El abed et *al.* (2014) sur l'extrait aqueux de la partie aérienne de *T. hirsuta* ($31,5 \pm 1,5$ et $10,10 \pm 0,04$ mg EAG/g, respectivement). Ces variations, dans les niveaux de composés phénoliques dues à un métabolisme phénolique, peuvent être sous l'influence des conditions environnementales et la répartition géographique de l'espèce végétale considérée. Selon Khlifi et *al.* (2013), la composition phénolique des tissus végétaux varie considérablement avec les facteurs saisonniers, génétiques et agronomiques. C'est ainsi qu'une grande variabilité, à différentes étapes de maturation et pour différentes conditions abiotiques de culture (température et précipitations), a été connu pour affecter les teneurs en composés phénoliques (Aganga, 2001 ; Pedneault et *al.*, 2001 ; Fiorucci, 2006).

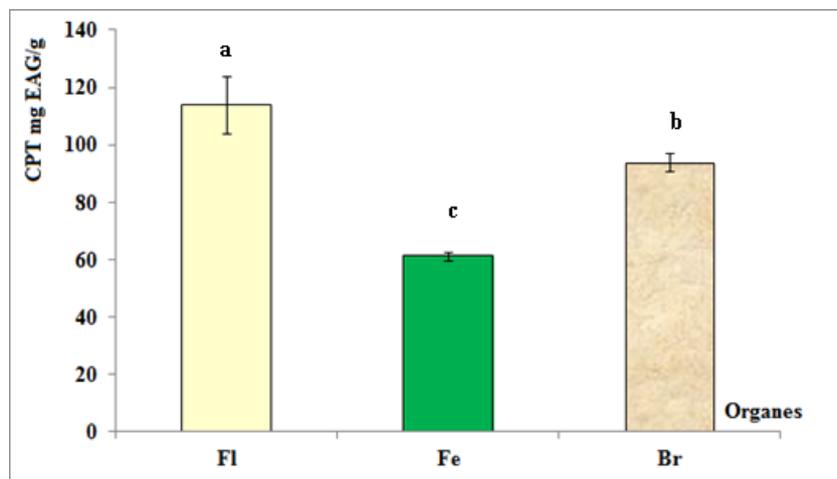


Figure 2 : Teneurs des extraits aqueux de *T. hirsuta* en composés phénoliques totaux (Fleurs, = Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes différents significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

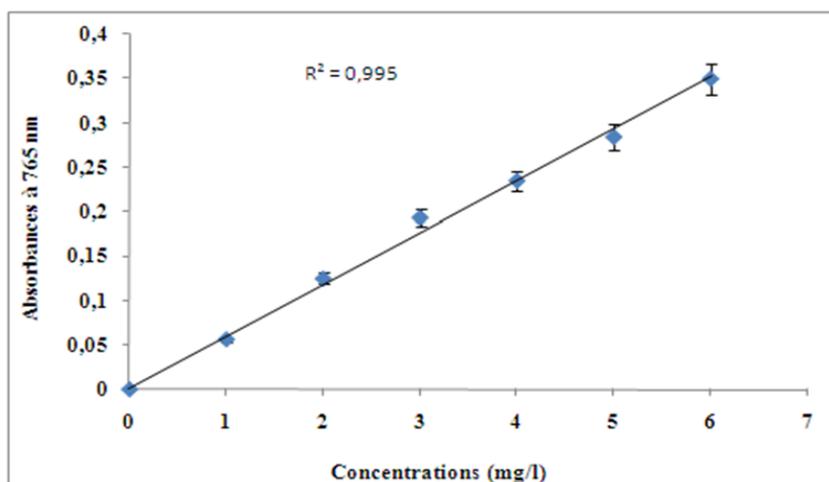


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

II-1-2- Flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par Chang *et al.* (2002). La teneur en flavonoïdes totaux des différentes parties de la plante, déterminée à partir de l'extrait aqueux, a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec une substance de référence ; la quercétine à différentes concentrations. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait "lyophilisat" (mg EQ/g). La courbe d'étalonnage a été ajustée avec un coefficient de corrélation $R^2 = 98,5\%$ et une formule de régression $y = 0,53x+0,018$ (Fig. 5).

La détermination des taux de flavonoïdes totaux (Figure 4) révèle ($F_2= 463,22$; $P<0,05$) que l'extrait aqueux de fleurs est le plus riche ($5,70\pm 0,06$ mg EQ/g) par rapport aux autres extraits, suivi par celui de feuilles ($3,15\pm 0,15$ mg EQ/g). Cependant, la plus faible quantité a été notée dans l'extrait issu des brindilles avec une teneur de $2,61\pm 0,13$ mg d'équivalent quercétine par gramme d'extrait de lyophilisat. La teneur trouvée dans les feuilles est largement inférieure à celle mentionnée par Trigui (2013), qui est de l'ordre de $29,3$ mg/g. Cependant, elle est 8 fois supérieure ($0,40$ mg/g) à celle communiquée par Mohammedi (2013). Ceci est peut être lié au climat de la région ou à la méthode utilisée qui ne donne pas une composition quantitative complète des extraits (Wu *et al.*, 2004). En se basant sur ces données, on peut déduire que Les flavonoïdes des feuilles et fleurs représentent presque 5% des phénols totaux. Ce taux ne dépasse pas 2,78 % dans les brindilles.

II-1-3- Tanins condensés

L'analyse des tanins condensés a été réalisée par la méthode décrite par Heimler *et al.* (2006), en utilisant comme standard la catéchine. La teneur des tanins est exprimée en mg équivalent catéchine par gramme d'extrait de lyophilisat (mg EC/g), à partir des données d'absorbance et d'une droite d'étalonnage réalisée entre 0,0 et 1,2mg/ml (Fig. 7). Comme le montre la figure 6, les teneurs des tanins condensés sont classées comme suit ($F_2= 298,41$; $P<0,05$) : fleurs ($67,85\pm 0,81$) > feuilles ($60,16\pm 0,35$) > brindilles ($46,35\pm 1,44$ mg EC/g). Le résultat des feuilles est nettement supérieur par rapport à celui obtenu par El Abed *et al.* (2014) chez la même espèce (25 mg EC/g).

Comparativement aux brindilles et fleurs, il ressort, à partir des estimations quantitatives des composés phénoliques totaux et des tanins condensés, qu'une proportion importante de polyphénols est représentée par des tanins de types catéchiques. Ces composés polyphénoliques sont des substances reconnues pour leur propriété antioxydante (Traoré, 1999). Les tanins sont également reconnus pour leur pouvoir de fixation aux protéines avec une tendance à l'imperméabilité des couches externes et la protection des couches sous-jacentes, leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus (Kerharo et Adam, 1974 ; Bruneton, 1993).

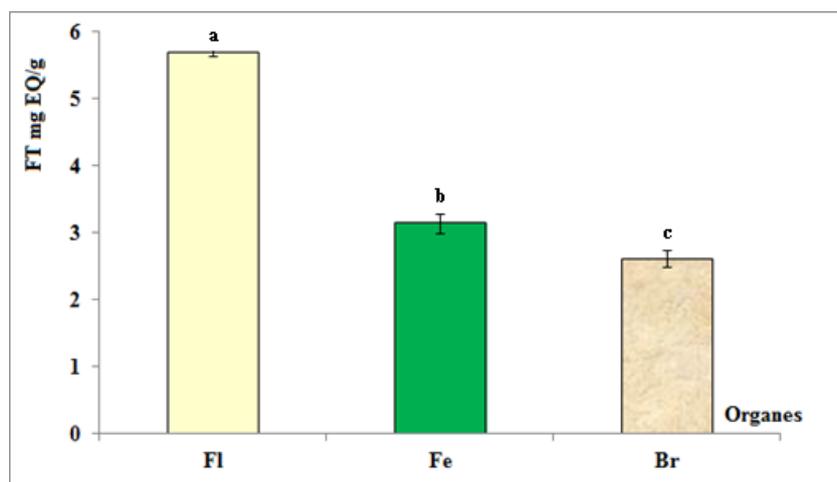


Figure 4 : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits aqueux de *T. hirsuta* (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

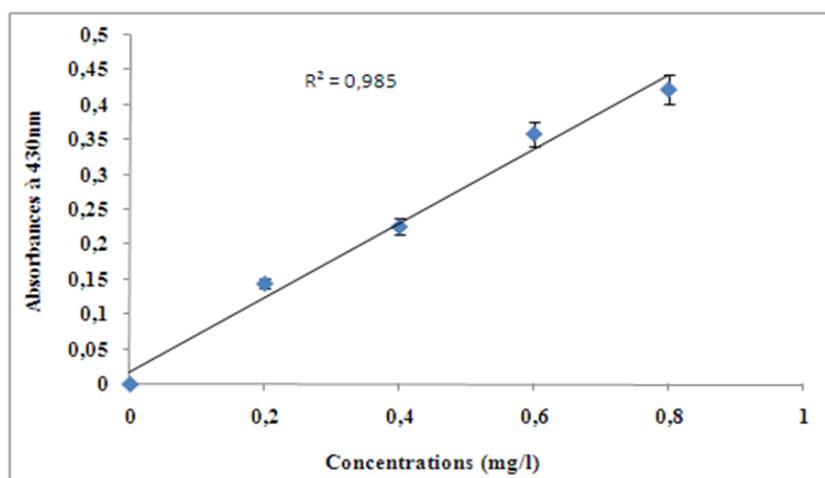


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

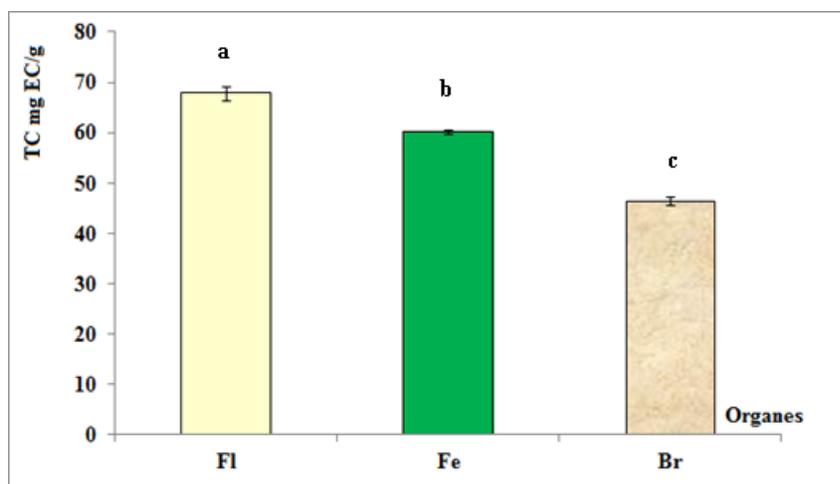


Figure 6 : Teneurs en tanins condensés des extraits aqueux de *T. hirsuta* (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

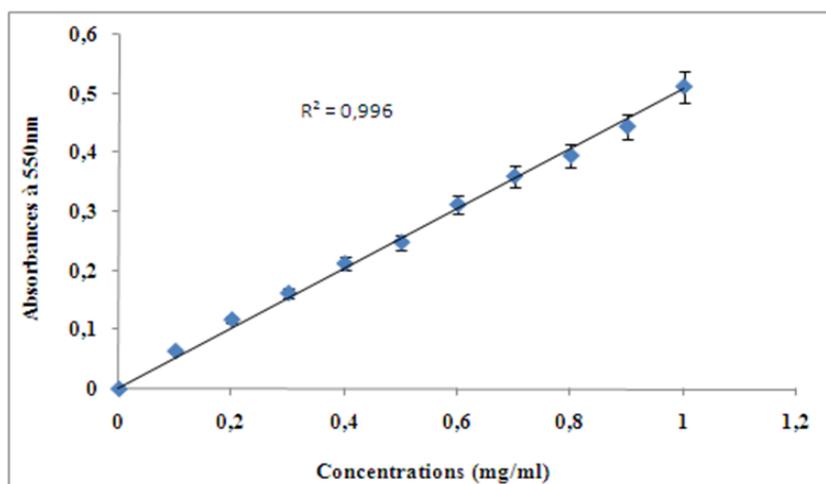


Figure 7 : Courbe d'étalonnage de la catéchine.

II-1-4- Sucres totaux

Le contenu en sucre totaux a été estimé par les techniques de la méthode de dosage direct avec du phénol (Dubois et *al.*, 1956). Une courbe d'étalonnage linéaire avec des concentrations ascendantes de maltose, allant de 0 à 5µg/ml, et un coefficient de détermination (R^2) d'une valeur de 98,7% ont été établis (Fig. 9).

Les sucres totaux ont été exprimés en milligramme équivalent maltose par gramme d'extrait de lyophilisat, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 490nm. Les résultats obtenus ont été présentés dans la figure 8

Le dosage effectué a montré une inégalité ($F_2= 1009,81$; $P = 0$) dans la répartition des sucres totaux dans les différents organes étudiés de *Thymelaea hirsuta* (Fig. 8). En effet, une abondance a été remarquée dans l'extrait aqueux des feuilles avec une teneur de l'ordre de 262,44±0,58mg EMA/g.

Parallèlement, les fleurs ont présenté une diminution de 84,89, soit 177,55±6,41mg EMA/g. Contrairement aux deux premiers organes, les brindilles se sont montrées moins riches et présentent, par ailleurs, une quantité inférieure se chiffrant ainsi à 96,89±2,33mg EMA/g.

II-1-5- Sucres réducteurs

Comme précédemment, les teneurs en sucres réducteurs des trois organes de *Thymelaea hirsuta* ont été exprimées en mg équivalent maltose par gramme de lyophilisat (Fig. 10 et 11).

Après comparaison ($F_2= 2532,64$; $P = 0$), la quantité moyenne en sucres réducteurs révélée au niveau des brindilles est (22,39±0,15mg EMA/g) significativement importante par rapport à celles enregistrées dans les fleurs (14,06±0,23mg EMA/g) et les feuilles (12,20±0,07mg EMA/g).

En raison de l'utilisation de différentes méthodes d'extraction (Trabelsi et *al.*, 2010), des courbes d'étalonnage multiples (glucose, maltose, saccharose) et d'autres parties de plantes étudiées, la comparaison entre les études semble être non fiable.

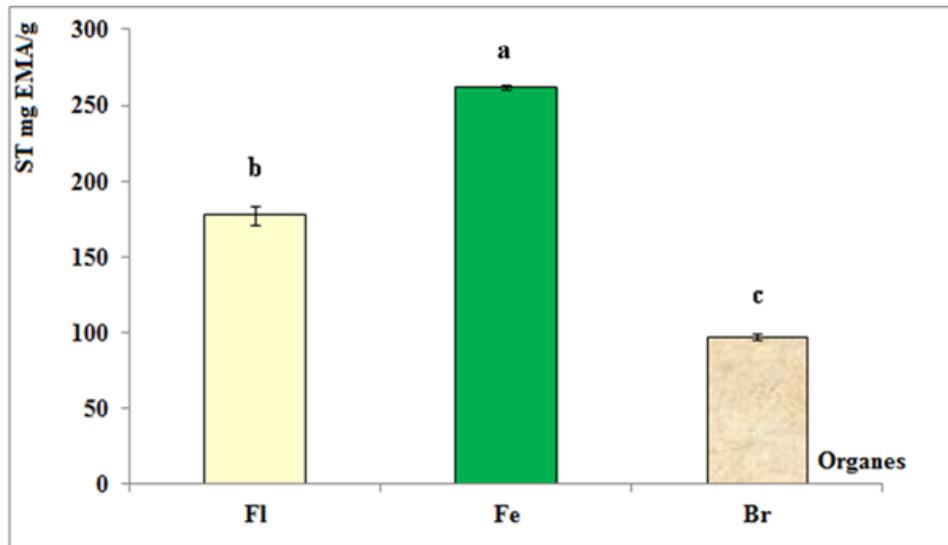


Figure 8 : Teneurs en sucres totaux des extraits aqueux de *T. hirsuta* (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

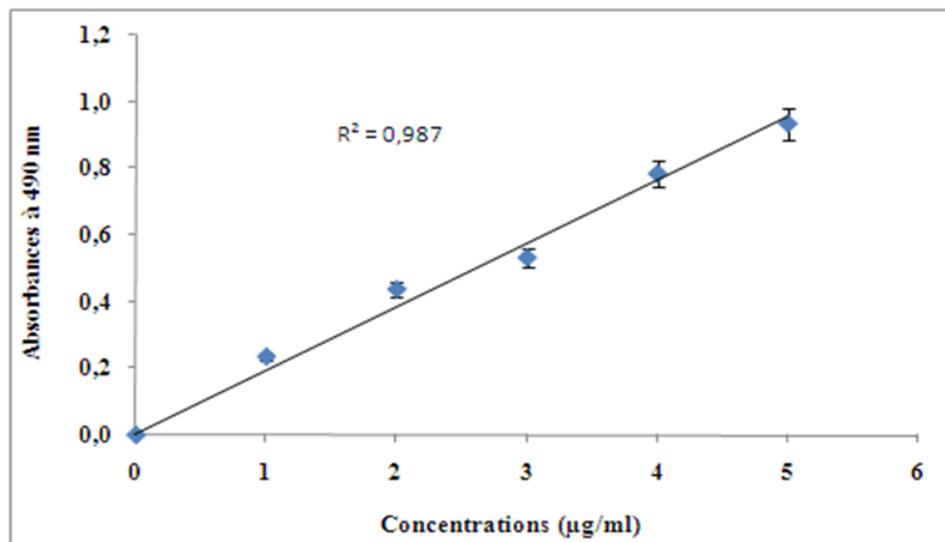


Figure 9 : Courbe d'étalonnage du maltose.

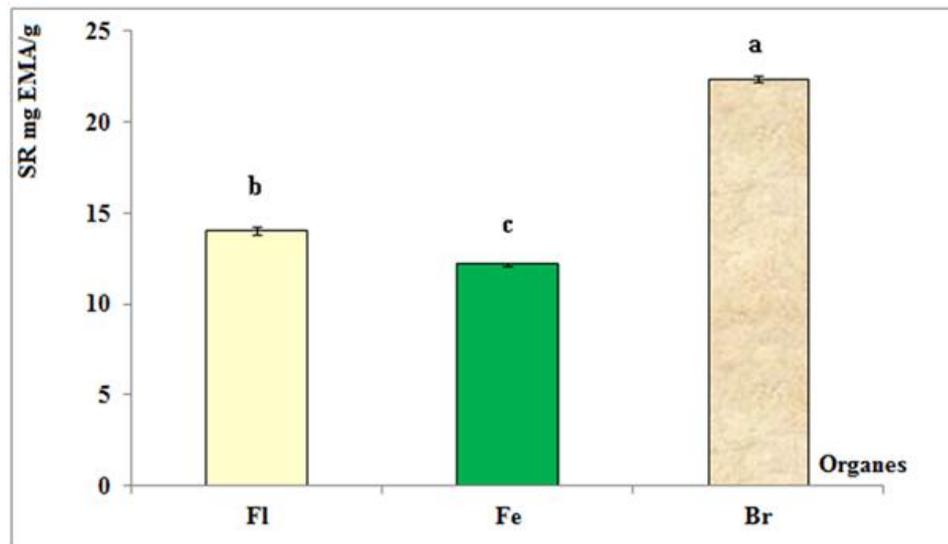


Figure 10 : Teneurs en sucres réducteurs des extraits aqueux de *T. hirsuta* (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes différent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

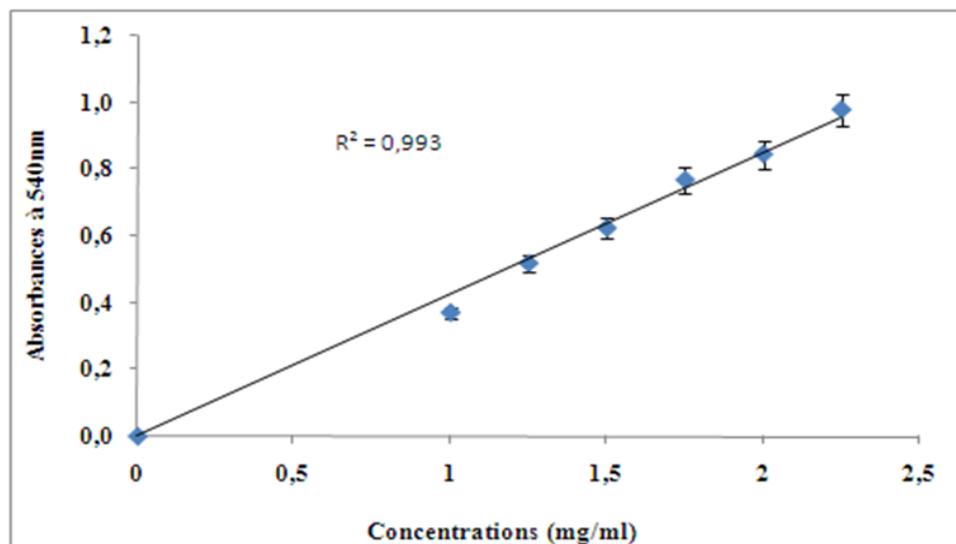


Figure 11 : Courbe d'étalonnage du maltose.

II-1-6- Lipides

II-1-6-1- Lipides totaux

La caractérisation et le dosage des lipides chez *Thymelaea hirsuta* a montré une diversification en acides gras avec des pourcentages différents et ceci en rapport avec l'organe étudié.

D'une manière générale, les pourcentages des lipides totaux dans les fleurs et les feuilles sont proches (3 vs 2,65%) ; une légère différence de 0,35% a été observée. Cependant, les brindilles, moins riches, n'ont enregistré que 1,97% ; valeur largement inférieure à celles notées précédemment (Fig. 13).

II-1-6-2-Détermination du profil des acides gras

Par catégorie (Tab. 3), les acides gras saturés (AGS) (acide caprique, laurique, myristique, palmétique, stéarique, arachidique, béhémique et lignocérique) sont présents dans les différentes parties de la plante. Des proportions égales, de l'ordre de 70,02 et 71,77%, ont été notées dans les fleurs et les brindilles. Alors qu'ils se montrent, relativement, moins abondants dans les feuilles (61,86%). Qualitativement, l'acide palmitique (C₁₆) est le plus prépondérant, parmi les acides gras. Sa distribution est surtout répartie sur les feuilles avec 46,79%, par rapport aux fleurs (33,02%) et aux brindilles (30,94%) (Tab. 2).

Parallèlement, la disponibilité en acides gras monoinsaturés (AGM) représentée notamment par l'acide palmitoleique, oléique et gadoléique sont surtout observés dans les fleurs avec 19,87%, alors que les feuilles et les brindilles n'ont enregistré que 15,61 et 14,99% ; écart insignifiant. Il est important de noter que la présence des acides gras monoinsaturés à longues chaînes (acide érucique et sélacholéique) est très insignifiantes, voire même nulle.

La remarque la plus frappante réside dans la proportion importante que présentent les acides gras polyinsaturés (AGPI) dispensée, elle se chiffre à 22,53% dans les feuilles. Cette valeur est deux fois plus élevée que celle notée sur les fleurs (10,11%) et les brindilles (13,24%). L'acide alpha linoléique est majoritairement dans les fleurs par rapport aux feuilles et aux brindilles. Les AGPI à longues chaînes représentés par C_{20:1} n-9 et C_{20:2} sont dominants dans les fleurs et les feuilles, respectivement. Par contre, le C_{20:3} n-6 et C_{24:1} sont quasi exclusivement présents dans les fleurs ; il semble être un indicateur de ces dernières. Par contre, le C_{20:4} n-6 et le C_{24:0} semblent être, sans doute, spécifique aux brindilles, tandis que les C_{20:3} n-3 et C_{20:4} n-3 sont plus fréquents au niveau des feuilles. Concernant le C_{22:4} n-6, sa présence dans les feuilles est d'une à deux fois plus supérieure par rapport aux brindilles et aux fleur.

Tableau 2 : Pourcentages des principaux acides gras recensés chez *Thymelaea hirsuta*.

Identifications	Fleurs	Feuilles	Brindilles
LT en%	3,00	2,65	1,97
C_{10:0}	0,18	0,39	0,12
C_{12:0}	0,32	0,25	0,20
C_{14:0}	2,36	4,89	1,94
C_{16:0}	33,02	46,79	30,94
C_{16:1 n-9}	0,46	0,00	0,74
C_{16:1 n-7}	0,93	0,74	0,72
C_{18:0}	10,51	8,35	6,81
C_{18:1 n-9c}	15,56	12,53	12,29
C_{18:1 n-7}	1,95	1,72	0,92
C_{18:2 n-6t}	0,14	0,14	0,17
C_{18:2 n-6c}	0,30	0,39	0,13
C_{18:3 n-6}	0,16	0,12	0,11
C_{18:3 n-3}	0,76	0,23	0,22
C_{18:4 n-3}	0,17	0,00	0,09
C_{20:0}	14,82	0,20	30,75
C_{20:1 n-9}	0,65	0,53	0,32
C_{20:2}	0,76	0,29	0,09
C_{20:3 n-6}	0,15	0,00	0,00
C_{20:4 n-6}	0,00	0,00	3,04
C_{20:3 n-3}	1,82	4,45	1,44
C_{20:4 n-3}	0,27	0,41	0,10
C_{22:0}	8,21	0,44	0,12
C_{22:4 n-6}	5,03	16,35	7,87
C_{24:0}	0,00	0,00	0,26
C_{24:1}	0,15	0,00	0,00

Tableau 3 : Profil des acides gras dans les différentes parties de *Thymelaea hirsuta*.

Nomenclatures	identifications	Fleurs	Feuilles	Brindilles
Acides gras saturés	AGS	70,02	61,86	71,77
Acides gras monoinsaturés	AGM	19,87	15,61	14,99
Acides gras polyinsaturés	AGPI	10,11	22,53	13,24
Oméga6	n-6	5,78	17,15	11,31
Oméga3	n-3	3,58	5,09	1,84

Globalement, les acides gras saturés sont à part égale dans deux structures (fleurs et brindilles) et un redressement de 10% dans les feuilles. Ainsi, pour les monoinsaturés, une légère supériorité dans les fleurs a été signalée. Toutefois, une prédominance des acides gras polyinsaturés dans les feuilles a été mentionnée. Ils constituent des cibles privilégiées des ROS ; plus l'acide gras est insaturé et plus il est susceptible d'être peroxydé (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les Oméga3 et 6 sont fréquents dans les feuilles contrairement aux fleurs et aux brindilles (Fig. 12). En effet, les ω -3 sont de la série des acides gras qui jouent un rôle important dans le développement et dans la maintenance des différents organes en général, du cerveau en particulier et qui interviennent dans la prévention de diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, psychiatriques, neurologiques, dermatologiques et les troubles rhumatologiques (Maria et *al.*, 2008 ; Marianna et *al.*, 2007, Joseph et Jeffrey, 2006).

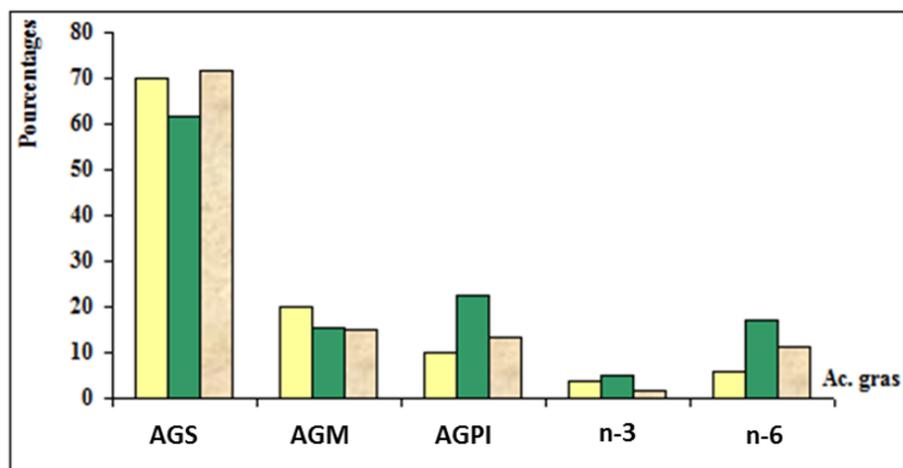


Figure 12 : Pourcentage des lipides totaux dans les organes aériens de *Thymelaea hirsuta* (■ = Fleurs, ■ = Feuilles et ■ = Brindilles).

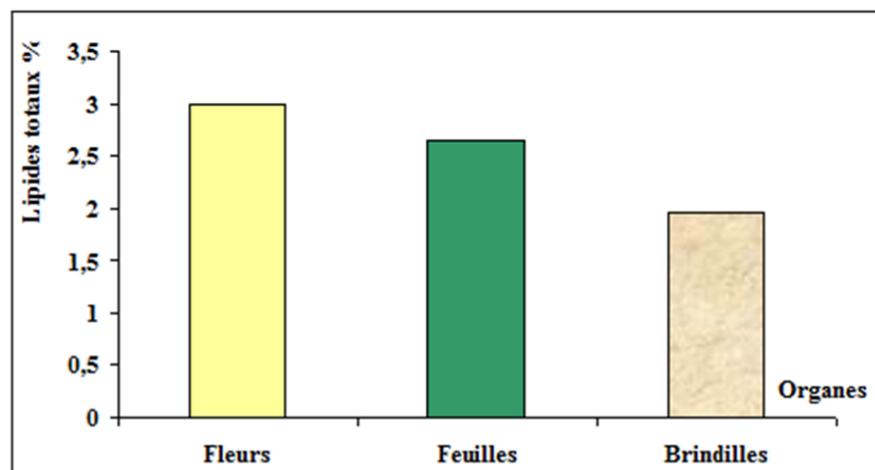


Figure 13 : Distribution des acides gras en % (AGS = Acides gras saturés, AGM = Acides gras monoinsaturés, AGPI = Acides gras polyinsaturés, n-3 = Oméga3 et n-6 = Oméga6) dans les organes aériens de *Thymelaea hirsuta*.

II-2- Analyse qualitative des extraits du *Thymelaea hirsuta*

II-2-1- Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés tout en utilisant les réactifs de révélation spécifiques.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de *T. hirsuta*. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, de turbidité et d'observation visuelle d'un changement de couleur spécifique. Selon leur intensité, les réactions qui peuvent se produire sont classées de : négative (-) jusqu'à franchement positive (+++).

Ainsi :

- ◆- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- ◆- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- ◆- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- ◆- L'absence de la substance est représentée par : -

Les résultats expérimentaux des tests effectués sont mentionnés dans le tableau 4, et ont permis de déceler la présence de divers composés tels que les flavonoïdes (flavone, flavane), les tanins, les quinones (anthraquinones), les alcaloïdes et les leucoanthocyanes... dans les différents organes du végétal étudié avec différentes proportions. Cependant, les tanins catéchiques sont révélés avec des quantités plus importantes dans les fleurs par rapport aux feuilles et aux brindilles.

Les composés les plus abondants en quantités variables sont les saponosides, les oses et les holosides, les mucilages, les tanins, les dérivés anthracéniques (*O*-hétérosides à genine réduits et *C*-hétérosides), les coumarines, les stérols et les triterpènes et enfin les génines libres. Les fleurs ont été la partie végétative ayant présentée la plupart et la grande proportion des éléments chimiques.

Pour la recherche des caroténoïdes, des proanthocyanidols et des composés réducteurs, les réactions ont été positives seulement avec les feuilles et les fleurs. Par contre, les tanins galliques ont été présents seulement dans les fleurs. Par ailleurs, les tests de recherche des anthocyanes, des anthraquinones libres, des hétérosides cardiotoniques, des hétérosides cyanogénique, des protéines et des stupéfiants étaient absents aussi bien dans les feuilles que dans les fleurs et les brindilles.

Les résultats obtenus dévoilent la richesse des fleurs et des feuilles de *Thymelaea hirsuta* du point de vue qualitatif en métabolites secondaires tels que les triterpènes, alors que dans les brindilles ils sont de moindre importance. Les composés, précédemment isolés par García-Granados et Sáenz de Buruaga (1980b) à partir des feuilles de *Thymelaea hirsuta*, ont été de type dammarane, lupane et oléane. En outre, ce screening phytochimique corrobore celui effectué par Azza et al.

Tableau 4 : Résultats des tests phytochimiques des fleurs, feuilles et brindilles de *Thymelaea hirsuta*.

Métabolites secondaires		Fleurs	Feuilles	Brindilles	
Alcaloïdes		++	+	++	
Stérols et triterpènes		+++	++	+	
Caroténoïdes		+	+	—	
Flavonoïdes	Flavones	+	+	+	
	flavonones	—	—	—	
	flavonols	—	—	—	
	Génines libres	+++	+++	+++	
	Leucoanthocyanes	+++	+	+	
	flavanes	+++	+	+	
Tanins		+++	+	+	
Tanins catéchiques		+++	++	+	
Tanins galliques		+	—	—	
Saponosides		++	+	++	
Coumarines		++	++	+++	
Anthocyanes		—	—	—	
Prothocyanidols		+++	+	—	
Quinones		+	+	+	
Mucilages		++	+++	+	
Oses et holosides		+++	++	++	
Composés réducteurs		+++	+	—	
Stupéfiants		—	—	—	
Protéines		—	—	—	
Hétérosides cardiotoniques		—	—	—	
Hétérosides cyanogénique		—	—	—	
Dérivés anthracéniques	Anthraquinones libres		—	—	—
	Anthraquinones combinées	O-hétérosides	—	—	—
		O-hétérosides à genine réduits	++	++	+++
		C-hétérosides	+++	+++	+++

(2012) ; la partie aérienne de *T. hirsuta*, récoltée au Maroc, a été également riche en flavonoïdes, stéroïdes et tanins et dépourvue d'anthraquinones libres. Ces données ont été, également, signalées par Djeridane et al., (2005); Dohou et al., (2004) ; El Beheiry et al., (2000) ; Garcia-Granados et Sáenz de Buruaga (1980). Rizk et ses collaborateurs (1975) mentionnent, chez *Thymelaea hirsuta*, la présence de différentes structures coumariniques à base de daphnétine, d'ombelliférone, de scopolétine et d'esculétine. De plus, la présence d'ombelliférone et de scopolétine a été aussi rapportée chez *Thymelaea hirsuta*, en plus d'autres molécules (George et Rishi, 1982).

Au cours de sa récolte et après plusieurs prospections, il a été remarqué que *Thymelaea hirsuta* n'a jamais été broutée par le bétail. Le faible intérêt pastoral des Thymelaeaceae a été expliqué par le fait qu'elles contiennent des alcaloïdes et des glucosides (Le Floc'h, 1983). D'après Touati (1985), *Thymelaea hirsuta* ne contient pas ce genre de composés (alcaloïdes). Cependant, 36 % des espèces présenteraient des alcaloïdes chez les Thymelaeaceae (Levin, 1976). Les variations, de métabolites secondaires, décelées au niveau de la partie aérienne de la plante pourrait être liée à la différence de l'origine, à la période de la récolte, à la nature du sol ou aux facteurs climatiques (Daddona et al., 1976 ; Manolaraki, 2011).

Généralement, les métabolites secondaires détectées ont un large panel d'activité biologique, et sont probablement à l'origine des vertus médicinales pratiquées traditionnellement avec *Thymelaea hirsuta*. En effet, les flavonoïdes sont des antioxydants réputés par excellence (Torel et al., 1986 ; D'abrosca et al., 2007). Outre leur pouvoir antioxydant, ils sont des antiulcéreux, antitumoraux, antispasmodiques, antisécréteurs et antidiarrhéiques (Di Carlo et al., 1999), antiallergiques, anti-inflammatoires, hypotenseurs et protecteurs contre le cancer et la cataracte (Bruneton et al., 2007). Ils sont également doués de vertus aphrodisiaques (Boua et al., 2008) . Les coumarines, quant à elles, possèdent des propriétés antifongique (Sardari et al., 1999), antibactérien (Kwon et al., 1997, Kayser et Kolodziej, 1997), antiviral (Fuller et al., 1994), antimalarial (Yang et al., 1992), anti-inflammatoire (Chen et al., 1995 ; Okada et al., 1995 ; Lino et al., 1997 ; Hiermann et Schlantl, 1998 ; Garcia-argaez et al., 2000), anti-tumoral (Seliger, 1997 ; Kofinas et al., 1998 ; Fujioka et al., 1999), anticoagulant (Egan et al., 1990) et responsables de la cicatrisation des plaies. (Garabeth F. et al., 2007). Selon Ybert et al. (2000), les tanins permettent de lutter contre les infections et de drainer les sécrétions excessives comme la diarrhée. Certains alcaloïdes renforcent l'activité cardiaque, excitent le système nerveux central, les nerfs sympathiques et stimulent la circulation sanguine (Lazurevskii et al., 1966). Les polyphénols possèdent un effet de rétention du potassium ; ils manifestent donc une activité diurétique (N'guessan et al., 2009). Les saponosides ont un effet cicatrisant, antifongique, antimycosique, anti-inflammatoire et antihelminthiques (Kansole, 2009 ; N'guessan et al., 2009). Quant aux stéroïdes et polyterpènes, ils ont des propriétés

bactéricides (N'guessan et *al.*, 2009), et permettent de lutter contre les inflammations. Tandis que, les holosides peuvent avoir des effets hémostatiques.

II-2-2- Analyses chromatographiques

II-2-2-1- Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince de silice est à la fois une méthode d'identification et de séparation de divers constituants chimiques contenus dans une drogue. L'interprétation des profils flavoniques a été basée sur la comparaison des rapports frontaux (Rf) et l'inflorescence des spots observées sous UV avant et après révélation par un révélateur chimique. Le système solvant utilisé (chloroforme/acétate d'éthyle/acide formique) (50 :40 :10 ; v/v/v) a permis d'obtenir une très bonne séparation chromatographique en présence de trois substances de référence ; la flavanone, la quercétine et la flavone. Les tableaux suivants rapportent les informations sur les facteurs de rétentions (Rf), l'observation à l'UV (254 et 365nm), et les différentes colorations après la révélation par le réactif de NEU.

La révélation physique sous lampe UV à 254nm a confirmé l'abondance des flavonoïdes chez *Thymelaea hirsuta*, notamment sur les feuilles et les brindilles (Tab. 5). De même, pour les rapports frontaux, ces derniers sont tout à fait différents de celui obtenu sur la quercétine.

Pour mieux déterminer la nature des flavonoïdes présents dans les extraits étudiés, un réactif spécifique (réactif de Neu) a été utilisé. Ce dernier révèle les flavonoïdes en orange, rouge, jaune, bleu et vert (Wagner et Blatt, 1996).

Les plaques CCM observées, après élution par le système solvant, pulvérisation avec le réactif de Neu et visualisation sous UV à 365nm, montrent des tâches de nombres, de couleurs et de distances de migrations différents (Fig. 14), et cela, particulièrement, chez les deux extraits correspondants aux feuilles et aux fleurs. Par contre, celui des brindilles aucune fluorescence n'a été montrée.

Ces données renforcent les résultats obtenus précédemment. C'est ainsi que les spots qui ont été obtenus par addition de la flavone, ont été visualisées (0,27 – 0,33 – 0,62 – 0,78 – 0,82) dans le même niveau de migration des extraits naturels. A l'exception des feuilles, dont un spot supplémentaire a été identifié. Les rapports frontaux ont été donc de l'ordre de 0,27 – 0,32 -0,61 – 0,8 - 0,82 et 0,27 – 0,58 -0,77 – 0, 2 respectivement pour les feuilles et les fleurs.

Parallèlement, la comparaison des colorations des différentes tâches a mis l'accent sur le type de composés phénoliques détecté. En se référant aux travaux de Markham (1982), sous UV 365nm (Tab. 6), les spots en verts observés sur les deux extraits, de rapport frontal égal à 0,27 semblent indiquer la présence des flavonols et des flavones. Par contre, la couleur bleuâtre a été

visualisée dans un intervalle de Rf allant de 0,58 à 0,82. Ceci justifie la présence de nombreux types d'acides phénols ; poids moléculaires différents.

Deux couleurs distinctes ont été repérées chez les feuilles, il s'agit du jaune et du mauve avec respectivement 0,82 et 0,33 de Rf. Ces derniers se sont caractérisés par des flavonols et des anthocyanidines 3-glycosides.

Tableau 5 : Rapports frontaux après révélation chimique sous UV à 254nm.

Extraits	Quercétine	Flavanone	Flavone	Feuilles	Fleurs	Brindilles
Rf	0,78	0	0	0,07	0	0,08

Tableau 6 : Chromatographie sur couche mince des principaux composés phénoliques révélés par le réactif de NEU sous UV 365nm.

Extraits	Couleurs sous UV 365nm	Rf _(s)	Types de phénols/flavonoïdes selon Markham (1982)	Natures probables des constituants
Quercétine	Marron brun foncée	0,27		
flavanone		0		
flavone		0,27 0,33 0,62 0,78 0,82	—	
feuilles	Vert Mauve Bleu Bleu Jaune	0,27 0,32 0,61 0,8 0,82	Flavonols, flavanones, auronnes Anthocyanidines 3 glycosides Acide phénol Acide phénol flavonol	Flavonols, flavones, Anthocyanidines 3-glycosides et acides phénols.
fleurs	Vert Bleu Bleu Bleu	0,27 0,58 0,77 0,82	Flavonols, flavanones, auronnes Acide phénol Acide phénol Acide phénol	Flavonols, flavones et acides phénols
brindilles		0		

Markham (1982) a montré que les anthocyanidines-3-glycosides donnent des tâches orange rouge et mauve; les flavonols se décèlent sous forme de tâches jaunes et vertes, les flavones, flavones méthylées, isoflavones, flavanones et chalcones apparaissent sous forme de tâches bleues. Les flavanols et les auronnes se caractérisent par l'apparition de tâches vertes, les flavones et les chalcones présentent une coloration pourpre et orange.

La présence des flavonoïdes dans les organes étudiés a été confirmée par le réactif de Neu en paraissant, dans le visible, sous forme de tâches jaune et marron. Sous observation UV/365nm, ces couleurs s'intensifient et se diversifient (Wagner *et al.*, 1996).

A l'égard des résultats obtenus, la présence des flavonoïdes et des acides phénoliques dans les extraits de la partie aérienne de *Thymelaea hirsuta* est évidente, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Ferrari (2002). Cette richesse en métabolites flavonoïdique a été confirmée par Mekhelfi (2014) sur la partie aérienne d'une autre espèce de Thymelaeaceae (*Thymelaea microphylla*).

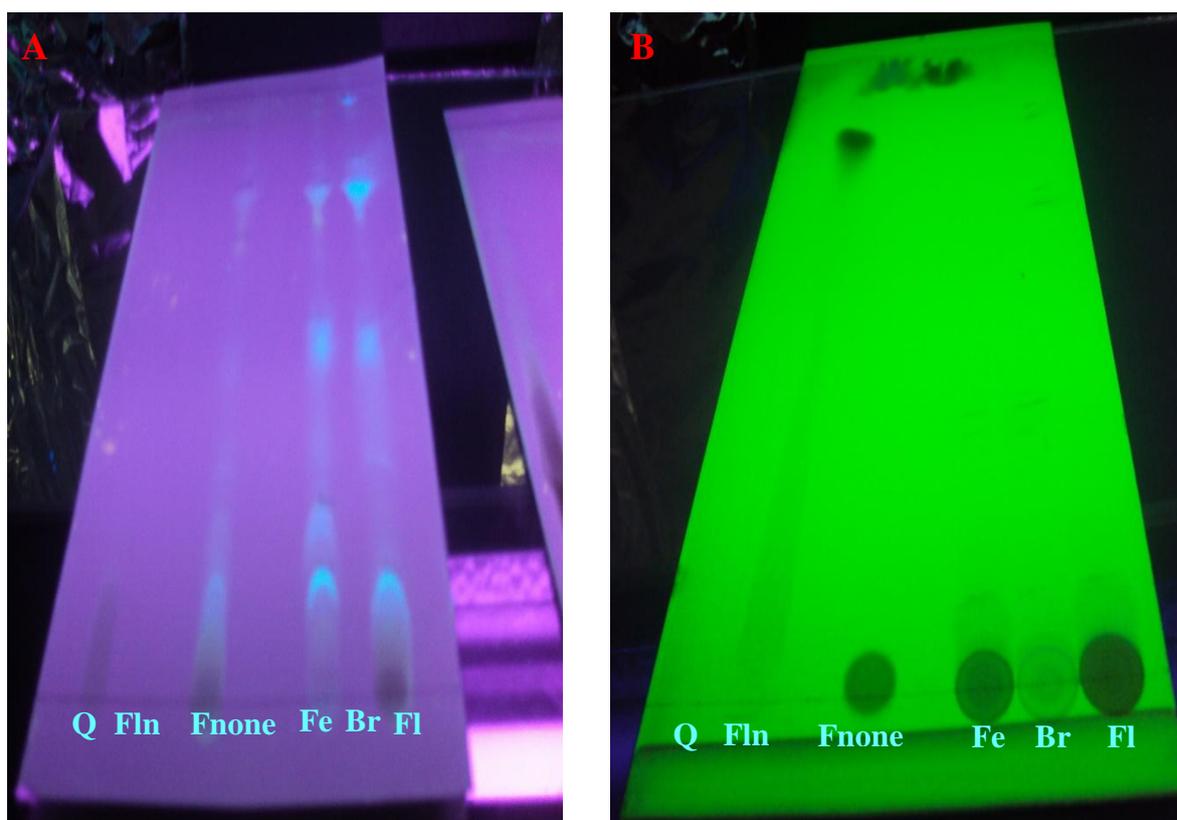


Figure 14 : Chromatographie sur couche mince des extraits aqueux de feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta* (A = révélation par le Neu et B = révélation physique sous UV à 254nm). Q : Quercétine, Fln : Flavone, Fnone : Flavanone, Fe : feuilles, Br : Brindilles, Fl : Fleurs.

Egalement, Trigui et ses collaborateurs (2013) ont pu identifier par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) des acides phénols ; acide caféique, acide ferulique, acide hydrocinnamique, acide gallique et acide benzoïque et leurs dérivés tels que l'acide m-hydroxybenzoïque. Les acides phénols possèdent des propriétés antiallergiques, antioxydants, anti-inflammatoires, antivirales, antitumorales, anticancéreuses et antispasmodiques (Bate-Smith, 1954 ; Asad et *al.*, 1998 ; Di Carlo et *al.*, 1999).

De même, d'autres travaux réalisés sur les Thymelaeaceae ont montré la présence de diverses classes de flavonoïdes : flavonols, les flavones et flavanones (Borris et *al.*, 1988 ; Liao et *al.*, 2005 ; Zhang et *al.*, 2011).

II-2-2-2- Profilage par LC-MS et LC-MS/MS avec source Electrospray (ESI)

L'analyse des échantillons par chromatographie liquide en gradient d'élution couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée sur 40 minutes. Le mode « full scan » a été alterné avec un mode automatique de fragmentation dès que le seuil d'intensité le permettait afin de collecter le plus de données structurales possible. La gamme de masse balayée est comprise entre m/z 100 et 2000. A chaque instant t du chromatogramme, il est possible d'interroger l'informatique sur la nature des ions (rapport m/z) enregistrés mais aussi sur les fragments générés par MS² pour chacun des ions enregistrés en mode « full scan ».

Les extraits de *Thymelaea hirsuta* (feuilles, fleurs et brindilles) ont été analysés une fois avec une ionisation ESI à polarité en mode positif (un proton est capté par la molécule selon son affinité protonique pour former un ion moléculaire protoné), et une fois à polarité en mode négatif (la molécule cède un proton selon son acidité en phase gazeuse pour former un ion moléculaire déprotoné), afin d'obtenir leur profil chromatographique. Ces deux modes sont complémentaires.

Les profils de la composition de l'extrait aqueux de feuilles, fleurs, brindilles diffèrent peu et montrent une richesse en métabolites secondaires.

L'analyse par ESI-LC/MS des feuilles, fleurs et brindilles a permis de détecter d'environ 170 (feuilles) à 300 (fleurs) composés phytochimiques en mode ESI négatifs et aux alentours de 200 à 300 composés phytochimiques en mode ESI positif (Annexe IV).

Parmi l'ensemble des signaux détectés, 35 hypothèses structurales ont pu être formulées sur la base des fragmentations observées. Pour l'extrait de fleurs, de feuilles et de brindilles en mode négatif et positif, ces composés sont consignés dans les tableaux 7, 8 et 9.

Tableau 7 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux de fleur de *Thymelaea hirsuta* en mode positif et négatif. Tr : temps de rétention. Ref : référence dans laquelle a été trouvée la fragmentation des composés proposés.

N°	Nom	Masse molaire	Extrait	Tr (min)	MS	Fragments MS ²	Réf.
1	Acide gallique	170	FL ⁺	1,12	171	109-127-153-162	
			FL ⁻				
2	Acide Hydroxy benzoïque	138	FL ⁺	20,25	139	98-121	
			FL ⁻	7,49	137	93-119	Su et al., 2013
3	Apigénine	270	FL ⁺	16,27 16,56	271	225-253 203-225-240	Tsimogiannis et al., 2007
			FL ⁻	17,74	269	135	
4	Vicénine-2	594	FL ⁺	6,46	595	457-529-559-577	
			FL ⁻	4,93 15,56	593	353-473-383-503 285-447	Silva et al., 2014
5	Catéchine	290	FL ⁺				
			FL ⁻	6,54	289	125-179-203-205-245	Dincheva et al., 2013
6	Edgeworine	322	FL ⁺	10,30	323	251-277-279-305-	
			FL ⁻	9,86 23,46	321	233-277 247-259-306-	
7	Kaempférol ou lutéoline	286	FL ⁺	10,65 11,37	287	206-215-257-278 206-220-241-257-269-	
			FL ⁻	11,31 16,58	285	213-229-241-257-267 155-211-221-239-241-267	Fabre. et al., 2001
8	Rutarensine	658	FL ⁺				
			FL ⁻	12,57	657	255-285	

				13,13		336-351 -393-613	
9	Wikstromol	374	FL ⁺	16,94	375	307-347-357	
			FL ⁻	13,31	373	223-327-355	
10	Genkwanine	284	FL ⁺	10, 1	285	239-257-270	
			FL ⁻	11,62	283	255	
11	Quercétine	302	FL ⁺				
			FL ⁻	11,97 15,42	301	183-201-221-265 -283 221-265-283	
12	Isochamaejasmine	542	FL ⁺	9,66	543	363-381-499 -525	
			FL ⁻	11,59 20,49	541	255 309-415	
13	Gnidicine	628	FL ⁺	7,88 7,64	629	570-611 467-548-611	
			FL ⁻				
14	Genkwadaphnine	602	FL ⁺	9,44	603	309-441-573-587	
			FL ⁻				
15	5-Methyl-2-N methylphenylamino-2-thiazoline	206	FL ⁺				
			FL ⁻	28,85	205	189-205	
16	Acide ferulique	194	FL ⁺				
			FL ⁻	6,60 8,70	193	134 -149 -178 89-103-113-131-149-175	Wang et al., 2012
17	Acide Caféique	180	FL ⁺				
			FL ⁻	4,82	179	135	Wang et al., 2012
18	Esculétine	178	FL ⁺				

			FL ⁻	4,95	177	133	
19	Scopolétine	192	FL ⁺				
			FL ⁻	21,94	191	147-163-176-183	
20	Sphondine	216	FL ⁺	2,75	217	155-173-	
			FL ⁻	18,53	215	147 -197	
21	4-Nitrophenyl 2-acetamido -2-deoxy-β-D glucopyranoside	342	FL ⁺	17,42 22,42	343	240 227	
			FL ⁻	11,19	341	181-241 -323	
22	Malvidine	331	FL ⁺				
			FL ⁻	15,14	330	171-211-229-293-311	
23	Acide quinique	192	FL ⁺				
			FL ⁻	1,03 22	191	85-111-127-173 112-147-163-176	Saldanha et al., 2013
24	1 ou 3 ou 4 Acide caffoylquinique ou Acide chlorogenique	354	FL ⁺	7,28 9,06	355	201-274-337 193-203-301-337	
			FL ⁻	3,9	353	179-191	Ivan et al., 2014
25	3 ou 5-O-Acide Feruloylquinique	368	FL ⁺	14,94 32,24	369	211-251-333-351 252-301-326-369	
			FL ⁻	5,78 8,24	367	179-191 173-191	Bastos et al., 2007
26	Kaempferol-3-O-Rutinoside	594	FL ⁺	6,92	595	457-475-529-559-577	
			FL ⁻	5,04 15,56	593	353-383-473-503 285-447-307	Farias et Mendez (2014)

27	Quercétine-(Glc +GlcA) ou -(Gal +GlcA)	640	FL ⁺				
			FL ⁻	8,17	639	463-301	Wang et al., 2012
28	Acide Procatechique	152	FL ⁺	5,81 20,03	155	114 114	
			FL ⁻	2,56 10,23	153	109 109-135	Wang et al., 2012
29	Epicatechine	290	FL ⁺				
			FL ⁻	6,61	289	125-179-205-245	Dincheva et al., 2013
30	Kaempferol-3-O-Glc (ou Gal)	446	FL ⁺				
			FL ⁻	3,41 11,60	447	152-271-315-403 285-301-327	Cha et al., 2008
31	Acides sinapoylquiniques	398	FL ⁺	8,90 26,86	399	202-219-298-339-351-381- 143-358	
			FL ⁻	27,60	397	397	
32	Apigénine-7-0-glucoside ou Kaempférol-3-O-Rha	432	FL ⁺				
			FL ⁻	15,39	431	351	

Tableau 8 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux de feuille de *Thymelaea hirsuta* en mode positif et négatif. Tr : temps de rétention. Ref : référence dans laquelle a été trouvée la fragmentation des composés proposés.

N°	Nom	Masse molaire	Extrait	Tr (min)	MS	Fragments MS ²	Réf.
1	Acide Hydroxy benzoïque	138	Fe ⁺	20,25	139	98-121	
			Fe ⁻	1,03	137	97-115	
2	Apigénine	270	Fe ⁺	16,27	271	225-240-253	
			Fe ⁻	7,59 37,30	269	201-225-251 270	
3	Vicénine-2	594	Fe ⁺	6,46 15,56	595	457-529-559-577 287-309	
			Fe ⁻	4,93 15,56	593	353-473-383-503 285-447	Silva et al., 2014
4	Catéchine	290	Fe ⁺				
			Fe ⁻	15,82	289	242-270	
5	Edgeworine	322	Fe ⁺				
			Fe ⁻	23,46	321	247-306	
6	Kaempférol ou Lutéoline	286	Fe ⁺	11,37	287	213-220-241-269	
			Fe ⁻	16,40 16,84	285	155-199-211-217-239-241-267 197-199-217-241-267	
7	Rutarensine	658	Fe ⁺				
			Fe ⁻	13,13	657	336-351-393-613	

8	Genkwanine	284	Fe ⁺	10,91 11,88	285	239-257-270 239-257-270	
			Fe ⁻	21,90	283	221-265-268	
9	Syringarésinol		Fe ⁺				
			Fe ⁻	9,47 13,19	417	371 151-166-181-371-387-402	
10	Quercétine	302	Fe ⁺				
			Fe ⁻	14,79	301	221-265-283	
11	Gnidicin	628	Fe ⁺	7,87 7,92	629	467-570-611- 460-495-549-569-582	
			Fe ⁻				
12	Gniditrin	646	Fe ⁺	36,60	647	647	
			Fe ⁻				
13	5-Methyl-2-N-methylphenylamino-2-thiazoline	206	Fe ⁺				
			Fe ⁻	28,85	205	189-205	
14	Acide paracoumarique	164	Fe ⁺				
			Fe ⁻	6,58	163	119	
15	Acide Caféique	180	Fe ⁺				
			Fe ⁻	4,82	179	135	Su et al., 2013
16	Esculétine	178	Fe ⁺				
			Fe ⁻	4,62	177	133	
17	Scopolétine	192	Fe ⁺				

			Fe ⁻	21,94	191	147-163-176-183	
18	Sphondine	216	Fe ⁺	2,75	217	155-173-	
			Fe ⁻	18,53	215	147 -197	
19	4-Nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy- β-D glucopyranoside	342	Fe ⁺	17,42	343	240	
			Fe ⁻	10,83	341	181-241-323	
20	Malvidine	331	Fe ⁺	2,08	332	314	
			Fe ⁻	15,14	330	171-211-229-293-311	
21	Acide quinique	192	Fe ⁺				
			Fe ⁻	1,03 22	191	85-111-127-173 112-147-163-176	Saldanha et al., 2013
22	1 ou 3 ou 4 Acide caffoylquinique ou Acide chlorogénique	354	Fe ⁺	3,59 10,77	355	185-193-325 238-281-301-337	
			Fe ⁻	3,9	353	179-191	Ivan et al., 2014
23	3 ou 5-O- Acide feruloylquinique	368	Fe ⁺	14,94 32,24	369	211-251-333-351 252-301-326-369	
			Fe ⁻	6,32 8,24	367	173-191-193 173-191	Bastos et al., 2007
24	Kaempferol-3-O-Rutinoside	594	Fe ⁺	6,74 15,24	595	457-475-529-559-577 287-309	
			Fe ⁻	5,04 15,56	593	353-383-473-503 285-447-307	Farias et Mendez (2014)
25	Acide Procatechique	152	Fe ⁺	11,49 17,22	155	114 114	

			Fe ⁻	2,56 10,23	153	109 109-135	Wang et al., 2012
26	Epicatéchine	290	Fe ⁺				
			Fe ⁻	15,82	289	242-270-286	
27	Kaempferol-3-O- Glc (ou Gal)	446	Fe ⁺				
			Fe ⁻	3,41 11,60	447	152-271-315-403 285-301-327	Cha et al., 2008
28	Acides sinapoylquiniques	398	Fe ⁺	8,85	399	202-283-327-351-381	
			Fe ⁻	27,60	397	397	
29	Apigénine-7-0-glucoside ou Kaempférol-3-O-Rha	432	Fe ⁺				
			Fe ⁻	5,96 9,80	431	223-385 311-341-413	

Tableau 9 : Composés phytochimiques détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux de brindilles de *Thymelaea hirsuta* en mode positif et négatif. Tr : temps de rétention. Réf. : références dans laquelle a été trouvée la fragmentation des composés proposés.

N°	Nom	Masse molaire	Extrait	Tr (min)	MS	Fragments MS ²	Ref
1	Acide gallique	170	Br ⁺	1,07	171	109-115-127-153-162	
			Br ⁻	1,07	169	125-151	Ivan et al., 2014
2	Acide Hydroxy benzoïque	138	Br ⁺	20,25	139	98-121	
			Br ⁻	4,52	137	93	
3	Apigénine	270	Br ⁺	16,27	271	225-240-253	
			Br ⁻	7,83 18,92	269	225-255 135-229	
4	Vicénine-2	594	Br ⁺	6,46 9,76	595	457-529-559-577 301-385-399-547-577	
			Br ⁻	4,93 15,56	593	353-473-383-503 285-447	Silva et al., 2014
5	Catéchine	290	Br ⁺	4,97	291	199-233-245-273	
			Br ⁻	6,54 14,84	289	125-179-203-205-245 242-270	Dincheva et al., 2013
6	Edgeworine	322	Br ⁺	7,34 15,84	323	251-277-279-305 134-279-305	
			Br ⁻	7,56 2,46	321	233-277 247-306	
7	Lutéoline	286	Br ⁺	10,65	287	206-215-257-278	
			Br ⁻	8,28	285	213-241-257-267	Fabre. et al., 2001

				23,17		223-267	
8	Rutarensine	658	Br ⁺				
			Br ⁻	8,76 13,13	657	577 336-351 -393-613	
9	Wikstromol	374	Br ⁺	16,87	375	347-357	
			Br ⁻	11,46 13,47	373	313-343-357 223-235-327-355	
10	Genkwanine	284	Br ⁺	10,88 22,15	285	270 217-270	
			Br ⁻	10,88	283	268	
11	Syringarésinol	418	Br ⁺				
			Br ⁻	13,19	417	166-181-402	
12	Quercétine	302	Br ⁺				
			Br ⁻	15,42	301	221-265-283	
13	Isochamaejasmine	542	Br ⁺				
			Br ⁻	11,59 20,49	541	255 309-415	
14	Gnidicin	628	Br ⁺	7,90	629	467-570-611	
			Br ⁻	7,99	627	321-483-525	
16	Genkwadaphnin	602	Br ⁺	9,44 10,39	603	309-441-573-587 309-317-351-483	
			Br ⁻	10,38	601	307-373-421-553	
17	5-Methyl-2-N-methylphenylamino	206	Br ⁺				

	-2-thiazoline		Br ⁻	28,85 2,64		189-205 161	
19	Acide ferulique	194	Br ⁺	8,02	195	89-133-154-177	
			Br ⁻	1,59	193	86-94-112-128-156-174	
20	Acide Caféique	180	Br ⁺				
			Br ⁻	1,53	179	143-161	
22	Scopolétine	192	Br ⁺				
			Br ⁻	2,94	191	147-163-176-183	
23	Sphondine	216	Br ⁺	2,75	217	155-173-	
			Br ⁻				
24	4-Nitrophenyl 2-acetamido-2-deoxy-β-D glucopyranoside	342	Br ⁺	17,42	343	240	
			Br ⁻	4,76 20,11	341	-163- 195-323 271-291-309	
25	Malvidine	331	Br ⁺				
			Br ⁻	15,14	330	171-211-229-293-311	
26	Acide quinique	192	Br ⁺				
			Br ⁻	1,03 22	191	85-111-127-173 112-147-163-176	Saldanha et al., 2013
27	1 ou 3 ou 4 Acide caffoylquinique ou Acide chlorogénique	354	Br ⁺	14,84 1,91	355	267-313 285-301	
			Br ⁻	3,9	353	179-191	Ivan et al., 2014
28	3 ou 5-O-Acide feruloylquinique	368	Br ⁺	14,94	369	211-251-333-351	

				32,24		252-301-326-369	
			Br ⁻	6,32	367	173-193	
29	Kaempferol-3-O-Rutinoside	594	Br ⁺	5,72	595	457-475-529-559-577	
				9,76		301-385-399-547-577	
			Br ⁻	5,04	593	353-383-473-503	Farias et Mendez (2014)
				15,56		285-447-307	
31	Acide Procatechuique	152	Br ⁺	9,81	155	114	
				21,11		114	
			Br ⁻	2,56	153	109	Wang et al., 2012
32	Epicatechine	290	Br ⁺	4,97	291	199-233-245-273-282	
				6,61		125-179-205-245	Dincheva et al., 2013
			Br ⁻	14,84	289	242-270-288	
33	Kaempferol-3-O-Glc (ou Gal)	446	Br ⁺				
				1,26	445	152-271-315-403-429	
			Br ⁻	15,27		166-181-233-379-415	
34	Acides sinapoylquiniques	398	Br ⁺				
			Br ⁻	27,60	397	397	
35	Apigénine-7-0-glucoside ou Kaempférol-3-O-Rha	432	Br ⁺				
			Br ⁻	13,50	431	351	

En règle générale, le mode négatif est plus informatif que celui positif pour des métabolites de type polyphénols. En effet, d'un point de vue chimique, un phénol peut se déprotoner plus ou moins facilement (pKa voisin de 9 - 10). Les composés phénoliques en mode négatif perdent également facilement de l'eau (perte de 18u) et une perte d'un groupement CO (perte de 28u) est souvent observé sur les flavonoïdes. Pour les acide carboxyliques, la perte de 44u (-CO₂) pour l'ion moléculaire déprotoné correspond à la perte de cette fonction précisément. En se fragmentant, les composés phénoliques glycosylés perdent leurs motifs de sucre. Ainsi, un glucoside perd 162u correspondant à la perte d'un glucose déshydraté (la même perte serait évidemment observée sur un galactoside ou encore un mannoside). Avec la même logique, l'hypothèse d'un rhamnoside peut être formulée à partir d'une perte de -146u, un arabinoside ou un xyloside à partir d'une perte de 132u. Ces pertes ont été aussi présentées dans de nombreuses études (Cuyckens et Claeys, 2002 ; Xing et al., 2007).

Les principaux composants de ces extraits (feuilles, fleurs, brindilles) appartiennent à la famille des polyphénols dans laquelle les sous familles des acides hydroxycinamiques, des coumarines et des flavonoïdes sont bien représentées. En raison du nombre élevé d'isomères potentiels, il n'est souvent pas possible, avec les seules données de spectrométrie de masse, de préciser lequel(s) des isomères a (ont) été détecté(s) dans l'extrait. Ainsi, après comparaison des données de spectrométrie de masse, il a été observé une certaine similitude dans la composition des feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta*. Par contre, certains composés n'ont été détectés que dans des organes bien précis. Par exemple, la genkwadaphnin n'a été détectée que dans les brindilles. Par ailleurs, la gniditrin n'a été détectée que dans les feuilles. Enfin, la quercétine-(Glc+GlcA) (ou son isomère galactoside) est juste présente dans les fleurs.

Pendant la phase d'interprétation des données LC-MS, un certain nombre de composés ont pu être proposés comme hypothèse. Ces hypothèses ont été soumises soit à une corrélation bibliographique soit à une corrélation par interprétation du spectre de masse MS², lorsque la fragmentation de la molécule hypothèse n'était pas référencée. Les deux corrélations ont parfois également été menées car elles peuvent se révéler complémentaires. Il n'a ensuite été gardé que les corrélations plausibles. En ce qui concerne les identifications par le biais de la bibliographie, différents isomères de l'acide ferulylquinique (3-O-ferulylquinique et 5-O-ferulylquinique) non encore signalés chez les Thymelaeaceae et des divers isomères de flavonoïdes (ex : lutéoline et kaempferol) ont été trouvés. Une deuxième substitution par l'acide caféique, acide de l'acide chlorogénique (acide caféylquinique) ou de l'acide ferulylquinique ne sont pas observés contrairement à d'autres plantes comme l'arnica (*Arnica montana* L.) ou la grande bardane (*Arctium lappa*) (Lin et Harnly, 2008).

Beaucoup d'autres métabolites ont été également confrontés à une identification par vérification structurale de la fragmentation. Par exemple, l'analyse par du pic m/z 593 en mode négatif au temps de rétention de 15.56 min, peut être interprétée comme étant l'ion moléculaire déprotoné $[M-H]^-$ du kaempferol-O-rutinoside. Le fragment à m/z 447 est compatible avec la perte d'une molécule de rhamnose $[M-H-Rha]^-$ par l'ion moléculaire, le fragment à m/z 307 correspond à la perte de l'aglycone et une molécule d'eau $[M-H-aglycone-H_2O]^-$ et le fragment à m/z 285 correspond à l'aglycone déprotoné (perte de la partie sucre entière). Cette fragmentation a été observée par Dincheva *et al.* (2013) et Farias et Mendez (2014).

Les analyses d'extraits de feuilles et fleurs en mode négatif montrent un ion moléculaire à m/z 447 $[M-H]^-$ pour un temps de rétention de 11.60 min. La bibliographie conduit à deux hypothèses possibles i)- le kaempferol-O-glucoside (Cha *et al.*, 2008) ou ii)- la quercetin-3-O-rhamnoside. Le fragment à m/z 301 correspond à une perte de 146u compatible avec une perte de rhamnose par l'ion moléculaire et le fragment à m/z 285 correspond à la perte de 162u compatible avec une perte de Glc ou Gal. Cependant, les deux aglycones diffèrent d'un groupe phénol et les sucres respectifs d'un groupe hydroxyle qui expliquent cette indétermination. Par contre l'ion fragment m/z 327 n'est compatible qu'avec la combinaison kaempferol + glucose d'où conservation de l'hypothèse kaempferol-O-glucoside pour ce composé. Bhandurje *et al.* (2013) ont rapporté la présence de ce dernier dans la partie aérienne de *Thymelaea hirsuta*.

Au temps de rétention de 4,93 min, il a été possible d'observer, dans les fleurs, la présence d'un ion moléculaire à m/z 593 $[M-H]^-$. Cet ion peut correspondre à la Vicenine-2 décrite dans les feuilles de *Thymelaea hirsuta* par Nawwar *et al.* (1977). Le fragment majoritaire à m/z 473 peut correspondre à la coupure au sein d'une des deux unités glycosidiques de cette molécule (Fig. 15). Quoiqu'il en soit, la fragmentation de ce composé a été décrite par Silva *et al.* (2014) et est en conformité par rapport à nos analyses.

Certains métabolites décrits dans *Thymelaea hirsuta* n'avaient pas encore été décrit par spectrométrie de masse. Ceux-ci ont du faire l'objet d'une étude corrélatrice uniquement de la fragmentation observée expérimentalement. Un pic de masse m/z 191 qui a été observé par le LC/MS-ESI en ionisation négative (Fig. 16) pour un temps de rétention de 21,94 min, équivalent à la masse moléculaire m/z 192Da ($[M-H]^-$). Des fragments de cet ion obtenus par MS^2 sont observés à m/z 183 $[M-H-18]^-$ correspondant à la perte d'une molécule d'eau, à m/z 176 $[M-H-15]^-$ qui convient à la perte d'un fragment méthyle radicalaire et à m/z 147 correspondant à la perte d'un acide carboxylique $[M-H-44]$. La perte de ces fragments est conforme à la structure de la scopolétine. Ce résultat est en accord avec des études antérieures mentionnant la présence de différentes structures coumariniques dont la scopolétine et l'esculétine dans les feuilles de *Thymelaea hirsuta* (Rizk *et al.*, 1975).

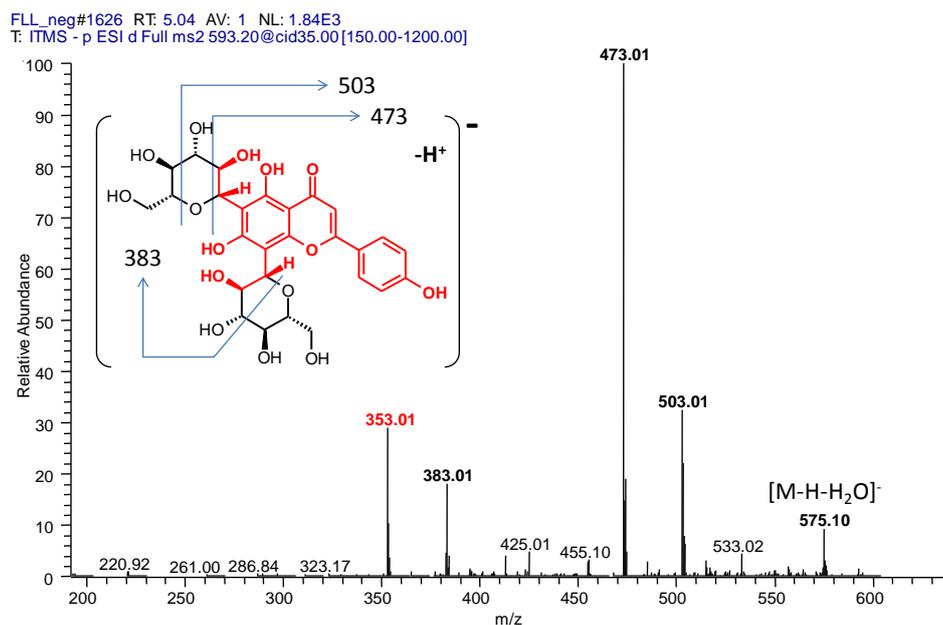


Figure 15 : Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 593 [M-H]⁻ détecté à 4,93 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de Vicenine-2 .

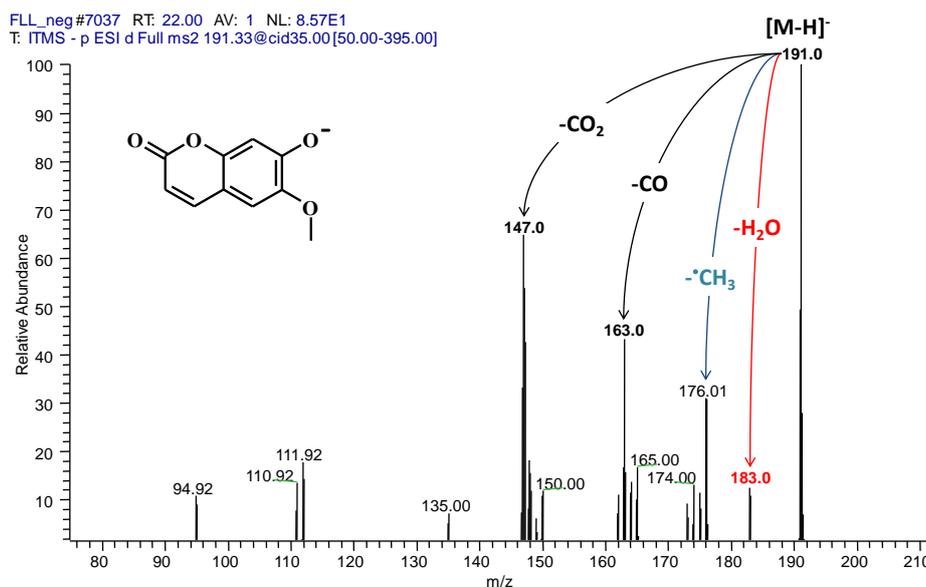


Figure 16 : Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 191 [M-H]⁻ détecté à 21,94 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de la Scopolétine.

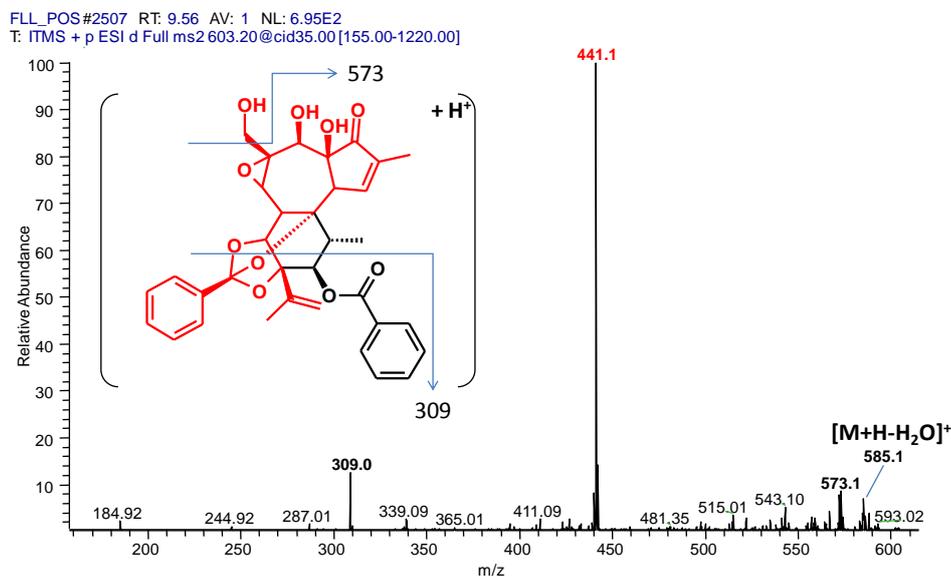


Figure 17 : Spectre de masse en mode positif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 603 [M+H]⁺ détecté à 9,44 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de la genkwadaphnine.

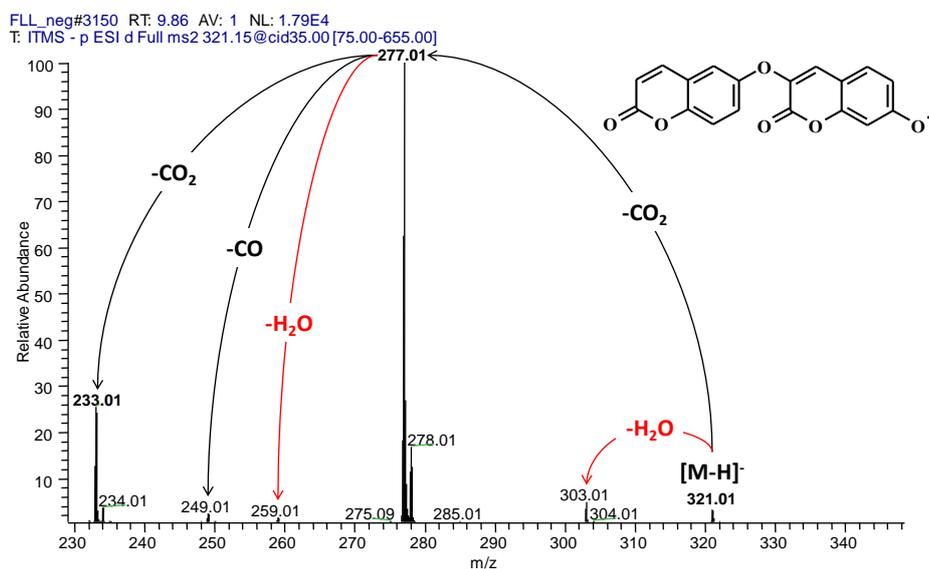


Figure 18 : Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 321 [M-H]⁻ détecté à 23,46 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de l'Edgeworine.

Le spectre de masse en mode positif en électrospray du brindille de *Thymelaea hirsuta* fait apparaître un ion moléculaire $[M+H]^+$ au temps de rétention de 9,44 min à m/z 603 compatible avec l'hypothèse de la genkwadaphnine. Comme beaucoup de molécules de ce type, une perte d'eau par fragmentation a été observée à m/z 585. Les fragments suivants $m/z = 573$, $m/z = 441$ et $m/z = 309$ sont conformes avec cette structure comme le propose la figure 17. En outre, la présence de différents composés diterpéniques telle que la genkwadaphnine ont été aussi rapportés par Brouks et al. (1990) dans les feuilles et les brindilles de *Thymelaea hirsuta*.

Le spectre ESI/MS en mode négatif des feuilles, fleurs et brindilles (Fig. 18) au temps de rétention de 23,46 min, montre également un pic de l'ion moléculaire déprotoné à m/z 321 ($[M-H]^-$) et des ions à m/z 321, m/z 303, m/z 277, m/z 259, m/z 249, m/z 233 correspondant à une fragmentation typique de la structure de l'edgeworine. Baba et ses collaborateurs (1989) et (1990) ont signalé deux 3,7-dicoumaryléthers: l'edgeworine et la rutarensine, qui ont été fournis par *Edgeworthia chrysantha* Lindl. de la famille des Thymelaeaceae.

En mode d'ionisation négatif, chez les feuilles, les fleurs et les brindilles, au temps de rétention de 13,13 min, l'ion moléculaire déprotoné m/z 657 peut correspondre à la structure de rutarensine. La fragmentation MS^2 de l'ion $[M-H]^-$ a donné un ion fragment à m/z 613 correspondant à la perte de 44u. Ce fragment perdu peut correspondre à un acide carboxylique. Un second fragment, a été observé à m/z 393, correspondant à une perte de 264u par rapport à l'ion moléculaire. D'autres fragments plus petits ont été remarqués à m/z 351 et à m/z 336, correspondant respectivement à une perte de 306u par rapport à l'ion moléculaire et une perte de 15u (perte d'un radical méthyle) par rapport à l'ion m/z 351. La perte de ces fragments est en accord avec la structure de rutarensine comme le montre la figure 19.

Yang et al. (2014) ont rapporté la présence de la syringarésinol dans la partie aérienne de *Thymelaea hirsuta*. Ce dernier appartient à la famille des lignanes et comme la plupart des composés phénoliques, il est doté de propriétés antioxydante (Lee et al., 2004) et même antifongique (Kawamura et al., 2004). La figure 20 illustre l'analyse du spectre de masse en électrospray en mode négatif des extraits de feuilles et de brindilles au temps de rétention de 13,19min à permis d'observer un ion moléculaire déprotoné à m/z 417 $[M-H]^-$, suggérant une masse molaire de 418u et correspondant précisément au syringarésinol. La présence des ions caractéristiques m/z 402, 387, 371, 181, 166 et 151 confirme cette hypothèse. Les hypothèses de fragmentation sont indiquées directement sur la figure 20.

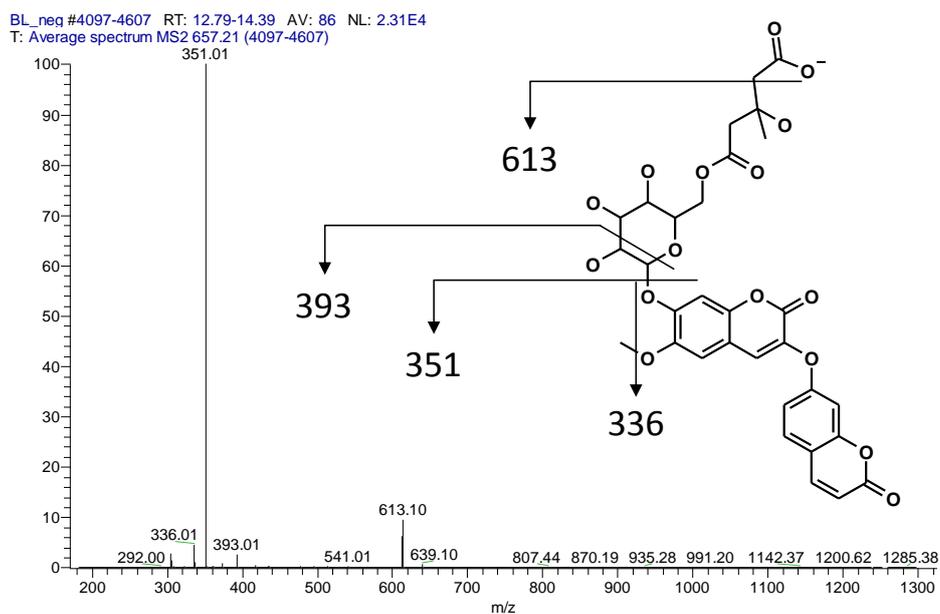


Figure 19 : Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 657 [M-H]⁻ détecté à 13,13 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de la Rutarensine.

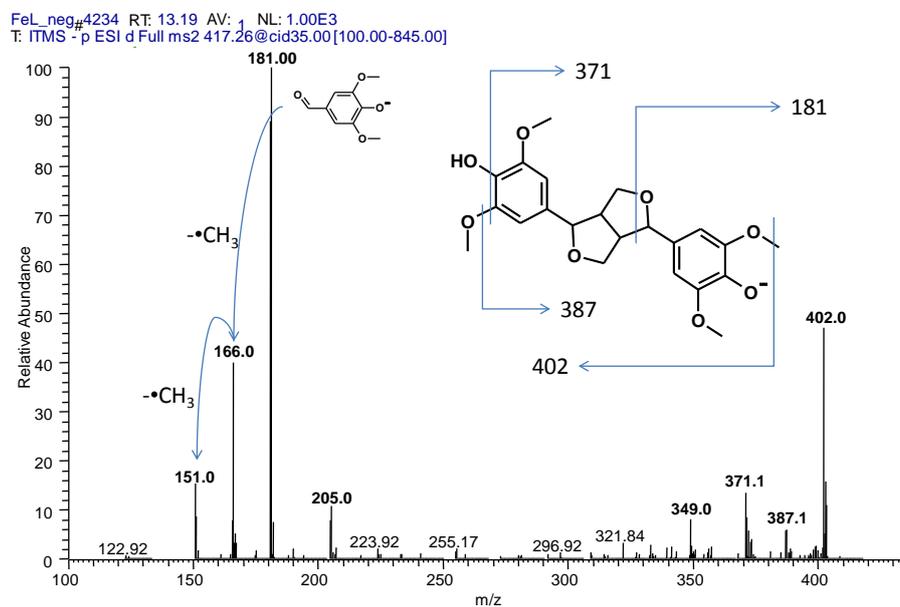


Figure 20 : Spectre de masse en mode négatif issu de la fragmentation à une énergie de collision de 35 eV de l'ion m/z 417 [M-H]⁻ détecté à 13,19 min d'élution et identifié comme étant conforme à la structure de Syringarésinol.

Les informations de la littérature ont facilité donc la détermination et la présence des molécules suivants : acide caféique, acide ferulique, acide procatechique, épicatechine, kaempférol, catéchine, acide quinique, lutéoline et genkwanine (Fabre et *al.*, 2001; Silva et *al.*, 2005 ; Bastos et *al.*, 2007; Wang et *al.*, 2012 ; Dincheva et *al.*, 2013). En absence des standards, il est cependant difficile d'établir avec certitude la présence de certaines molécules, celles-ci pouvant être confondues avec des isomères.

La caractérisation des métabolites de *Thymelaea hirsuta* a été effectuée dans un but prospectif pour la première fois par spectrophotométrie sur les trois organes. Plusieurs travaux scientifiques ont révélé que les métabolites secondaires, en particulier les acides-phénols, les diterpènes, les coumarines, les acide hydroxycinamiques et les flavonoïdes, sont doués de nombreuses propriétés biologiques, notamment antioxydante, anti inflammatoire, antiparasitaire, antibactérienne, cytotoxiques, antifongique et antivirale (Hill, 1993 ; Bruneton, 1999 ; Shan et *al.*, 2007 ; Lee et *al.*, 2014 ; Mura *al.*, 2014 ; Kandaswamy et Raveendiran, 2014).

II-3- Activité antifongique

L'évaluation de l'activité antifongique a été réalisée par la méthode de microdilution, celle-ci consiste à mettre en contact les extraits aqueux de la partie aérienne (feuilles, fleurs et brindilles) de la plante étudiée avec une solution de mycélium (*Microsporium audouinii* et *Trichophyton rubrum*) en milieu de culture liquide. Par le biais de cette approche, il était possible de lire avec précision les taux d'inhibition, la concentration minimale inhibitrice (CMI, calculée en $\mu\text{g/ml}$) et la concentration minimale fongicide. Le contrôle positif utilisé est un antifongique de référence : voriconazole.

II-3-1- Taux d'inhibition

II-3-1-1- *Microsporium audouinii*

Les agissements des différents extraits aqueux sur l'inhibition de *Microsporium audouinii* sont représentés dans les figures 21, 22 et 23

II-3-1-1-1- Extrait aqueux de fleurs

L'inhibition de la croissance, après 7 jours d'incubation, est plus prononcée à fortes concentrations (100% sur les essais 125, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$) et diminue progressivement avec la baisse de cette dernière ($F_2=85,26$; $P<0,05$). C'est ainsi qu'à 62,5 et 31 $\mu\text{g/ml}$, une inhibition de croissances fongiques de l'ordre de $83,21\pm 3,31$ a été enregistrée. Cependant, pour les doses de 31-16 et 8 $\mu\text{g/ml}$, des taux d'inhibition similaires ($74,21\pm 2,99\%$, $72,99\pm 2,38$ et $72,5\pm 2,81\%$) ont été notées (Fig. 21).

II-3-1-1-2- Extrait aqueux de feuilles

Comme cité précédemment, la propriété antifongique de l'extrait de feuilles vis-à-vis de *Micosporum audouinii* a été également vérifiée. L'extrait a conduit à une inhibition de la croissance mycélienne du champignon étudié, mais à des taux différents et cela selon la concentration employée ($F_2=25,42$; $P<0,05$). Les doses de 62,5 et 31 $\mu\text{g/ml}$ présentent des effets identiques ($87,14\pm 2,10$ et $86,90\pm 2,04$ respectivement). Tandis que celles de 16 et 8 $\mu\text{g/ml}$ affichent une inhibition avec un effet relativement déclinée ($82,61\pm 1,87$ et $80,23\pm 3,41\%$) (Fig. 22). Comparativement aux premiers, l'effet des concentrations 125, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ semblent être identiques. Spécifiquement, les fortes doses (500 et 100 $\mu\text{g/ml}$) ont affecté totalement l'activité de *Micosporum audouinii* ; 100% d'inhibition. Par ailleurs, malgré l'action très puissante de l'extrait dans les lots de 125 et 250 ($98,80\pm 5,25$ et $98,57\pm 4,08\%$ d'inhibition), un nombre très réduit d'hyphes persistaient.

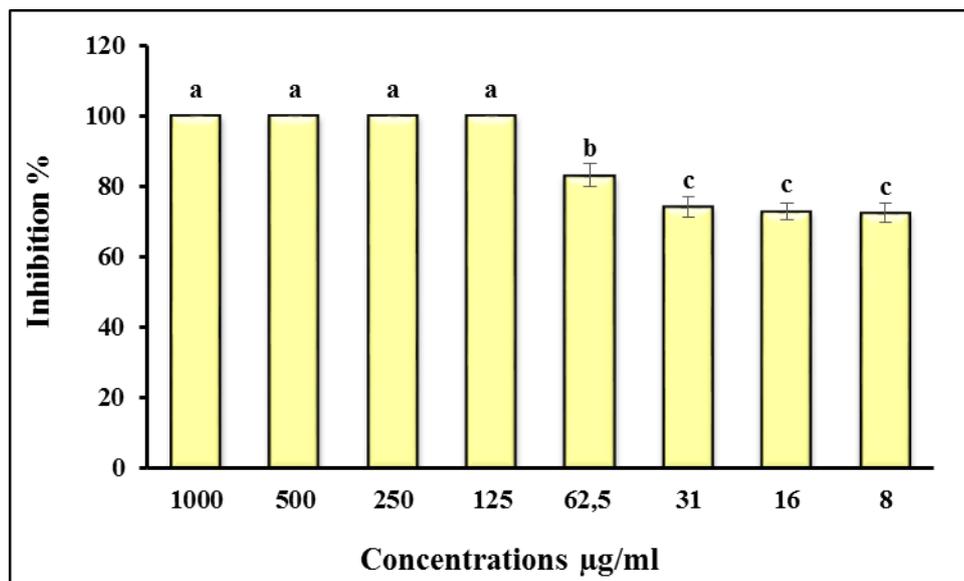


Figure 21 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux des fleurs de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

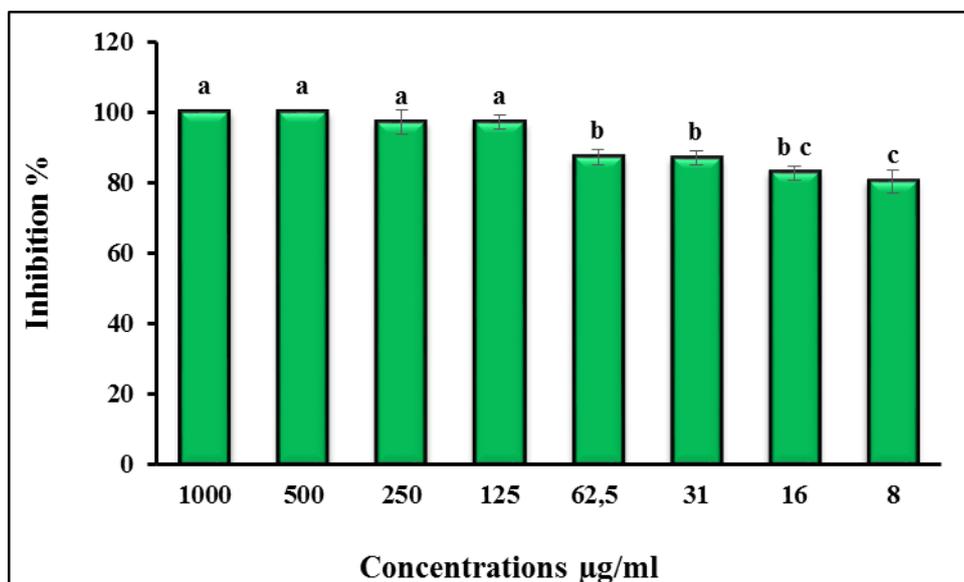


Figure 22 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux des feuilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

II-3-1-1-3- Extrait aqueux de brindilles

La figure 23 montre la variation de l'inhibition de *M. audouinii* lorsqu'il est soumis à l'extrait de brindilles à différentes concentrations. En effet, le taux d'inhibition du pathogène augmente, de même, avec l'accroissement de la concentration ($F_2=163,88$; $P<0,05$). Les plus fortes activités statistiquement obtenues ont été notées dans les essais 125, 250, 500 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ avec des taux de $96,47\pm 0,57$ - $97,65\pm 2,39$ - 100 - 100% d'inhibition, confirmant les données précédentes. Alors que celles-ci baissent progressivement avec la diminution des concentrations. Malgré la réduction évidente de la dose (62,5 et 31 $\mu\text{g/ml}$), les taux d'inhibition semblent varier légèrement et atteignent respectivement $85,21\pm 0,99$ et $82,86\pm 2,59\%$. Par contre, un rabais a entraîné une réduction remarquable, notamment lorsqu'il était traité à 8 $\mu\text{g/ml}$ ($33,80\pm 3,77\%$).

II-3-1-1-4- Voriconazole

L'étude menée sur l'activité antifongique sur le champignon dermatophyte *Microsporum audouinii* a montré une efficacité remarquable du Voriconazole ($F_2=72,72$; $P<0,05$). Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de ce dernier a été considérablement influencé par la concentration en voriconazole. En effet, dans les lots 39 – 19 – 9 et 4 $\mu\text{g/ml}$, les taux d'inhibition sont de l'ordre de $92,65\pm 1,33\%$ - $87,61\pm 0,69\%$ - $86,93\pm 0,33\%$ et $72,92\pm 3,56\%$. Par contre, ils se chiffrent à $65,71\pm 1,73\%$ - $65,30\pm 3,17$ - $63,12\pm 1,67$ et $64,76\pm 1,34\%$ pour les doses de 2 - 1 – 0,3 et 0,6 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 24).

II-3-1-2- *Trichophyton rubrum*

Comme le champignon précédent, l'inhibition de la croissance mycélienne de *Trichophyton rubrum* a été aussi bien assurée par la présence de l'extrait aqueux des organes de *Thymelaea hirsuta*. Les résultats sont représentés dans les figures 25, 26 et 27

II-3-1-2-1- Extrait aqueux de fleurs

L'action de l'extrait aqueux de fleurs sur *Trichophyton rubrum* (Fig. 25) ressemble à celle précédemment observée ; sa présence inhibe l'activité du champignon étudié ($F_2=10,32$; $P<0,05$). C'est ainsi qu'une extinction totale (100%) du pathogène a été enregistrée sur les tests de 1000 – 500 et 250 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par l'extrait aqueux de fleurs sur *M. audouinii*, excepté celui de 125 $\mu\text{g/ml}$ ($97,04\pm 3,22\%$). De même, les doses de 62,5 et 31 $\mu\text{g/ml}$ ont montré des réductions relativement légères par rapport aux premières ($90,72\pm 7,54\%$ et $88,64\pm 1,46\%$ respectivement). Par contre, l'effet inhibiteur semble être également efficace à faible doses employées. C'est ainsi qu'à 16 et 8 $\mu\text{g/ml}$, des taux d'inhibition de $76,81\pm 11,80$ et $69,38\pm 1,30\%$ ont été observées.

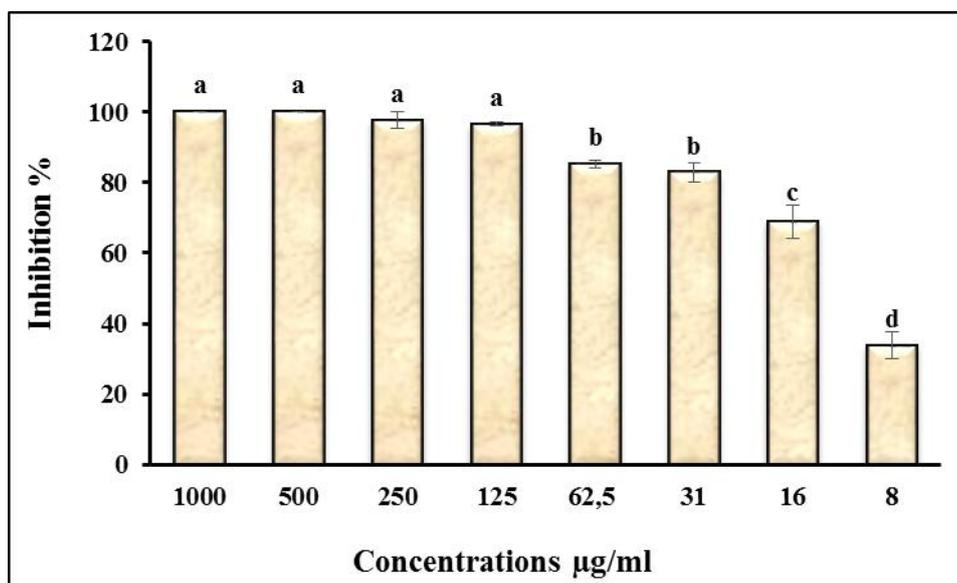


Figure 23 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité à l'extrait aqueux des brindilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

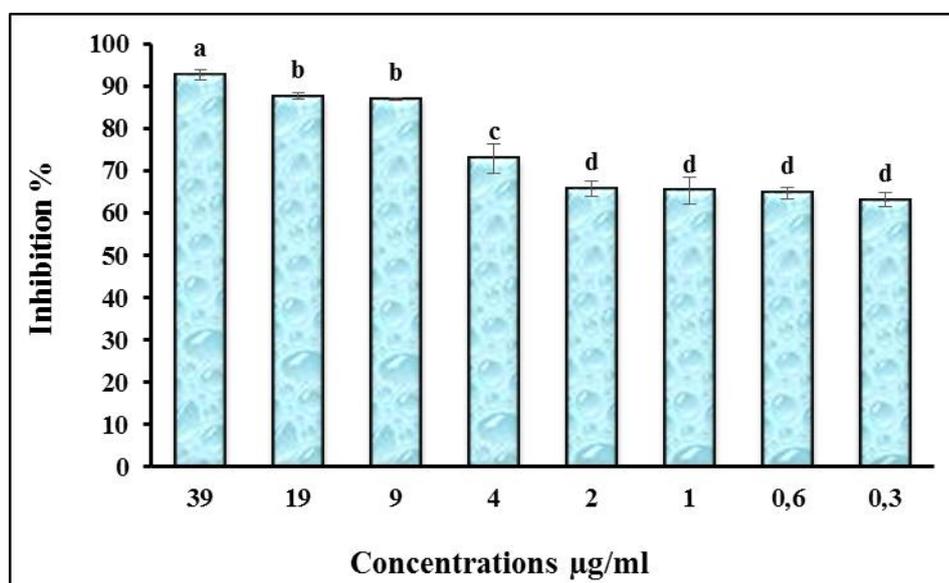


Figure 24 : Taux d'inhibition de *Microsporium audouinii* traité au voriconazole. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

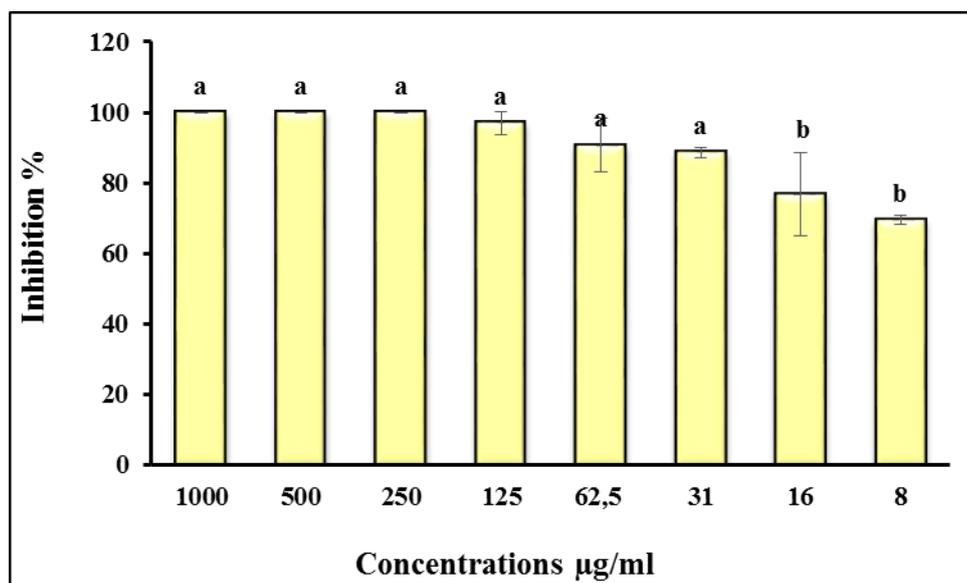


Figure 25 : Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité à l'extrait aqueux des fleurs de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

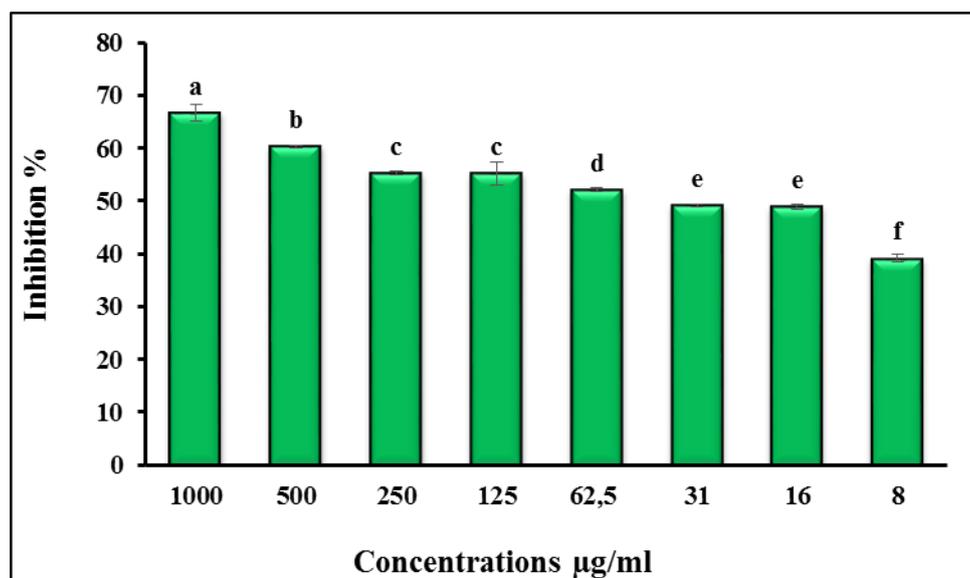


Figure 26 : Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité à l'extrait aqueux des feuilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

II-3-1-2-2- Extrait aqueux de feuilles

L'expérimentation a montré que les taux d'inhibition dépendent, bien entendu, des concentrations du milieu de culture en extrait aqueux produit à partir des feuilles ($F_2=126,49$; $P<0,05$). En effet, une relation proportionnelle a été observée entre l'inhibition de la croissance mycélienne du dermatophyte étudié et la concentration de l'extrait (Fig. 26). Comparativement à *M. audouinii*, la plus forte concentration (1000 μ g/ml) employée n'a pu éliminer ce champignon (66,66 \pm 1,53% d'inhibition). Les doses suivantes : 500- 250-125-62,5-31-16 et 8 μ g/ml enregistrent ainsi des taux d'inhibition de 60,32 \pm 0,27 - 55,23 \pm 0,37 - 52,14 \pm 0,45 - 49,18 \pm 0,20 - 48,89 \pm 0,47 et 39,15 \pm 0,78%.

II-3-1-2-3- Extrait aqueux de brindilles

Contrairement aux feuilles, l'extrait aqueux de brindilles a présenté un effet plus puissant. En effet, l'inhibition du champignon ressemblant aux fleurs, est vraisemblablement influencée par la concentration de ce dernier ($F_2=49,75$; $P<0,05$). L'inhibition totale (100%) de la croissance de cette souche a été enregistrée sur les lots 1000 – 500 – 250 et 125 μ g/ml. Cependant, des taux relativement faibles de 87,30 \pm 7,35% - 72,83 \pm 6,48% et 62,52 \pm 2,24% ont été notés lorsque le dermatophyte a été traité à raison de 62,5 – 31 et 16 μ g/ml. La valeur de 36,50 \pm 8,71% obtenue à 8 μ g/ml a été considérée comme l'effet inhibiteur le moins marqué (Fig. 27).

II-3-1-2-4- Voriconazole

La figure 28 montre une évolution croissante des taux d'inhibition, celle-ci est conditionnée par la concentration du voriconazole dans le milieu ($F_2=96,802$; $P<0,05$). Le minimum d'inhibition de 47,79 \pm 1,97% a été obtenu lorsque le milieu a été pollué avec 0,3 μ g/ml et un maximum de 93,66 \pm 0,70% à 39 μ g/ml. Entre ces deux valeurs limites, il a été enregistré des taux de 66,94 \pm 3,42 - 76,30 \pm 1,40 - 83,05 \pm 4,22 - 86,08 \pm 0,19 – 90,08 \pm 1,87 et 92,83 \pm 1,03% correspondant respectivement aux concentrations de 0,6 – 1 – 2 – 4 – 9 et 19 μ g/ml.

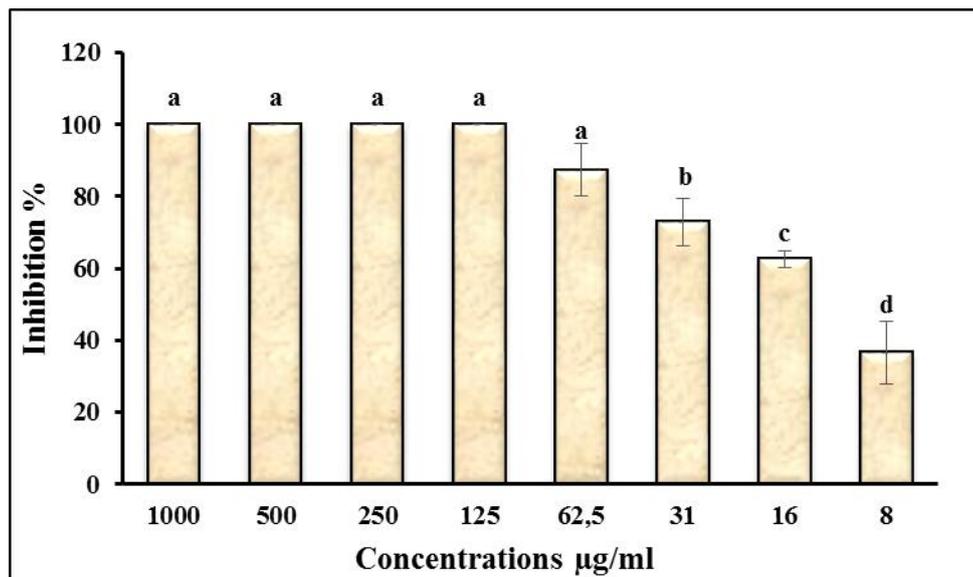


Figure 27 : Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité à l'extrait aqueux des brindilles de *Thymelaea hirsuta*. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

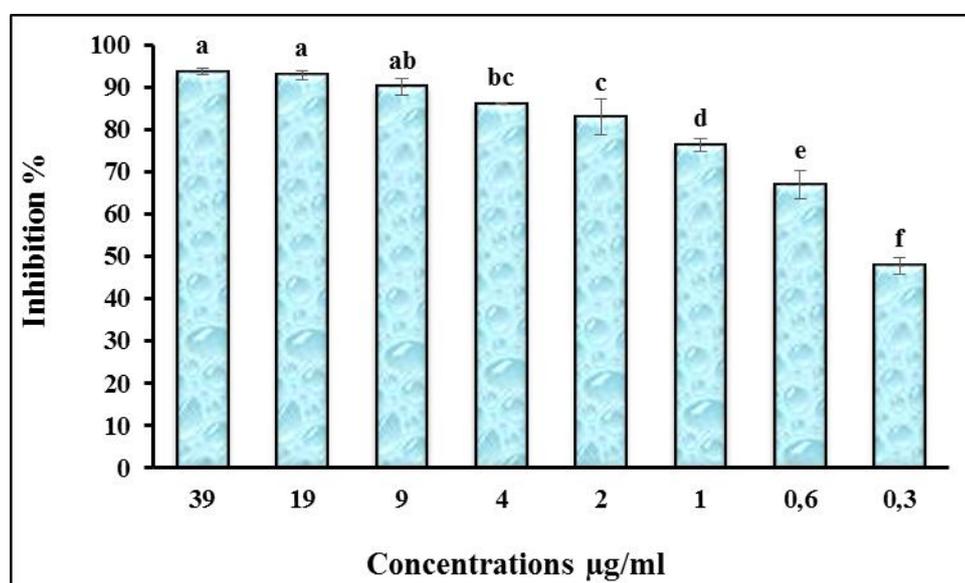


Figure 28 : Taux d'inhibition de *Trichophyton rubrum* traité au voriconazole. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $P < 0,05$).

II-3-2- Concentrations inhibitrices 80

Afin de mieux cerner l'effet antifongique de *Thymelaea hirsuta*, les concentrations inhibitrices responsables de la réduction de la croissance mycélienne, à raison de 80%, des deux dermatophytes étudiés (*Microsporum audouinii* et *Trichophyton rubrum*), ont été comparées par rapport au voriconazole.

Le tableau 10 permet de visualiser la forte influence de la voriconazole sur le comportement de *Microsporum audouinii*, suivie de l'extrait issu des feuilles, puis celui des brindilles et enfin des fleurs, avec des IC₈₀ respectivement de l'ordre de 6,33±1,95µg/ml, 8±3,76µg/ml, 24,23±5,69 et 46,75±13,33µg/ml.

L'effet inhibiteur, le plus saillant, de la voriconazole a été également confirmé sur *T. rubrum* notant une IC₈₀ de l'ordre de 1,48±0,44µg/ml. Suivie par l'extrait des fleurs (22,31±5,65µg/ml) et des brindilles (45,66±11,61µg/ml). Contrairement à ces données, l'IC₈₀ des feuilles s'est avérée plus forte que la dose maximale utilisée dans cette expérimentation.

La comparaison des concentrations inhibitrices montre nettement que c'est au niveau de voriconazole que les IC₈₀ les plus intéressantes ont été détectées, contrairement aux autres produits. Ceci est traduit par le fait qu'il s'agit d'un antifongique chimique pur (voriconazole).

II-3-3- Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Le Test de microdilution a été conduit selon les normes publiées par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, voir Matériel et Méthodes), suivant le document M38-A2. Ces essais permettent d'évaluer de façon quantitative l'activité antifongique exprimée en µg/ml. Cette valeur correspond à la concentration minimale qui permet l'inhibition de la croissance fongique observée à l'œil nu par l'absence de croissance dans les puits de la plaque de microdilution de 96 puits. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des champignons dermatophytes étudiés dans chaque puit. Ainsi, plus la valeur de CMI est faible, plus la capacité antifongique de l'extrait est élevée. D'après le tableau 11, tous les extraits de *Thymelaea hirsuta* préparés se sont révélés actifs envers toutes les souches fongiques testées, mais avec des degrés différents, ce qui s'est traduit par la différence des CMI. Toutefois, *Microsporum audouinii* montrent des CMI remarquables pour les extraits de fleurs avec une valeur de l'ordre de 125µg/ml, suivi des brindilles et des feuilles dont la CMI est de l'ordre de 500µg/ml. Quant à *Trichophyton rubrum*, l'extrait issu des brindilles présente la plus faible valeur (125µg/ml), celle des fleurs est de l'ordre de 250µg/ml, alors que les feuilles inhibent cette souche à une CMI nettement supérieure à celles obtenues ; CMI >1000µg/ml.

Une classification des extraits végétaux, sur la base des résultats des CMI, a été proposée par Aligiannis et ses collaborateurs (2001) :

- Forte inhibition : CMI inférieure à 50µg/ml ;
- Inhibition modérée : CMI varie de 600µg/ml à 1500µg/ml ;
- Faible inhibition : CMI supérieure à 1600µg/ml.

D'après cette classification, tous les extraits de *Thymelaea hirsuta* exercent une très forte inhibition sur les souches fongiques étudiés (*T. rubrum* et *M. audouinii*), hormis celui des feuilles ; une faible activité sur la souche *T. rubrum*.

II-2-4- Concentrations minimales fongicides (CMF)

Les activités fongistatiques (CFS) et fongicide (CMF) figurent dans le tableau 12. La Concentration Minimale Fongicide (CMF) a été déterminée par l'ensemencement du contenu des puits dans lesquels aucun trouble n'a été observé sur milieu gélosé (Sabouraud). C'est ainsi que La CMF est la plus petite concentration d'extrait qui donne 99,99% d'inhibition, comparativement au puit témoin de contrôle de croissance ou inversement. Celle-ci est la concentration qui laisse une survivance de 0,01% par rapport au tube témoin de contrôle de croissance.

Les résultats des essais obtenus, *in vitro* (Tableau 12), ont montré que l'extrait de fleurs a eu un effet fongicide vis-à-vis de *M. audouinii* à partir de la concentration 125µg/ml et contre *T. rubrum* à partir de 250µg/ml. Tandis que celui des brindilles est fongicide à partir de 500 et 1000µg/ml sur *M. audouinii* et *T. rubrum*, respectivement. Celui des feuilles a révélé une activité fongistatique à partir de 500µg/ml sur *M. audouinii*. Dans la fourchette des doses utilisées, une absence d'inhibition totale n'a pu être exprimée par l'addition de l'extrait foliaire. L'augmentation de la dose de ce dernier pourrait contribuer à l'élimination de *T. rubrum*.

En générale, la partie aérienne de *Thymelaea hirsuta* a été deux fois plus active sur *Microsporum audouinii* que sur *Trichophyton rubrum*. En outre, en termes d'efficacité, l'extrait des fleurs semblent être plus efficace que celui des brindilles et des feuilles sur les souches fongiques testées.

En plus, les extraits des fleurs, feuilles et brindilles ont provoqué des effets plus ou moins marqués sur l'aspect général, la production et la structure du mycélium, des éléments de dissémination et de résistance que sont les microconidies, les macroconidies et les chlamydozoospores. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration en extrait entraîne une diminution du nombre de macroconidies de *M. audouinii* et un changement de leur morphologie (filament tordus). Ainsi, les cloisons sont beaucoup moins visibles et les macroconidies sont translucides, comme vidées de leur contenu (Planche 5).

Tableau 10 : IC₈₀ en µg/ml des extraits de feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta* et de voriconazole vis-à-vis de *Microsporium audouinii* et *Trichophyton rubrum*.

IC ₈₀	Feuilles	Fleurs	Brindilles	Voriconazole
<i>Microsporium audouinii</i>	8±0,76	46,75±13,33	24,23±5,69	6,33±1,95
<i>Trichophyton rubrum</i>	IC ₈₀ >1000	22,31±5,65	45,66±11,61	1,48±0,44

IC₈₀ : Concentration permettant de réduire à 80% la croissance mycélienne du dermatophyte en µg/ml

Tableau 11 : CMI₁₀₀ en µg/ml des extraits de feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta* vis-à-vis de *Microsporium audouinii* et *Trichophyton rubrum*.

CMI ₁₀₀	Feuilles	Fleurs	Brindilles
<i>Microsporium audouinii</i>	500	125	500
<i>Trichophyton rubrum</i>	CMI>1000	250	125

CMI : Concentrations minimales inhibitrices en µg/ml

Tableau 12 : Activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en µg/ml des extraits de feuilles, fleurs et brindilles de *Thymelaea hirsuta* sur *Microsporium audouinii* et *Trichophyton rubrum*.

CMF	Feuilles	Fleurs	Brindilles
<i>Microsporium audouinii</i>	CFS 500	125	500
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	250	1000

CMF : Concentrations minimales fongicides en µg/ml

CFS : Concentrations fongistatiques en µg/ml

Au regard de ces résultats, l'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, de la plante de laquelle il a été issu et de la souche testée (Klervi, 2005). Néanmoins, aucune donnée bibliographique n'est aujourd'hui disponible sur l'activité antifongique des fleurs, brindilles et feuilles de *Thymelaea hirsuta* ce qui constitue l'un des intérêts de ce travail.

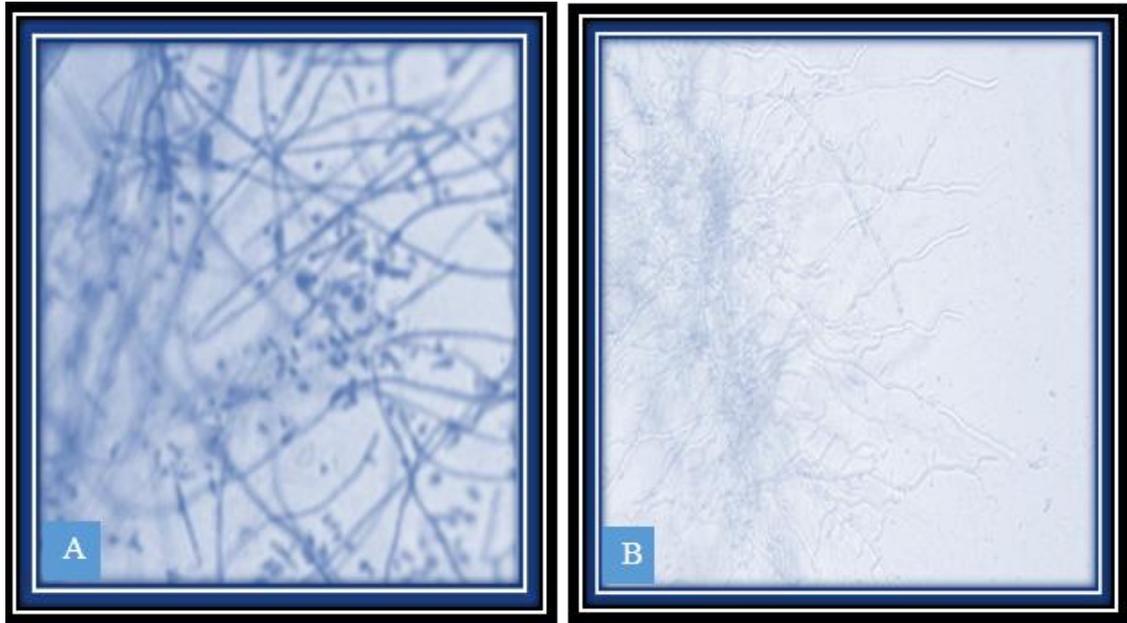


Planche 5 : **A** : photo des filaments de *Microsporium audouinii* sans traitement, **B** : photo (original) des filaments tordus de *Microsporium audouinii* traité (sous un microscope inversé).

Plusieurs recherches ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action des extraits de plantes. De nombreux chercheurs attribuent cette fonction au réservoir des composés polyphénoliques et terpéniques de cette plante. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs.

Ces composés peuvent interférer avec les biomembranes en causant des dommages cellulaires et provoquant la fuite de matériaux cellulaires, qui par conséquent contribuent à la mort des microorganismes (Mshvildadze et al., 2000 ; Veldhuizen et al., 2006 ; Abdel ghani et al., 2008). C'est un mécanisme possible par lequel la croissance mycélienne des champignons peut être réduite ou totalement inhibée par l'effet des extraits, en agissant sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire (Sikkema et al., 1995). Les composants des extraits tels que les terpènes affectent non seulement la perméabilité mais aussi d'autres fonctions dans les membranes cellulaires. Ces composés peuvent traverser les membranes cellulaires, pénètrent ainsi à l'intérieur de la cellule et interagissent avec des sites critiques intracellulaires tels que les enzymes et les protéines, ce qui conduit à la mort cellulaire (Omidbeygi et al., 2007 ; Cristani et al., 2007).

Selon McEwan (1994), l'inhibition de la croissance des filaments est due à l'empêchement de la germination des conidies par les composants des extraits. La germination des conidies est la première étape essentielle dans la séquence d'opérations menant à l'établissement d'un tube germinatif et d'un hyphes, par la suite. Le processus commence par l'hydratation suivie de l'action des enzymes lytiques telles que la chitinase et α et β - glucanases. Une fois que cet événement a lieu, il y a un équilibre entre les systèmes lytiques et synthétiques d'enzymes nécessaires pour la prolongation normale des hyphes. Un déséquilibre dans l'un ou l'autre système d'enzymes mène à l'inhibition et/ou à l'empêchement de la croissance.

Le mécanisme des effets antifongiques des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995).

Selon Chabot *et al.*, (1992), l'activité antifongique est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents fongiques que ceux portant le groupement hydroxyle. D'autre part, Mori *et al.*, (1987) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antifongique. De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il paraît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994).

Les travaux de Sarker *et al.*, (2005) montrent, également, que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antifongiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (Seidel, 2005). Par contre, Fogliani *et al.* (2005) et Yan *et al.* (2008) ont rapporté que la tendance de ces substances phytochimiques d'avoir une activité plus élevée sur l'ensemble des souches est en fonction de leurs concentrations dans les extraits.

Dans ce sens, une étude publiée par Valnet (2005) a montré que les composés chimiques ayant une efficacité antifongique à large spectre sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques, ainsi que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, les coumarines et les stéroïdes (Rouxel, T., 1989 ; Irobi et Daranola, 1994 ; Brantner *et al.*, 1996 ; Yan *et al.*, 2008).

En fait, Les saponines constituent une classe spéciale de glycosides qui ont, d'une part, une caractéristique savonneuse et d'autre part, une très bonne activité antifongiques (Sadipo et *al.*, 1991). De même, les saponines à génines stéroïdiques sont des fongicides plus efficaces que les saponines à génines triterpéniques (Berger, 2001).

Par ailleurs, les alcaloïdes renferment un effet détoxifiant et possèdent une très bonne activité antifongique (Zee-cheng, 1997).

Selon Farag et *al.* (1989), la présence des groupements OH dans les composés phénoliques est capable de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes et d'accroître l'activité antifongique. Il a été rapporté par Scalbert (1991) et Banso et Adeyemo (2007) que les tanins isolés des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons.

En revanche, l'activité antifongique chez certaines plantes est dû à la présence d'anthraquinones (Comini et *al.*, 2011; Doughari et *al.*, 2012).

D'après les résultats obtenus dans le chapitre I, *Thymelaea hirsuta* a montré une richesse diversifiée de composés chimiques tels que les phénols, les flavonoïdes, les tanins, les sucres, les protéines, les lipides, les terpènes, les acides phénoliques, les alcaloïdes, les coumarines et les anthraquinones. Cette diversité de composés pourrait expliquer l'activité antifongique de cette plante.

En se basant sur les résultats phytochimiques, la variation de la composition chimique en concentration entre organes explique donc les variations observées dans l'activité antifongique des extraits de cette plante. Les fleurs renferment une quantité appréciable en composés chimiques par rapport aux brindilles et aux feuilles. Ceci peut expliquer la forte activité de l'extrait des fleurs vis-à-vis des champignons dermatophytes étudiés.

ACTIVITE
ANTIOXYDANTE



Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtd

Document heading

doi:10.1016/S2222-1808(14)60324-8

© 2014 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L.

Nesrine Ouda Amari^{1*}, Mohamed Bouzouina², Abdellah Berkani², Brahim Lotmani²¹University of Mostaganem, Faculty of Sciences and the Natural Sciences and Life, BP300, Mostaganem 27000, Algeria²Plant Protection Laboratory, University of Mostaganem, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Dr. Nouredine Djebli, Professor,
Laboratory of Pharmacognosy Api
Phytotherapy, Department of Biology,
Faculty SNV, University of Mostaganem
Algeria.

Tel: +213772451866

E-mail: djebli_n@yahoo.fr

Comments

This is a good study in which the
authors evaluated phytochemical
qualitative and quantitative analysis
of total phenols, flavonoids and
antioxidant capacity of three part of *T.*
hirsuta.

Details on Page 108

ABSTRACT

Objective: To assess antioxidant activities of different aerial parts of *Thymelaea hirsuta* (*T. hirsuta*) from west Algeria, and to search for new sources of safe and inexpensive antioxidants.

Methods: Samples of leaves, stems and flowers from *T. hirsuta* were tested for total phenolic content, flavonoids content, and evaluation its total antioxidant activity, were done using the spectrophotometric analyses.

Results: Results of preliminary phytochemical screening of leaf, flower and stem of *T. hirsuta* revealed the presence of tannins, alkaloids, steroids, saponins, coumarins, reducteurs compound and anthraquinones. The total phenolics and flavonoids were estimated. The aqueous extracts of the aerial parts of *T. hirsuta* showed potent *in vitro* antioxidant activities using various models *viz*, DPPH scavenging assay, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and ABTS radical scavenging activity.

Conclusions: On the basis of the results obtained, *T. hirsuta* extracts are rich sources of natural antioxidants appears to be an alternative to synthetic antioxidants and this justifies its therapeutic usage.

KEYWORDS

Phytochemicals, Flavonoids, Total phenolics, Antioxidant, *Thymelaea hirsuta*

1. Introduction

The large generation of free radicals, particularly reactive oxygen species and their high activity plays an important role in the progression of a great number of pathological disturbances such as inflammation, atherosclerosis, stroke, heart diseases, diabetes mellitus, multiple sclerosis, cancer, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease[1,2]. Therefore, the great interest has been recently focused on the natural foods, medicinal plants and phytoconstituents due to their well-known abilities to scavenge free radicals (*i.e.* antioxidant power)[3]. Plants constitute an important source of active natural products which differ widely in terms of structures, biological properties and mechanisms of actions.

Various phytochemical components, especially polyphenols (such as flavonoids, phenyl propanoids, phenolic acids, tannins, *etc.*) are known to be responsible for the free radical scavenging and antioxidant activities. Polyphenols possess many biological effects, which are mainly attributed to their antioxidant activities in scavenging free radicals, inhibition of peroxidation and chelating transition metals. In general, polyphenols all share the same chemical patterns, one or more phenolic groups for which they react as hydrogen donors and in that way neutralize free radicals[4]. Recently, interest has increased considerably in finding naturally occurring antioxidants for use in medicinal materials to replace synthetic antioxidants, which are being restricted due to their carcinogenicity[5]. Phytochemicals are natural

*Corresponding author: Amari Nesrine Ouda, BP 300, Mostaganem 27000 Mostaganem, Algeria.

Tel: +213 770892174

Fax: +213 45214544

E-mail: nesrineamari@yahoo.fr; menaouar_31@yahoo.fr; berkani21@yahoo.fr

Foundation Project: Supported by University of Mostaganem, Faculty of Sciences and the Natural Sciences and Life (Grant No. 001).

Article history:

Received 10 Oct 2013

Received in revised form 19 Oct, 2nd revised form 27 Oct, 3rd revised form 10 Nov 2013

Accepted 20 Feb 2014

Available online 28 Apr 2014

bioactive compounds found in plants (flowers, leaves and shoots) that work with nutrients and fibers to act as defence system against disease or more accurately, to protect against disease. Some of the most important bioactive phytochemical constituents are flavonoids, tannins, terpenoids, saponins, phenolic compounds^[6]. *Thymelaea hirsuta* (*T. hirsuta*), commonly known as “Methnane” in Algeria, is an evergreen shrubs belonging to the flowering plant family Thymelaeaceae, which is native to the Mediterranean region, north of central Europe and east of central Asia. The plant is traditionally used in Tunisia as an antiseptic, anti-inflammatory and for the treatment of hypertension^[7]. The traditional medicinal use of this plant is not based on scientific research and few data dealing with its phytochemical composition are available^[8,9]. Hypoglycemic, antidiabetic and antioxidant properties of this plant extracts were previously highlighted^[10,11]. The antimelanogenesis effect of *T. hirsuta* extracts on B16 murine melanoma cells was reported by Kawano *et al*^[12]. Phytochemical analysis showed the presence of several daphnane diterpenes^[12,13]. The literature survey did not show any reference to previous work on the free radical scavenging and/or antioxidant properties of *T. hirsuta* (flowers, leaves and stem). Hence, the aim of the present study was designed to assess the *in vitro* antioxidant activity of aqueous extracts from flowers, leaves and stem of *T. hirsuta*, primary phytochemical screening of the main secondary metabolites classes of the aerial part of *T. hirsuta* and to determine the phenolic compounds and flavonoids contained in the aqueous extracts, in order to provide a scientific basis to justify its therapeutic usage and to search for new sources of safe and inexpensive antioxidants. The findings from this work may add to the overall value of the medicinal potential of the herb.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection

The aerial parts (leaves, flowers, stems) of *T. hirsuta* were collected from the region of north of the wilaya of Relizane (Algeria) and located at 82 m of altitude, 35°55'33'' N latitude and 0°49'23'' E longitude during the period of March 2012. The specimens were identified at the National Institute of Agronomy in Algiers (INA). The plant materials were separated into leaves, flowers and stems. The plant parts were dried in shade away from sunlight and at room temperature (25–28 °C), then grinded to fine powder using electric blender and stored in clean labeled airtight bottles.

2.2. Preparation of the plant extract

A 10% aqueous decoction was performed separately on different parts of each plant^[14]. A total of 100 g plant powder was placed in one liter of distilled water. After mechanical agitation, the preparation was carried in a water bath at 90 °C for 1 h. The cooled decoctions were vacuum filtered using glass microfiber filters Wattman No. 4 and concentrated under reduced pressure at 40 °C, using a rotary evaporator,

and then frozen and lyophilized.

2.3. Phytochemical screening

The phytochemical tests to detect the presence of tannins, saponins, coumarins, terpenoids, anthraquinones, reducteurs compounds and alkaloids were performed according to the method described by Harborne and Raman^[15,16]. The tests were based on the visual observation of color change or formation of a precipitate after the addition of specific reagents.

2.4. Determination of total phenolic content

The contents of total phenols aqueous extracts of different parts of *T. hirsuta* were determined by the modified Folin–Ciocalteu method^[17]. Thus, 1 mL of the aqueous extract of the plant was mixed with 5 mL of Folin Ciocalteu (2 mol/L) diluted 10 times. After 5 min of incubation, 4 mL of sodium carbonate at a concentration of 75 g/L was added and the volume was adjusted to 10 mL. The resulting mixture was incubated at room temperature for 1 h. The absorbances of the samples were measured at 765 nm using UV–vis spectrophotometer. Results were expressed as mg of gallic acid equivalent/g of lyophilized extract. The same procedure was used for making standard curve using gallic acid and concentration range of 0–10 µg/mL was taken. All experiments were carried out in triplicates.

2.5. Determination of total flavonoids content

A volume of AlCl₃ methanolic solution (0.5 mL, 2%, w/v) was mixed with methanolic extract solution (0.5 mL, 0.1 mg/mL). After 10 min, the optical densities were recorded at 430 nm against a blank (mixture of 0.5 mL methanolic extract solution and 0.5 mL methanol) and compared to the quercetin calibration curve (0 to 200 mg/L)^[18]. The data obtained were the means of three determinations. The amounts of flavonoids in the plant extracts were expressed as mg of quercetin equivalents (QE)/g of lyophilized extract.

2.6. Antioxidant capacity determined by diphenyl-1-picrylhydrazyl

Radical-scavenging activity of plant extracts against stable 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) was determined spectrophotometrically. The DPPH assay was carried out as described by Zuraini *et al*^[19]. Stock solutions of crude extracts were prepared as 1 mg/mL in methanol. Fifty microlitres of different concentration samples were added to 5 mL of 0.004% methanol solution of DPPH. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm. Ascorbic acid (Sigma–Aldrich), a stable antioxidant, was used as a synthetic reference. The assay was carried out in triplicate and percentage of inhibition was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(AB-AA)}{AB} \times 100$$

Where AB is absorbance of blank; AA is absorbance of test.

2.7. Antioxidant capacity determined by ABTS radical cation assay

The ABTS radical cation was generated by reacting 7 mmol/L ABTS stock solution with 2.45 mmol/L potassium persulfate solution, and the mixture was kept in the dark at room temperature for 12–16 h before use. Prior the assay, the ABTS⁺ solution was diluted with ethanol to an absorbance of (0.70±0.02) at 734 nm^[20]. An aliquot (50 µL) of each sample at different concentrations (0.4, 0.6, 0.8 mg/mL) was added to 5 mL of diluted ABTS⁺ solution. After 10 min, the absorbance was measured at 734 nm. The inhibition of ABTS radical cation in percent was calculated by the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{AC-(AS-AB)}{AC} \times 100$$

Where AC is absorbance of control; AS is absorbance of sample; AB is absorbance of blank.

Ethanol (5 mL) plus each sample solution (50 µL) was used as a blank. ABTS⁺ solution (5 mL) plus ethanol (50 µL) was used as a negative control. Also, Trolox solution (at the concentrations of 100, 80, 60, 40, 20, 0 µg/mL) was used as a positive control. All measurements were repeated in triplicate.

2.8. Antioxidant capacity determined by ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP assay was done according to Benzie and Strain with some modifications^[21]. The stock solutions included 300 mmol/L acetate buffer (3.1 g C₂H₃NaO₂·3H₂O) and 16 mL C₂H₄O₂, pH 3.6, 10 mmol/L 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) solution in 40 mmol/L HCl, and 20 mmol/L FeCl₃·6H₂O solution. The fresh working solution was prepared by mixing 25 mL acetate buffer, 2.5 mL TPTZ solution, and 2.5 mL FeCl₃·6H₂O solution and then warmed at 37 °C before using. An aliquot (0.3 mL) of each sample at different concentrations (0.4, 0.6, 0.8 mg/mL) were allowed to react with 9 mL of the FRAP solution and 300 µL of distilled water for 30 min in the dark condition. The absorbance of the reaction mixture was then recorded at 593 nm. The standard curve was linear between 0 and 300 µmol/L Trolox. All measurements were carried out in triplicate.

2.9. Statistical analysis

Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (*r*) in bivariate linear correlations (*P*<0.01). All statistical analyses were performed with the Statistica 7.0 software for Windows.

3. Results

3.1. Phytochemical screening

The phytochemical qualitative and quantitative analysis of

leaf, flower and stem of *T. hirsuta* revealed the presence of tannins, alkaloids, steroids, saponins, coumarins, reducteurs compound and anthraquinones (Table 1). Reducteurs compound were not detected in the stem.

Table 1

The phytochemical screening of the aerial part of *T. hirsuta*.

Test group	Leaf	Flower	Stem
Alkaloids	+	++	++
Tannins	+	+++	+
Saponins	+	++	++
Coumarins	++	++	+++
Terpenoids	++	+++	+
Reducteurs compound	+	+++	–
Anthraquinones	+	+	+

(–): not detectable; (+): low quantities; (++): high quantities; (+++): very high quantities.

3.2. Determination of total phenolic content and total flavonoids

The present study revealed relatively high level of total phenols content and flavonoids of the aqueous extract of the three parts of *T. hirsuta* as shown in Table 2. The concentrations of phenol [(113.96±9.97) mg gallic acid equivalent/g of lyophilized extract] and flavonoids content [(5.70±0.06) mg quercetin equivalent/g of lyophilized extract] were high in flower extract while in stem extract there was (93.78±3.12) mg gallic acid equivalent/g of lyophilized extract and (2.61±0.13) mg quercetin equivalent/g of lyophilized extract. The leaf extract showed the least concentration of phenol contents [(61.12±1.28) mg gallic acid equivalent/g of lyophilized extract]. The concentrations of flavonoids were comparatively low in the stem extract while in leaf extract were a value of (3.15±0.15) mg quercetin equivalent/g of lyophilized extract was recorded.

Table 2

Levels of total phenolic and flavonoids contents in aqueous extract of *T. hirsuta*.

Species	Total phenolic (mg GAE/g)	Total flavonoids (mg QE/g)
Leaf	61.12±1.28	3.15±0.15
Flower	113.96±9.97	5.70±0.06
Stem	93.78±3.12	2.61±0.13

Data are expressed as mean±SD. mg GAE/g; mg of gallic acid equivalent per g of lyophilized extract; mg QE/g; mg of quercetin equivalent per g of lyophilized extract.

3.3. In-vitro antioxidant activity

The leaf, flower and stem extracts *T. hirsuta* were found to possess concentration dependent scavenging activity on DPPH radicals and the results are presented in Table 3. So the aqueous extracts of flower and leaf exhibited great antioxidant effects at 8 mg/mL (90.83% and 71.90%, respectively) compared with the high antioxidant effect of ascorbic acid. ABTS stable free radical with the characteristic absorption at 734 nm was used to study the radical scavenging effect of *T. hirsuta* extract reacted with

ABTS at different concentrations (0.4, 0.6, and 0.8 mg/mL) and readings were recorded by measuring the reduction of radical cation generated by ABTS⁺ at 734 nm. The flower and stem extracts of *T. hirsuta* showed maximum decoloration of 0.8 mg/mL with (68.63±0.53)% and (43.04±1.28)% respectively, and the leaf showed less decoloration (Table 3). The results obtained clearly implied that the aqueous extracts of the different organs inhibited the radical or scavenge the radical in a concentration dependent manner. The reducing power of the different parts extracts of *T. hirsuta* was found to be steadily increased in direct proportion to the increasing concentration of the extract in the following order, flowers>stem>leaves (Table 3). The reducing power of flower, stem and leaf extracts of *T. hirsuta* at 0.8 mg/mL concentration was found to be 0.810, 0.530 and 0.460 respectively.

Table 3

Total antioxidant activity, DPPH assay, ABTS⁺ assay and FRAP assay of the aerial part of *T. hirsuta*.

Test group	Concentration (mg/mL)	Leaf	Flower	Stem
DPPH (% I)	4.0	40.15±0.96	72.47±0.29	34.35±0.41
	6.0	57.30±0.47	83.69±1.29	53.20±0.89
	8.0	71.90±0.29	90.83±0.32	62.34±2.01
ABTS ⁺ (% I)	0.4	14.52±1.50	28.54±5.74	21.69±1.07
	0.6	18.42±0.18	44.46±0.10	31.40±0.16
	0.8	24.52±1.08	68.63±0.53	43.04±1.28
FRAP absorption value	0.4	0.25±0.01	0.440±0.01	0.33±0.03
	0.6	0.35±0.02	0.660±0.02	0.41±0.01
	0.8	0.46±0.01	0.810±0.01	0.53±0.02

Data are expressed as mean±SD. (% I): Percentage inhibition of radical scavenging.

3.4. Correlation of different antioxidant assay of the aerial part of *T. hirsuta*

The Pearson correlation among the results of different antioxidant assay of leaves, flowers and stems from *T. hirsuta* are summarized in Table 4. There were good correlations among the antioxidant activities based on ABTS and FRAP assay and DPPH radical scavenging. The highest correlation coefficient found was for the relationship between antioxidant activity assessed by the ABTS stem and the FRAP stem ($r=0.997$). A similar correlation was observed among ABTS leaf and FRAP leaf, FRAP stem and ABTS stem,

while the correlation coefficient for the relation between ABTS flower and FRAP flower, FRAP flower and ABTS flower were a little bit lower, equal to 0.782.

4. Discussion

The vital role of antioxidants is their interaction with oxidative free radicals. Because of its extra electron, DPPH gives a strong absorption band at 517 nm in visible spectroscopy. The efficacies of antioxidants are often associated with their ability to scavenge stable free radicals[22]. It has been shown that the scavenging effects on the DPPH radical increase sharply with the increasing concentration of the samples and standards to a certain extent[23]. In the present study, *T. hirsuta* extract (leaf, flower, stem) exhibited concentration dependent scavenging activity against hydroxyl radical in a reaction system, and the free radical scavenging potentials of the extracts of were found to be in the order of flower extract>leaf extract>stem extract. It appears that the three aerial parts extracts from *T. hirsuta* possess hydrogen donating capabilities to act as antioxidant.

The working mechanism of the ABTS method for the evaluation of antioxidant activity is the same as that of the DPPH method, but the ABTS method is more reliable than the DPPH method due to the solubility of the ABTS reagent in both aqueous solvents as compared to DPPH[24]. For that reason, ABTS assay is better than DPPH assay when applied to a variety of plant foods containing hydrophilic, lipophilic, and high-pigmented antioxidant compounds[25]. From the result, the flower extract of *T. hirsuta* possessed the highest ABTS scavenging capacity whereas the leaf extract of *T. hirsuta* showed the lowest ABTS scavenging activity. Higher concentrations of the extracts were more effective in quenching free radicals in the system[26]. For that reason, the results clearly imply that the aqueous extracts of different organs inhibit the radical or scavenge the radical in a concentration dependent manner. The scavenging activity of ABTS by the plant extract was found to be remarkably high. This implies that the plant extracts could be useful for treating radical-related pathological damages especially at higher concentrations. In the present study, the reducing power of the different parts extracts of *T. hirsuta* was found to be steadily increased in direct proportion to the increasing concentration of the extract. The presence of reductants like

Table 4

Pearson's correlation coefficients (r) of antioxidants activities of the aerial part of *Thymelaea hirsuta*

	ABTS ₊ stem	ABTS ₊ leaf	ABTS ₊ flower	FRAP stem	FRAP leaf	FRAP flower	DPPH stem	DPPH leaf	DPPH flower
ABTS ₊ stem	1	–	–	0.997	–	–	0.987	–	–0.857
ABTS ₊ leaf	–	1	–	–	0.990	–	–	–0.841	–
ABTS ₊ flower	–	–	1	–	–	–0.782	–	–	–
FRAP stem	0.997	–	–	1	–	–	0.980	–	–
FRAP leaf	–	0.996	–	–	1	–	–	–0.783	–
FRAP flower	–	–	–0.782	–	–	1	–	–	0.954
DPPH stem	0.987	–	–	–	–	–	1	–	–
DPPH leaf	–	–0.841	–	–	–0.783	–	–	1	–
DPPH flower	–	–	–0.857	–	–	0.954	–	–	1

antioxidant substances in the samples causes a reduction of the Fe^{3+} to Fe^{2+} form. Therefore, the ability of a compound to transfer electron is a significant indicator of its potential as an antioxidant[27]. This indicates that the antioxidant compounds are electron donors and could reduce the oxidized intermediate of lipid peroxidation processes; thus acting as primary and secondary antioxidants[28]. These findings verify the efficiency of the different parts extracts of *T. hirsuta* against the ABTS radical cation, DPPH radical as well as in FRAP assay. There were good correlations among the antioxidant activities based on ABTS and FRAP assay and DPPH radical scavenging because all these assays share the same principle (single electron transfer). High correlation is also found between these three assays in other plant derived samples[29]. Strong correlation of ABTS with FRAP confirms the authenticity of results of antioxidant potential for the three organ extracts of *T. hirsuta*. Quantitative phytochemical analysis indicated that the different organs of *T. hirsuta* contains significant amounts of phenolics compounds such as total phenolic and flavonoids. The amount of total phenolic compounds in all tested organs of the *T. hirsuta* was higher than some Asian vegetables[30], some herbs and medicinal plants such as *Armoracia rusticana*, *Fallopia convolvulus*, *Matricaria matricarioides*, *Trifolium hybridum* and *Typha latifolia*[31]. Thus, these classes of compounds were responsible for antioxidant and free radical scavenging effect of plant materials[32]. The determination of antioxidant activity of plant extracts is an unresolved problem. The results from different antioxidant assays are even difficult to compare because of the difference in substrates, probes, reaction conditions and quantification methods[33]. The antioxidant activity of phenolic compounds is mainly due to their redox properties, which play an important role in neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen. Flavonoids are wide spread in all natural compounds and possess a broad spectrum of biological activities. The chemical composition of flower, stem and leaf of *T. hirsuta* indicated the presence of phenolic compounds including flavonoids, which are known to possess antioxidant activities[34]. The high phenolic and flavonoids contents in *T. hirsuta* may be responsible for its free radical scavenging activity. Moreover, screening of phytochemical compounds in *T. hirsuta* revealed the presence of tannins, alkaloids, steroids, saponins, coumarins, reducteurs compound and anthraquinones. The antioxidant activities of *T. hirsuta* extract are due to the presence of these phytochemicals and thus the plant could serve as potential source in herbal medicine drugs. In the current investigation, the extracts from *T. hirsuta* flower, stem and leaf gave good results indicating that it possesses significant amount of phytochemicals and *in vitro* antioxidant activity. Phenolic compounds and other phytochemicals appear to be responsible for the *in vitro* antioxidant activity of the extracts and may contribute to the therapeutic activity observed. On the basis of the results obtained, *T. hirsuta* extracts are rich sources of natural antioxidants appears to be an alternative to synthetic antioxidants. This study was the first report about the antioxidant activities of different parts of *T. hirsuta*. Further investigation to determine antioxidant

activity by *in vivo* methods could be considered.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the help of Prof. Djebli N and Dr. Moussa A. This work was supported by University of Mostaganem, Faculty of sciences and the natural sciences and life (Grant No. 001).

Comments

Background

Plants constitute an important source of active natural products which differ widely in terms of structures, biological properties and mechanisms of actions. Various phytochemical components, especially polyphenols (such as flavonoids, phenyl propanoids, phenolic acids, tannins, etc.) are known to be responsible for the free radical scavenging and antioxidant activities.

Research frontiers

Studies are being performed in order to determine that *T. hirsuta* extracts are rich sources of natural antioxidants, which appear to be an alternative to synthetic antioxidants and justify its therapeutic usage.

Related reports

Data regarding phytochemical qualitative and quantitative analysis are in agreement with more researchers in the same domain, the same remarque about antioxidant activities.

Innovations & breakthroughs

Results of preliminary phytochemical screening of leaf, flower and stem of *T. hirsuta* revealed the presence of tannins, alkaloids, steroids, saponins, coumarins, reducteurs compound and anthraquinones. The total phenolics and flavonoids were estimated. The aqueous extracts of the aerial parts of *T. hirsuta* showed potent *in vitro* antioxidant activities using various models *viz*, DPPH scavenging assay, FRAP and ABTS radical scavenging activity.

Applications

It may be significant to know antioxidant capacity of *T. hirsuta*. The results of the present study suggest relatively high level of total phenols content and flavonoids of the aqueous extract of the three organs of *T. hirsuta*.

Peer review

This is a good study in which the authors evaluated phytochemical qualitative and quantitative analysis of total phenols, flavonoids and antioxidant capacity of three parts of *T. hirsuta*.

References

- [1] Rahman T, Hosen I, Towhidul Islam MM, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol* 2012; **3**: 997–1019.
- [2] Doughari JH, Human IS, Bennade S, Ndakidemi PA. Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *J Med Plants Res* 2009; **3**(11): 839–848.
- [3] Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 2005; **89**: 27–36.
- [4] Riaz T, Abbasi MA, Aziz-Ur-Rehman, Shahzadi T, Qureshi MZ, Ajaib M. Dicteria bupleuroides: an imperative source for protection from oxidative stress. *J Chem Soc Pak* 2012; **34**(2): 326–331.
- [5] Rameshkumar A, Sivasudha T. *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of aqueous and methanolic extract of *Mollugo nudicaulis* Lam. leaves. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(Suppl 2): S895–S900.
- [6] Krishnaiah D, Devi T, Bono A, Sarbatly R. Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants. *J Med Plants Res* 2009; **3**(2): 67–72.
- [7] Le Floe'h E. [Contribution to an ethnobotanical study of the Tunisian Flora]. 2nd ed. Tunisian Scientific Publications; 1983. French.
- [8] Borris RP, Blaskó G, Cordell GA. Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J Ethnopharmacol* 1988; **24**: 41–91.
- [9] García-Granados A, Sáenz de Buruaga JM. [Thymelaeaceae phytochemistry – I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L]. *Anales Quim Ser C: Quim Org Bioquim* 1980; **76**: 94–95. Spanish.
- [10] Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006; **97**: 654–660.
- [11] El Amrani F, Rhallab A, Alaoui T, El Badaoui K, Chakir S. Hypoglycaemic effect of *Thymelea hirsuta* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plants Res* 2009; **3**: 625–629.
- [12] Kawano M, Matsuyama K, Miyamae Y, Shinmoto H, Kchouk ME, Morio T, et al. Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Exp Dermatol* 2007; **16**(12): 977–984.
- [13] Brooks G, Evans AT, Aitken A, Evans FJ, Rizk AF, Hammouda FM, et al. Daphnane diterpenes of *Thymelea hirsuta*. *Phytochemistry* 1990; **29**(7): 2235–2237.
- [14] Kumar G, Karthik L, Kokati VB. Antimicrobial activity of latex of *Calotropis gigantea* against pathogenic microorganisms – An *in vitro* study. *Pharmacologyonline* 2010; **3**: 155–163.
- [15] Raman N. *Phytochemical technique*. New Delhi: Indian Publishing Agencies; 2006, p. 19.
- [16] Harborne JB. *Phytochemical methods*. New Delhi: Springer (India) Pvt. Ltd.; 2005, p. 17.
- [17] Milliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004; **85**: 231–237.
- [18] Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 2002; **10**: 178–182.
- [19] Zakaria Z, Aziz R, Lachimanan YL, Sreenivasan S, Rathinam X. Antioxidant activity of *Coleus blumei*, *Orthosiphon stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae family. *Int J Nat Eng Sci* 2008; **2**: 93–95.
- [20] Huang MH, Huang SS, Wang BS, Wu CH, Sheu MJ, Hou WC, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds *ex vivo* and *in vivo*. *J Ethnopharmacol* 2011; **133**: 743–750.
- [21] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; **239**: 70–76.
- [22] Krishnaraju AV, Rao CV, Rao TV, Reddy KN, Trimurtular G. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Aphanamixis polystachya* bark. *Am J Infect Dis* 2009; **5**: 60–67.
- [23] Philip D, Kaleena PK, Valivittan K. Antioxidant potential of *Sansevieria roxburghiana* Schult. and Schult. F. *Asian J Pharm Clin Res* 2012; **5**(3): 166–169.
- [24] Teow CC, Truong VD, McFeeter RF, Thompson RL, Pecota KV, Yencho GC. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem* 2007; **103**: 829–838.
- [25] Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Comp Anal* 2011; **24**: 1043–1048.
- [26] Harsha SN, Anilakumar KR, Ilaiyaraja N. Biomolecule protective, antioxygenic and anxiolytic properties of *Piper betel* leaves extract. *Int J Phytomedicine* 2012; **4**(2): 197–204.
- [27] Sudha G, Priya MS, Shree RI, Vadivukkarasi S. *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*Solanum muricatum* Aiton). *Int J Curr Pharm Res* 2011; **3**(2): 137–140.
- [28] Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Alegro A, Kőszegi T, Petrik J. Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. *Molecules* 2011; **16**(2): 1454–1470.
- [29] Connor AM, Luby JJ, Tong CB. Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant activity assays. *J Am Soc Hortic Sci* 2002; **127**: 238–244.
- [30] Kaur C, Kapoor HC. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Technol* 2002; **37**: 153–161.
- [31] Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999; **47**: 3954–3962.
- [32] Hasanuzzaman Md, Ramjan Ali Md, Hossain M, Kuri S, Islam MS. Evaluation of total phenolic content, free radical scavenging activity and phytochemical screening of different extracts of *Averrhoa bilimbi* (fruits). *Int Curr Pharm J* 2013; **2**(4): 92–96.
- [33] Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 2005; **80**: 1925–1941.
- [34] Subhashini N, Nagarajan G, Kavimani S. *In vitro* antioxidant and anticholinesterase activities of *Garcinia combogia*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011; **3**: 129–132.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSION

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, les plantes médicinales restent toujours leurs sources fiables dont il faut tirer le maximum de profit pour le bien-être des populations, surtout des plus démunies.

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont révélé la présence des alcaloïdes, des tanins, des quinones, des oses et des holosides, des mucilages, des dérivés anthracéniques (O-hétérosides à génines réduits et C- hétérosides), des coumarines, des stérols des triterpènes, des génines libres, des saponosides et des leucoanthocyanes à différentes proportions dans les trois organes de la plante, et l'absence des anthocyanes, des anthraquinones libres, des hétérosides cardiotoniques, des hétérosides cyanogénique, des protéines et des stupéfiants. Cependant, les caroténoïdes, les proanthocyanidols et les composés réducteurs ont été exclusivement présents dans les feuilles et les fleurs. Parallèlement, l'analyse effectuée par chromatographie sur couche mince a permis de mettre en évidence, dans ces derniers, certaines classes de métabolites secondaires appartenant au groupe des polyphénols : les flavonols, les flavanones, les aures et les acides phénols, dont les propriétés thérapeutiques ont été prouvées.

L'estimation quantitative des métabolites secondaires (phénols totaux, flavonoïdes totaux et des tanins condensés) dans les organes analysés a montré que l'extrait issu des fleurs est relativement le plus riche.

L'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) avec source Electrospray (ESI) a été faite pour la première fois sur les fleurs, les feuilles et brindilles de *Thymelaea hirsuta* dans le but de déterminer la nature des composés. Les principaux composants de ces extraits (feuilles, fleurs, brindilles) appartiennent à la famille des polyphénols dans laquelle les sous familles des acides hydroxycinamiques (acide ferulique, acide caféique, acide chlorogénique, acide feruloylquinique...), des coumarines (esculétine, scopolétine, sphondine, rutarensine...) et des flavonoïdes (Isochamaejasmine, kaempférol, apigénine....) sont bien présents.

La détermination des métabolites primaires a également été réalisée. Les sucres totaux et les sucres réducteurs semblent être plus abondants respectivement dans les feuilles et des brindilles. Cependant, contrairement aux brindilles, dans l'extrait aqueux des fleurs suivis de celui des feuilles, se sont les lipides totaux qui enregistrent des taux considérables. Qualitativement, que se soit pour les fleurs, les feuilles ou les brindilles, le profil des acides gras (AG) accompli par chromatographie phase gazeuse (CPG) révèle une abondance d'acides gras saturés (acide caprique, laurique, myristique, palmétique, stéarique, arachidique, béhémique et lignocérique). Quant aux acides gras monoinsaturés (acide palmitoleique, oléique et gadoléique), une prépondérance dans les fleurs a été notée par rapport aux feuilles et brindilles. Alors que pour les acides gras polyinsaturés et les

oméga6, une supériorité a été détectée dans les feuilles suivie des brindilles, puis des fleurs. De même, les feuilles renferment plus d'oméga3.

Dans la partie biologique du travail, l'investigation *in vitro* de l'activité antifongique vis-à-vis des dermatophytes par la méthode de microdilution en milieu liquide a révélé que les extraits préparés à partir des différents organes possèdent une remarquable activité antifongique. Celle-ci est certainement liée à leur richesse en composés bioactifs, largement répandus dans les plantes médicinales. L'extrait des fleurs et des brindilles possèdent une activité fongicide sur les deux souches de dermatophytes testés. La meilleure activité fongicide, à l'encontre de *Microsporum audouini* et *Trichophyton rubrum*, a été obtenue en utilisant respectivement les extraits de fleurs et des brindilles, par contre celui des feuilles a confirmé son effet fongicide uniquement sur *M. audouinii*.

L'étude de l'activité antioxydante des différentes parties de la plante a été évaluée, *in vitro*, par les trois techniques : DPPH, FRAP et ABTS. Les résultats du piégeage du radical libre DPPH ont justifié l'importance en pouvoir antioxydant des différents extraits aqueux. L'ordre décroissant du pouvoir antiradicalaire est comme suit : brindilles > feuilles > fleurs. Alors que le test d'ABTS montre que l'extrait de fleurs semble dévoiler une activité antioxydante meilleure que celle provoquée par les brindilles. Les feuilles présentent les composés les moins efficaces dans l'élimination des radicaux libres. L'activité antioxydante par la méthode FRAP a également montré la relation dépendante entre la capacité de réduire le fer et l'augmentation de la concentration de l'extrait. Comme il a été remarqué, une capacité intéressante a été présentée par les différents extraits. Néanmoins, celui des fleurs semble montrer une activité plus puissante. Ces données peuvent témoigner, par le biais des trois méthodes utilisées (FRAP, DPPH et ABTS), de la bonne activité antioxydante et une capacité de piégeage de radicaux libres intéressante, en particulier celle obtenue par l'extrait de fleurs. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique.

Les résultats enregistrés aussi bien par les différents dosages et les réactions de caractérisation que par les tests des activités biologiques ont permis de confirmer l'utilisation traditionnelle de *Thymelaea hirsuta* en milieu rural. De plus, il est à prédire que les fleurs, les brindilles et les feuilles de *T. hirsuta* sont des antifongiques naturels très efficaces, du fait qu'il s'agit des extraits aqueux bruts, et peuvent être une source très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer ces infections.

L'ensemble de ces résultats ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et sources naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence. Il serait souhaitable de compléter et approfondir ce travail par une étude phytochimique plus détaillée.

* Dans un premier temps, faire un fractionnement de ces extraits afin d'identifier les molécules responsables du pouvoir antioxydant, en utilisant des techniques d'identification plus performantes.

* Dans un deuxième, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes et d'orienter les tests, *in vivo*, afin de déterminer de nouveaux agents thérapeutiques.

* Il serait également intéressant d'évaluer l'activité antifongique, *in vitro*, sur des cultures cellulaires de cellules isolées de l'organisme étudié pour justifier les résultats obtenus, ainsi que sur des souches cancéreuses.

* Une utilisation *in vivo*, des molécules bioactives isolées, serait souhaitable pour déterminer les tissus et organes cibles et rechercher par conséquent leurs mécanismes d'action au niveau tissulaire et moléculaire. Cette étude permettrait alors, de mettre en évidence le principe actif de (ou des) l'extrait de *Thymelaea hirsuta* et/ou une éventuelle synergie entre les différents composés chimiques.

* Enfin d'autres activités biologiques peuvent également être évaluées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (antidiabétique, antitumorale ... et autres).

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdel ghani, s.b., Weaver, l., zidan, z.h., hussein, m.a., keevil, c.w. & brown, r.c.d. 2008.** Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18 : 518-522.
- Abou-Karam M., El-Shaer, N.S., Shier, W.T. 1998.** Inhibition of oncogene product enzyme activity as an approach to cancer chemoprevention. Tyrosine-specific protein kinase inhibition by daphnoretin from *Thymelaea hirsuta* root. *Phytother. Res*, 12(4): 282-284.
- Aboulmakarim, S., Tligui, H., Mrini, M. E., Zakaria, I., Handour, N., & Agoumi, A. 2010.** Ootomycoses. *Mycologie medicale elsevier*, 20(1) : 48-52.
- Adjanohoun E., Alyi, A.M., Aké Assi, L., Baniankina J., Chibon, P., Cusset, G., Doulou, V., Enzanzan, A., Eymé, J., Gondoté, E., Keita, A., Mbemba, C., Mollet, J. 1980.** Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Niger. *ACCT éd. Paris*, 105p.
- Aganga, A.A., Mosase, K.W., 2001.** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 91:107-113.
- Ajello, L., Cheng, S. 1967.** The perfect state of Trichophyton mentagrophytes ; *Sabouraudia*, 5 : 230-234.
- Alijiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem*, 40: 4168-4170.
- Akrout, A., Gonzalez, L.A., El Jani, H., Madrid, P.C. 2011.** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern of Tunisia. *Food Chemistry and Toxicology*, 49 : 342–347.
- Alomar, K. et al. 2013.** Synthesis, structure and antifungal activity of thiophene-2,3-dicarboxaldehyde bis (thiosemicarbazone) and nickel (II), copper (II) and cadmium (II) complexes: Unsymmetrical coordination mode of nickel complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 126:76-83.
- Alverson, W.S., Karol, K.G., Baum, D.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., McCourt, R., Sytsma, K.J. 1998.** Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae : Evidence from *rbcL* sequence data. *Am. J. Bot.*, 85 : 876-887.
- Amadou, D. 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (Myrtaceae). Thèse, Pharmacie, Université de Bamako (Mali). 99 pp.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. 1996.** Advances in the developpement of pharmaceutical antioxidant drug. *Food Chem*, 28: 65-180.
- Anonyme. 2005.** *Thymelaea hirsuta*. Paris: tela-botanica.
- APG [Angiosperm Phylogeny Group] 2003.** An update of the angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc*, 141: 399–436.

- Amarti, F. 2009.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(1) : 141-148.
- Antwerpen, P.V. 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myclopéroxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.
- Asad, SF., Singh, S., Ahmad, A., Hadi, SM., 1998.** Flavonoids : antioxidants in diet and potentiel anticancer agents. *Medical Science Research*, 26 : 273-728.
- Azza, Z, Marnissi F, Naya A, Benjelloun N, Zamiyati S, Amrani M, et al. 2012.** Toxicological evaluation of *Thymelaea hirsuta* and protective effect against CCl₄-induced hepatic injury in rats. *Int J Biol Chem Sci*, 6: 379–93.
- Baba, K., Takeuchi, K., Kozawa, M. 1987.** Chemical study on the constituents of the Thymelaeaceous plants – V. Structure of a new biflavonoid, daphnodorin from the root of *Daphne odora* Thunb. *Yakugaku Zasshi*, 107 : 863-868.
- Baba, K., Tabata, Y., Taniguti, M., Kozawa, M. (1989).** Coumarins from *Edgeworthia chrysantha*. *Phytochemistry*, 28 : 221-225.
- Baba, K., Taniguti, M., Yoneda, Y., Kozawa, M. (1990).** Coumarin glycosides from *Edgeworthia chrysantha*. *Phytochemistry*, 29 : 247-249.
- Badillet G. 1975.** Les dermatophytes. *Atlas Clinique et Biologique* ; Varia edit., paris, 209p.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Bhandurage, P., Rajarajeshwari, N.B., Ganapatya, S., Pattanshettib, S. 2013.** The *Gnidia* genus: A review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(19) : 1-31.
- Banso, A. & Adeyemo, S.O., 2007.** Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. *African Journal of Biotechnology*, 6 : 1785-1787.
- Bartosikova, L., necas J., Suchy, V., Kubinova, R. 2003.** Antioxydative effects of morine in ischemia, reperfusion of kidney in the laboratory. *Drug and Chemical Toxicology*, 72:87-94.
- Barlow, S.M. 1990.** Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson, B.J.F, *Food Antioxidants*, pp 253-307.
- Barbin, P. 2006.** Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Bastos, D.H.M., Luciane, A., Saldanha, Rodrigo, R., Catharino, Alexandra, C. H. F., Sawaya, Ildenize, B. S., Cunha, Patrícia, O., Carvalho, and Marcos, N., Eberlin. 2007.** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*, 12: 423-432.

- Batanoumy, K. 2005.** *Thymelaea hirsuta* (L.) end. Thymelaeaceae. A guide to medecinal plant in northafrica .publié par *ilucn international malaga*, spain.
- Bate-Smith, EC., 1954.** The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn. Soc. London*, 58 (371) : 95 p.
- Beniston, W. S. 1984.** Fleurs d'Algérie. Alger: Edition Entreprise Nationale du livre.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239 : 70-76.
- Berger, j. M. 2001.** Thèse de doctorat PhD, Virginia.
- Berset, C. & Cervelier, M.E. 1996.** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, 16 : 219-245.
- Biabiany, M. 2011.** Recherche et développement d'extraits antifongique issus de la flore guadeloupéenne : caractérisations phytochimiques, pharmacologiques et formulation. Thèse de Doctorat de l'Université Lille Nord de France, Lille.
- Biyiti, L.F., Meko'o, D.J.L., Tamzc, V., Amvam Zollo, P.H. 2004.** Recherche de l'activité antibactérienne de quatre Plantes médicinales camerounaises. *Pharmaceutical Mediterranean traditional african*, 13: 11-20.
- Blaque-Belair, A. 1981.** Dictionnaire médical clinique, pharmacologique et thérapeutique. 3^{ème} édition, *Maloine s.a éditeur*, Paris, pp. 1150-1152.
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A 2002.** Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int J Diabetes Metab*, 10: 33–50.
- Bnouham, M., Merthfour, F, Z., Legsser, A., Mekhfi, H., Maâllem, S., Ziyat, A. 2007.** Antihyperglycemic activity of *Arbustus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. published in Germany, 62 (8) : pp630-2.
- Boizot, N et Charpentie, J.P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*, pp79-82.
- Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A. 1988.** Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 24 : 41-49pp.
- Boua, B.B., Békro, Y.A., Mamyrbekova-Békro, J.A., Wacothon, K.C. et Ehilé, E.E. 2008.** Assessment of sexual stimulant potential of total flavonoids extracted from leaves of *Palisota hirsuta* Thumb. K. Schum (Commenilaceae). *European journal of scientific research*, 22(4): 533-538 pp.
- Boyd, B., Ford, C., Michael, K.C., Gary, K., Horn, E., McAnalley, S. et McAnalley, B. 2003.** Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*. 4 (6) : 7p.

- Brantner, A., Males, A., Pepeljak, S. et Antolic, A., 1996.** Antibacterial activity of aliiurus spina-Christ Mill (Christis thorn). *Journal of Ethnopharmacol*, 52 : 119-122.
- Bratt, K., 2000.** Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxydative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. *Acta Univ. Upp:sa*. 554-4507.
- Broadhurst R.B., Jones W.T. 1978.** Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agr*, 29 : 788-794.
- Brooks, G., Evans, A.T., Aitken, A., Evans, F.J., Rizk, A.F.M., Hammouda, F.M., El-Missiry, M.M., Ismail, S.E. 1990.** Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 29 (7) : 2235-2237pp.
- Bruneton, J. 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2ème édition. *Lavoisier Technique & Documentation*. Paris, 278-279 pp.
- Bruneton, J. 1999.** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, 1120p.
- Bruneton, J. 1999.** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3^{ème} édition, Paris : *Tec et Doc Lavoisier*, pp274, 654-655.
- Bruneton, J. 1999.** Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p1120.
- Bruneton, J., Danielle, R., Odile, C., 2007.** Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème Édition botanique. *Pharmacognosie phytothérapie*. Groupe liaisons. Collection porphyre
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I. 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 7 : 35-45
- Cha S, Zhang, H., Hilal, I., Ilarslan, Wurtele, E. S., Brachova, L., Basil, J., Nikolau and Edward, S., Yeung. 2008.** Direct profiling and imaging of plant metabolites in intact tissues by using colloidal graphite-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *The Plant Journal*, 55 : 348–360
- Candolfi, E., Filisetti, D., Letscher-Bru, V., Villard, O., Waller, J. 2007.** Parasitologie-Mycologie. Université Louis Pasteur de Strasbourg, pp84-85
- Chabasse D. 1997.** Phénomènes d'adaptation parasitaire des champignons kératinophiles telluriques et conséquences en pathologie humaine et animale. *Cryptogam Mycol*, 18: 77-9.
- Chabasse D., Guiguen C., Contet-Audonneau, N. 1999.** Mycologie médicale. *Elsevier Masson*, 324p
- Chabasse D., Bouchara, J.P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2002.** Cahier de formation Biologie médicale n° 25 : Les Moisissures d'intérêt médical. Paris : *Raspail*, 160p.
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2004.** Cahier de formation Biologie médicale n°31: Les dermatophytes. Paris : *Raspail*, 12 : 74-76 pp.

- Chabasse, D et Contet-Audonneau, N. 2011.** Dermatophytes et dermatophytoses. *EMC - Mal. Infect*, 8, (2) :1- 15p
- Chabasse.D et Contet-Audonneau, N. 2013.** Les teignes du cuir chevelu. *Revue Francophone des Laboratoires* N°454.
- Chabasse, D. 2008.** Les dermatophytes : d'où viennent-ils ? Comment sont-ils devenus des parasites?. *Journal de mycologie Médicale, Elsevier*, 18 : 27-35 p.
- Chabasse, D. Miegerville, M. 2006.** Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie Anofel, 2e cycle des études médicales Enseignement de Parasitologie et Mycologie (2ème édition). Nantes, 251p.
- Chabasse, D., Pihet, M. 2008.** Les dermatophytes : les difficultés du diagnostic mycologique. Elsevier Masson. *RFL - Revue francophone des laboratoires*, 38 (406) :29-38 pp.
- Chabot S., Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y., 1992.** Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavono d compounds under CO₂- enriched conditions. *New Phytologist*. 122: 461-467.
- Chabrier, J.Y. 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat de l'universite Henri Poincare - Nancy 1.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M, Chern, J.C. 2002.** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*, 10 : 178-182.
- Chen, Y.F., Tsai, H.Y., Wu, T.S. 1995.** Anti-Inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*, *Planta Med.*, 61: 2-8.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., CastellI, F., Sarpietro, M.G. & Micieli, D., 2007.** Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modal membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6300-6308.
- Christopher, T.A., Lopez, B.L., Yue, T.L., Feuerstein, G.Z., Ruffolo, R.R., Ma, X.L., 1995.** Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor blocker, vasodilator and free-radical scavenger, exerts an anti-shock and endothelial protective effect in rat splanchnic ischemia and reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*, 273: 64-71.
- Cisse M, Diare, F.S., Kaba, A., Magassouba, F., Keïta, M. et Ecra, E. J. 2006.** Les teignes du cuir chevelu dans le service de dermatologie-vénérologie du C.H.U. de Donka- Conakry, Guinée. *Bull Soc Pathol Exot*, 99(1) : 32-33.
- C.L.S. 2008.** Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, M38-A2, Clinical Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
- CLSI. 2008.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard, 2nd edn. Document M38-A2.

- Comini, L.R., Nez Montoya, S.C., PÉez, P.L., Argello, G.A., Albesa, I and Cabrera, J.L. 2011.** Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 102 : 108-114.
- Contet-Audonneau, N., Chabasse, D., Guigen, C. 1998.** Mycologic. *Encyclopédie multimédia de mycologie médicale*. Cube Systèmes. Nancy.
- Coraline, B., Aurélie, B., Tanguy, C., Aurélie, L.G. 2006.** Les Huiles Essentielles. U.C.O Bretagne Nord.
- Cornara, L.B., Borghesi, Caporali, E., Casazza, G., Roccotiello, E., Troiano, G and Minuto, L. 2005.** Floral features and reproductive ecology in *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Plant systematics and evolution*, 250(3-4) : p157-172.
- Cronquist, A. (1968).** *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Houghton Mifflin Co., Boston, pp. 238-242.
- Cowan, M.M. 1999.** Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4) : p564-582.
- Currah, R.S. 1985.** Taxinomy of Onygenales: Arthradermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxion*, 24: p1-216.
- Cuvier, F.G. 1825.** Dictionnaire des sciences naturelles. Tome trente-huitième, F.G. Levrault, éditeur. Strasbourg, p34.
- Cuyckens, F., Claeys, M. 2002.** Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16 (24) : 2341-2348.
- D'abrosca, D., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C., Fiorentino, A. 2007.** 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 104: 1333-1337pp.
- Dacosta, Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
- Daddona, P.E., wright, J.L., Hutchinson, C.R. 1976.** Alkaloid catabolism and mobilization in *Catharanthus roseus*". *Phytochem*, 941-945 PP.
- Dahlgren, R., Thorne, R.F. 1984.** The order Myrtales : circumscription, variation and relationships. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 71 : 633-699.
- Dağbağlı, S., Sekin, Y. 2002.** Methods for quantitation of tannins: a review. *Proceedings of ICNP–Trabzon*. Turquie, p180.
- Damintoti, K., Mamoudou, H.D., Jacques, S., Saydou, Y., Souleymane, S., et Alfred, S.T. 2005.** Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso.

- De Billerbeck, G. 2007.** Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Springer .Phytothérapie*, 5: 249–253.
- De Hoffmann, E and Stroobant, V. 2005.** Spectrométrie de masse. 3ème, Paris, pp425.
- De Hoffmann, E. and Stroobant, V. 2005.** Les sources d'ions. In Spectrométrie de masse, 3ème. Paris, pp14-75.
- De Hoog, G.S., Tan, C.S., Wintermans, R.G.F. 1989.** CBS Course in Vertebrate Mycopathology. Centraal Bureau voor Schimmelculturen, Baarn.
- Diallo, A. 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (MYRTACEAE). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako, Mali.
- Diallo, D., Sanogo, R. 2005.** Practicals and demonstration: Cultivation, post-harvesting and processing technologies of MAPS in developing countries. Bamako, p3.
- Diallo, D., Sanago, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K., Maiga, A. 2004.** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauriana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R. chimie. Elsevier SAS*, Bamako, 7 : p1073-1080.
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A & Capasso F. 1999.** Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, 65 (4): pp 337-353.
- Diplok, A.T. 1991.** Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. *Am J Clin Nutr*, 53 (suppl): 189S-93S.
- Dincheva, I., Badjakov, I., Kondakova, V., Dobson, P., Mcdougall G & Stewart D. 2013.** Identification of the phenolic components in bulgarian raspberry cultivars by LC-ESI-MSⁿ. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)* 3(3) : 127-138.
- Dixon, R.A., Dey, P. M., Lamb, C. J. 1983.** Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol*, 55 : 1-136.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2005.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97: 654–660.
- Djeridane A., Yousfi, M., Brunel, J.M and Stocker P. 2010.** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48 : 2599-2606.
- Doughari J. H., Ndakidemi P. A., Human I. S. and Benade S. 2012.** Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentata*. *J Ethnopharmacol*, pp141 : 1041-1050.
- Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A et Gmira, N. 2003.** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, (142) : pp 61-78.

- Dohou, N., Yamni, K., Gmira, N., Idrissi Hassani, L.M. 2004.** Étude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroïdes*. - *Acta Bot. Malacitana*, 29 : 233-239.
- Dohou, N., Yamni, K., Badoc, A., Douira, A. 2004.** Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroïdes* sur trois champignons pathogènes du riz. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 143 : p31-38.
- Domme, B., Bompar, J., Denelle, N. 1990.** Sexual tetramorphism in *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae); evidence of the pathway from heterodichogamy to dioecy at the interspecific level. *American Journal of Botany* 77: 1449-1462.
- Domme, B., Biascamano, A., Denelle, N., Bompar, J.L., Thompson, J.D. 1995.** Sexual tetramorphism in *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae): morph ratios in open-pollinated progeny. *American Journal of Botany* 82: 734-740.
- Domme, B., Denelle, N., Rioux, J.A. 1984.** Proportions des sexes dans deux populations françaises de *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Journal de Lettres botaniques*.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A and Smith, F. 1956.** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 : 350-356.
- Dweck, A.C. 2002.** Herbal medicine for the skin. Their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Personal care magazine*. 3(2) : 19-21.
- Edenharder, R., Grünhage, D. 2003.** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res*, 540 : 1-18.
- Egan, D., O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., Thornes, D., 1990.** Drug. Metabolism reviews. 22 (5): 503-529.
- El abed, N., Guesmi, F., Mejri, M., Marzouki, M.N., Ben hadj ahmed., S. 2014.** Phytochemical screening and assessment of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of five Tunisian medicinal plants. *International journal of pharmaceutical research and bio-science*, 3(4) : 770-789.
- El-Beheiry, M.A.H. 2000.** Evaluation of the organic composition of *Thymelaea hirsuta* populations in Egypt. *Bull. Fac. Sci, Assiut Univ., D: Botany* 29 (1) : p375-383.
- El-Keblawy, A. 1994.** Variability among sexual phenotypes of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. populations in Egypt. *Ph.D. thesis*. University of Tanta. Tanta. Egypt,
- El-Keblawy, A., Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L., Shaltout, K. 1995.** Labile sex expression and dynamics of gender in *Thymelaea hirsuta*. *Ecoscience*, 2 : 55-66.
- El-Keblawy, A.A., Shaltout, K.H., Lovett Doust, J., Lovett Doust, L. 1996.** Maternal effects on progeny in *Thymelaea hirsuta*. *New Phytol.* 132 : p77.
- El-Keblawy, A. 1999.** Spatial Segregation by Gender of the Subdioecious Shrub *Thymelaea hirsuta* in the Egyptian Desert. *International Journal of Plant Sciences*, 160(2).

- EI-Keblawy, A., Lovett Doust, J., Lovell Doust, L., Shaltout, K., Gender. 1996.** Variation and the evolution of dioecy in *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae). *Can J Bot* 1996, 74 : 1596-1601.
- El Tahchy, A. 2010.** Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. – Criblage phytochimique de quelques Amaryllidaceae, Université Henri Poincaré, Nancy.
- Engler, A., Gilg, E. 1924.** Syllabus der Pflanzenfamilien. Auflage, Gebrueder Borntraeger. Berlin, 9(10) : pp296-308.
- Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M. 2007.** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68 : 939-953.
- Erdtman, G. 1952.** Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms. *Chronica Botanica Co.* Waltham, MA, pp.431-433.
- Ergenç, N., 1968.** The daphnin and daphnetin of *Daphne pontica* L. Istanbul Eczacılık Fakültesi Mecmuası, 4 : 72–76.
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G., Walsh, T. J., 2002.** Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp: NCCLS Collaborative Study. *Journal of Clinical Microbiology* 40 : 3204-3208.
- Evans, F.J., Soper, C.J. 1978.** The tiglane, daphnane and ingenane diterpenes, their chemistry, distribution and biological activities. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* 41 : 193-233.
- Evans, R.J., Reinhout, G.S. 1992.** Alternates to synthetic antioxidants, *Food Science and human Nutrition*, 29 : 27-42.
- Fabre, N. Rustan, I., Hoffmann, E., Quetin-Leclerq, J. 2001.** Determination of Flavone, Flavonol, and Flavonone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Vol.12, No.6, (May 2001), pp. 707-715, ISSN 1387-3806
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. & El-baroty, G.S.A., 1989.** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protect.* 52 : 665–667.
- Favier, A. 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115pp.
- Farias, L.D.S et Andreas, S. L. Mendez. 2014.** LC/ESI-MS Method applied to characterization of flavonoids glycosides in *b. forficata* subsp. *Pruinosa*. *Quim. Nova*, 37(3) : 483-486.
- Feuilhade, M., Bazex, J., Claudy, A., Roujeau, J-C. 2002.** Infections à dermatophytes de la peau glabre, des plis et des phanères, pp2558-2564.
- Ferrari, J. 2002.** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Thèse de doctorat. Ex A. Rich. Université de Lausanne, pp9, 17, 27, 42, 48, 158, 182.

- Fiorucci, S., 2006.** Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, p 211.
- Flemming S. 1997.** Le livre des herbes Comment les cultiver, les identifier et les utiliser en cuisine. Ed Chantecler, Belgique, p116.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. H. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226 : 497-509.
- Fogliani, B., Raharivelomanana, P., Bianchini, J.P., Bouraimamadjebi, S. & Hnawia, E., 2005.** Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry*, 66 : 241–247.
- Fouché, J.G., Marquet, A., Hambuckers, A. 2000.** Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman, B77. B-4000 Liège.
- Gaignautl, J.C., Bidet, D., Gaillard, M., Perronnet, J. 1997.** Stérols et stéroïdes, Paris, pp11-31.
- Fosting, S., 2004.** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Maerua angoensis* (Capridaceae).Thèse de doctorat. Bamako, p149.
- Food and Nutrition Board of the National Academy of Science. 1998.** Dietary reference intakes: Proposed definition and plan for review of dietary antioxidants and related compounds.Natl.Acad.Press. <http://www4.nas.edu/IOM/IOMHome.nsf/Pages/Ongoing+studies>.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000.** "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants", *Journal of Science and Food Agriculture*, 80: 1925-1941.
- Fromage, M., Houze, S., Miegerville, M., Thellier, M. 2010.** « Parasitologie », *Annales du Contrôle National de Qualité des Analyses de Biologie Médicale, afssaps*.
- Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Mastunga, H., Katano, M. et Mori, M. 1999.** Antiproliferative constituents from umbelliferae plants., V. A., New furanocoumarin and faltarindiol furanocoumarin ether from the root of *Angelica japonica*, *Chem. Pharm. Bull*, 47(1) : 96-100.
- Fuller, R.W., Bokesch, H.R., Gustafson, K.R., Mckee, T.C., Cradellina, J.H., Mcmhon, J.B., Cragg, G.M., Sojaerto, D., Boyd, M.R. 1994.** Bioorg. Med. *Chem. Lett*, 4 (16) : pp1961-1964.
- Garabeth, F., Bouaoun, D. et Elyafi-Elzahri, G. 2007.** "Quantitative study of coumarins of a wild plant *Prangos asperula* Boissier", *Phytotherapie*, 5(5) : pp259-263.
- Garcia-Argaez, A. N ; Apan, T. O. R ; Delgado, H. P ; Velazquez, G. et Maetinez-Vazquez, M. 2000.** Anti-Inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model, *Planta Med*, 66: 279-281.
- Garcia-Granados, A., Saenz de Buruaga, A. 1980a.** Thymeleaceae photochemistry. I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *Anales Quim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim*, 76 (1): p94-95.

- Garcia-Granados A., Saenz de Buruaga J.M. 1980b.** [Thymeleacea photochemistry. II. Flavone and coumarin components of *Thymelea tartonraira* L.] (espagnol) - *Anales Quim., Ser. C: Quim. Org. Bioquim.*, **76**(1), 96-97.
- García-Granados, A., Sáenz de Buruaga, J.M. 1980c.** Thymelaeaceae phytochemistry – II. Flavone and coumarin components of *Thymelaea tartonraira* L. *An. Quim. Series C*, **76**: 96-97.
- García-Granados, A., Sáenz de Buruaga, J.M. 1980.** Thymelaeaceae phytochemistry – I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *An. Quim. Series C*, **76** : pp94-95.
- Garnero, J. 1991.** Les huiles essentielles, leurs obtention, leurs composition, leur analyse et leur normalisation. Editions techniques-encyclopédie des médecines naturelles.(paris, France), *Phytothérapie, Aromathérapie*, **2** : pp2-20.
- Gharbo, S.A., Khafagy, S.M., Sarg, T.M. 1970.** Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. U. Arab Rep. *J. Pharm. Sci.* **11** (1) : p101-106.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z et Jore, D. 2003.** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*, pp91-96.
- George, V., Rishi, A.K. 1982.** Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia*, **53**(5-6): pp191-192.
- Gilg, E. 1984.** Thymelaeaceae. In: Engler, A. and Prantl, K. (eds.), *Die Natürlichen pflanzenfamilien*, Teil III, Abteilung 6a. *Verlag von Wilhelm Engelmann*. Leipzig, p216-245.
- Giordani, R., Kaloustian, J. 2006.** Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *J. Phytothérapie*, (3) : 121-124
- Gonzalez-Tejero, M.R, Casares-Porcel, M., Sanchez-Rojas, C.P., et al. 2008.** Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol*, **116** : 341–57
- Goodon, B. 1997.** Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales. *Tec. et Doc*, P346, 347-353,354.
- Goudable, J., et Favier, A. 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C, hôpital Edouard, Herriot, Lyon, GREPO, Université de Grenoble, la Tronche.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R. 2000.** Plants used against cancer extension of the work of Jonathan Hartwell. *J. Ethnopharmacol*, **73**: 347–77
- Grayer, R.J. and Harborne, J.B. 1982-1993-1994.** A survey of antifungal compound from higher plants. *Phytochemistry*, **37** : 19-42.
- Guillet, E. 2002.** Efficacité du lufenuron sur les dermatophytes équine étude bibliographique et clinique (42 cas). Thèse de doctorat. Faculté de médecine de Lyon, p165.
- Guignard, J. L. 2000.** Biochimie végétale. 2^{ème} édition, Dunod, Paris, pp164, 170, 175, 201, 213-214.
- Gundersen, A. 1950.** Families of Dicotyledons. *Chronica Botanica Co.*, Waltham, MA, pp119-121.

- Halliwell, B., et Gutteridge, J.M.C. 1985.** "Free Radical Biology Medicine" 3rd ed., Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. & Aruoma, O. 1987.** The desoxyribose method: a simple "test tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165 : 215-219
- Halliwell, B. 1991.** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.*, 91 : 14–20.
- Halliwell, B. 1999.** Food- derived antioxidants. Evaluating their importance in wine. *J of Food Chemistry*, 47 : 1035-1040
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999.** Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*.
- Hans, W. K. 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.
- Harborne, J.B. 1994.** Phenolics. In: Natural products: their chemistry and biological significance. Eds. Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J.B., Harborne, J.B. Longman (London), 6 : 361_388.
- Harborne, J.B. 1998.** Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition. ISBN: 0-412-57260-5 (HB) and 0-412-57270-2 (PB).
- Harborne, J.B. 2005.** Phytochemical methods. New Delhi: *Springer Pvt. Ltd.* India, p17.
- Harikrishna, D., Appa Rao, A.V.N., Prabhakar, M., C. 2004.** Pharmacological investigation of prunin-6''-O-P-coumarate: A flavonoid glycoside. *Indian J Pharmacol*, 36 (4) : p244-250.
- Hartmann, T. 2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Photochemistry*, 68: 2831-2846.
- Haslam, E. 1993.** Polyphenol complexation. In: « Polyphenolic phenomena ». Ed. Scalbert A.
- Haslam, E. 1996.** Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205 215.
- Havsteen, B.H. 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67– 202.
- Haya, B., Amour, R. 1992.** Extraction des huiles essentielles du *clou de girofle*. Université de Blida: Institut de chimie industrielle, P.F.E.
- He, W., Cik, M., Appendino, G., Puyvelde, L.V., Leysen, J.E., Kimpe, N.D. 2002.** Daphnane-type diterpenes orthoesters and their biological activities. *Med Chem*, 2 : 185–200.
- Hegnauer, R. 1973.** Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 6. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Heimler, D., Vignolini, P., Din, M.G., Vinueri, F.F., Ronani, A., 2006.** Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, 99 : 464-469.

- Heining, K.H. 1951.** Studies on the floral morphology of the Thymelaeaceae. *Am. J. Bot.* 38 : pp113-132.
- Hennebelle, T., 2006.** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de doctorat. Lille, 304p.
- Herbada, D. G. 2006.** Origin and diversification of Thymelaea (Thymelaeaceae): inferences from a phylogenetic study based on ITS (rDNA) sequences. *plant systematics and evolution*, 257 : 159–187.
- Hiermann, A., Schramm, HW., Laufer, S., 1998.** Antiinflammatory activity of myricitin-3-o beta-D-glucuronide and related compounds. *Inflamm. Res*, 47 : 421-427.
- Hill, R. A. 1993.** In the chemistry of natural products, 2nd edition (Ed.R.H.Thomson), Blackie, Glasgow, p124.
- Hostettmann, k., Potterat, O., et Wolfender, J.L. 1998b.** The Potential of Higher Plants as a Source of New Drugs. *Chimia*, 52 : 10-17.
- Huang, M.H., Huang, S.S., Wang, B.S., Wu, C.H., Sheu, M.J., Hou, W.C. 2011.** Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Cardiospermum halicacabum* and its reference compounds ex vivo and in vivo. *J Ethnopharmacol*, 133: 743-750.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005.** "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- Hutchinson, J. 1967.** The Genera of Flowering Plants. Oxford University Press, London, 2 : pp239-271.
- Ilkit, M., Turac-Bicer, A., Ates, A., Polat, M., Koksal, F., Ozcan, K. 2007.** Familial cases of *Microsporum canis* tinea in Adana, Turkey. *Journal de mycology medicale*. Elsevier, 17 : p275-278.
- Irobi, O.N. & Daranola, S.O., 1994.** Bactericidal propenies of crude extracts of *racarpu villosus*. *J Ethnophannacol*, 42 : 39-43.
- Iserine, P., Masson, M., Restellinini, J.P., 1997.** Encyclopedie des plantes medecinales : identification, préparation, soin. Paris : Larousse-Borda. Pp 10-14-18.
- Iserin, P.M. 2001.** Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition ed.). (T. D.-F. Edith Ybert, Ed., & P. Vican, Trans.) Larousse-Bordas (1997). ISBN: 2-03-560252-1. P. 6-16, 18-53, 335p.
- Ismail, S.I. 1978.** Tiliroside (kaempferol-3-p-coumaroylglucoside) from *Thymelaea hirsuta*. IV. *Fitoterapia* 49 (4) : pp156-159.
- Ivan M. S., Vesna, D., Nikolić, Ivana, M., Savić., Ljubisa, B., Nikolić, Marko, D., Jović., Maja, D., Jović. 2014.** The qualitative analysis of the green tea extract using esi-ms method. *Advanced technologies*, 3(1) : 30-37.
- Jeanmonod, D. et Gamisans, J. 2007.** *Flora Corsica*, Edisud.

- Jimenez-Gonzalez, L., Alvarez-Corral, M., Munoz-Dorado, M. and Rodriguez-Garcia, I. Pterocarpanes. 2008.** Interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7: 125-154.
- Joseph Charles Maroon, M.D., Jeffrey, W., Bost, P.A.C. 2006.** ω -3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatory : an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surgical Neurology*, 65 : 326–331.
- Juhas, S., Bukovska, A., Cikos, S et al. 2009.** Anti-inflammatory effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in Mice. *Acta. Vet*, 78 : 121–127.
- Judd, W. S., Campbell, C.S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. and. Donogh, E. M. J. 2002.** Plant Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Jungkind, D.L. 1995.** Antimicrobial resistance : a crisis in health care ; [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a Crisis in Health Care - Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11-12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Ed. Plenum Press, New York, NY [u.a.], p248.
- Kadri, A., Zarai, Z., Ben, C. I., Gharsallah, N., Damak, M. and Békir, A., 2011.** Chemical composition and in vitro antioxidant activities of *Thymelaea hirsuta* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*. 10(15) : 2930-2935
- Kah, N. 2011.** Dermatophyties, candidoses et autres mycoses superficielles : rôles du pharmacien d'officine. *Th D Pharm*. Nancy, 1.
- Kandaswamy, N. et Raveendiran, N. 2014.** Synthesis, Characterization and Antifungal activity of Coumarin based random copolyester. *American Journal of Research*, 4 (3) : 704-707.
- Kansole, M.M.R. 2009.** Etude ethnobotanique, phytocimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita vahl* et *Orthosiphon pallidus royle ex benth*. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.
- Kayser, O., Kolodziej, H., 1997.** Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. *Planta Medica*. 63 : 508-510.
- Kawano, M., Matsuyama, K., Miyamae, Y., Shinmoto, H., Kchouk, M.E., Mario, T., Shigemori, H., Isoda, H. 2007.** Effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 16 : p977- 982.
- Kayser, O., Kolodziej, H. 1997.** Antibacterial activity of extrats and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, *Planta Med*, 63: 509-510.
- Klervi, L.L., 2005.** Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et etude des composes de défense de différents espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacific sud). p210.

- Khelifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M and Bouajila, J. 2013.** Composition and antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and Chemical Toxicology*, 55 : 202–208.
- Kilani-Jaziri, S., Bhourri, W., Skandrani, I., Limem, I., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. 2011.** Phytochemical, antimicrobial, antioxidant and antigenotoxic potentials of *Cyperus rotundus* extracts. *South African Journal of Botany*, 77 : 767-776.
- Knoblock, K., Pauli, A., Iberl, N. et al. 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essent. Oil. Res.*, 1: 119-128.
- Klein, B.P. et Kurilich, A.C. 2000.** Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience*, 35 : 580-584.
- Kofinas, C., Chinou, I., Loukis, A., Harvala, C., Roussakis, C., Maillard, M., Hostettmann, K., 1998.** Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Medica*. 64 : 174-176.
- Kone, F. 1998.** Etude ethnobotanique, tri phytochimique et évaluation de l'activité antiplasmodiale de deux plantes ivoiriennes: *Mitragyna inermis* et *Terminalia glaucescens*. Thèse de doctorat en pharmacie – UFR de Pharmacie d'Abidjan. N° 358/98. p110.
- Kosheleva, L.I., Nikonov, G.K. 1968.** Phytochemical study of *Daphne mezereum*. *Farmatsiya*, 17 : 40-47.
- Kerharo, J. et Adam J. G. 1974.** La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plantes médicinales et toxiques. Ed. Vigot Frère, Paris, 1011p, pp343-345.
- Krief, S., 2003.** Métabolites secondaire de plants et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de Chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en ougande, activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat. pp346. Muséum national d'histoire naturelle. France.
- Kupeli, E., Tosun, A., Yesilada, E. 2007.** Assessment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Daphne pontica* L. (Thymelaeaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 113 : 332–337.
- Kumar, G., Karthik, L., Kokati, V.B. 2010.** Antimicrobial activity of latex of *Calotropis gigantea* against pathogenic microorganisms - An in vitro study. *Pharmacologyonline*, 3: 155-163.
- Künkele, U., Lobmeyer., T.R. 2007.** Plantes médicinales : identification, récolte, propriétés et emplois. Edition Parragon, Royaume-Uni.
- Kuta, F.A. 2008.** Antifungal effect of *Calotropis procera* Stem bark on *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton gypsum*. *African journal of biotechnology*, 7(13) : p2116-2118.
- Kawamura, F., Ohara, S., Nishida, A. 2004.** Antifungal activity of constituents from the heartwood of *Gmelina arborea*: Part 1. Sensitive antifungal assay against Basidiomycetes. *Holzforschung*. 58 : 189–192.

- Kwon, Y.S., Kobayashi, A., Kajiyama, S.I., Kawazu, K., Kanzaki, H., Kim, C.M., 1997.** Antimicrobial constituents of *Angelica dahurica* roots. *Phytochemistry*, 44 (5) : 887-889.
- Lafont et Duval, 2001.** Le préparateur en pharmacie dossier1 chimie-biochimie paris Technique et documentation.
- Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J.P. 1994.** Biogénèse des monoterpènes : la chaîne isoprenique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 : 79-99.
- Lanouvette, P. 2005.** Docteur, pourquoi mes angles sont-ils devenus épais et décolorés. L'esthétique et la santé de la peau : Dermocosmétiques et médicaments .le médecin du Québec, 40(4).
- Laouini, S. E. 2014.** Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de *Phoenix dactylifera* L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf). PhD thesis, Université Mohamed Khider Biskra.
- Larson, R.A. 1997.** Naturally occurring antioxidants, Ed. Boca raton.
- Lateur, N. 2004.** Comment gérer les teignes du cuir chevelu ?. Service de Dermatologie, C.H.U. Saint-Pierre et Brugmann, H.U.D.E.R.F., U.L.B. *Rev Med Brux*, 25 : 148-52.
- Lazurevskii, G. V., Terntieva, I.V., Shamshurine, A.A. 1966.** Prakticheskie raboty po khimii prirodnykh soedinenii (traduit du russe); Moscou, p 335.
- Lee, W.S., Baek, Y. I., Kim, J. R., Cho, K. H., Sok, D. E., Jeong, T. S. 2004.** Antioxidant activities of a new lignan and a neolignan from *Saururus chinensis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14 : 5623–5628.
- Lee, H.J., Cha, K.H., Kim, C.Y., Nho, C.W., Pan, C.H. 2014.** Bioavailability of hydroxycinnamic acids from *Crepidiastrum denticulatum* using simulated digestion and Caco-2 intestinal cells. *J Agric Food Chem*, 62(23) : 5290-5
- Le Floc'h, E. 1983.** Contribution à une étude ethnobotanique de la Flore Tunisienne. Pub. Sci. Tunis. Programme Flore et végétation Tunisiennes. 2 Part. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, p 402.
- Leroux, P., Credet, A. 1978.** Document sur l'étude de l'activité des fongicides. INRA, Versailles, France.
- Levin, D.A. 1976.** Alkaloid bearing plants: an ecogeographic perspective. *Am. Nat.* 110(972) : 261-284.
- Liao, S.G, Zhang, B.L, Wu, Y, Yue, J.M. 2005.** New phenolic components of *Daphne giraldii*. *Helv Chim Acta*, 88 : 2873-8.
- Lino, C.S., Traveira, M.L., Viana, G.S.B., Matos, F.J.A., 1997.** Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents : Coumarin and umbelliferone. *Phytother. Res*, 11 : 211-215.

- Lin, L.Z., Harnly, J.M. 2008.** Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. *J Agric Food Chem*, 56(21) :10105-14.
- Lindau-sehpard, B., Shaffer, J. 1993.** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage, *Free rad boil Med*, 15 : 581-8.
- Manolaraki, F. 2011.** Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*). Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués. Thèse de Doctorat de l'université de Toulouse III, Toulouse.
- Marc, T., Gerard, W., Denis, L. 2001.** Classification des anti-inflammatoires in Guide pharmacologie. Etudiants et professionnels paramédicaux. 4eme Edition. P426.
- Maria, A.P., Moretti, M.V., Beretta, G., Caprino, F. 2008.** Chemical parameters, fatty acids and volatile compounds of salted and ripened goat thigh. *Small Ruminant Research*, 74 : 140–148.
- Marianna, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S. 2007.** Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31 : 12– 26.
- Martínez-Cayuella, M., 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, 77: 147-161.
- Marfak, A. 2003.** Radiolyse gamma des flavonoides, etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges.
- Markham, K. R. 1982.** Techniques of flavonoid identification biological techniques Series. Ed. Treherne J. E. et Rubery P. H. *Academic Press*, p113.
- Maslin, J., Moran, J.J., Soler, C. 2005.** Les teignes tropicales. *Medecine Tropicale*, 65(4) : p313-316.
- Mekhelfi, T., Kerbab, K., Guella, G., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F. 2014.** Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. *Scholars Research Library*, 6 (1) : 152-156.
- McEwan, M. 1994.** The antifungal effects of plant essential oils and their production by transformed shoot culture. Dr thesis, Strathclyde Institute of Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland.
- Melchior, H. 1964.** Reihe Myrtiflorae. In: Melchior, H. (ed.), *Syllabus der Pflanzenfamilien*. 12. Auflage. Gebrueder Borntraeger. Berlin, pp345-366.
- Milliauskas, G., Venskutonis, P.R., van Beek, T.A. 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85: 231-237.
- Miller, G. L. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*, 31 : 426–428.

- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P. 1996.** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 384 : 240-2
- Miyake, Y., Murakami, A., Sugiyama, Y., Isobe, M., Koshimizu, K. et Ohigashi, H. 1999.** Identification of coumarins from lemon fruit (*Citrus limon*) as inhibitors of in vitro tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 : pp3151–3157.
- Minuto, L., Casazza, G., Profumo, P. 2004.** Population decrease of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. in Liguria conservation problems for the North Tyrrhenian sea *Plant Biosystems*, Taylor and Francis Ltd, 138(1) : pp11-19(9).
- Miyamae, Y., Orlina Villareal, M., Ben Abdrabbah, M., Isoda, H., Shigemori, H., Hirseins, A.B. 2009.** Daphnane diterpenoids from *T. hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells. *Journal of Natural Products*, 72 : 938–941.
- Mogode Debete, J. 2005.** Étude phytochimique de *Cassia nigra* Vahl (Caesalpiaceae) utilisée dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse Doct., Univ. Bamako, p234. www.keneya.net/fmpos/theses/2005/pharma/05P31/pdf/05P31.pdf
- Mohammedi, Z. 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie . Thèse Doct., Univ. Abou Bakr Belkaïd Tlemcen.
- Molyneux, P. 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity songklanakar. *Journal of science technology*, 26(2) : 211-219.
- Moosavi, M.A., Yazdanparast, R., Sanati, M.H. 2005a.** The cytotoxic and antiproliferative effects of 3-hydrogenkwadaphnin in K562 and Jurkat cells is reduced by guanosine. *Biochem Mol Biol*, 38: 391–398.
- Moosavi, M.A., Yazdanparast, R., Sanati, M.H., Nejad, A.S. 2005b.** 3-hydrogenkwadaphnin targets inosine 5 α -monophosphate dehydrogenase and triggers post-G1 arrest apoptosis in human leukemia cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 2366-2379.
- Morel, Y. et Barouki, R. 1999.** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*, 342(3) : 481-496.
- Morel, S. 2011.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat. Université d'Angers, N° 1031.
- Morrison, W. R. & Smith, L. M., 1964.** Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride methanol. *Journal of Lipid Research*, 5 : 600-608.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J. 2001.** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Morello, M. J., Shahidi, F. and Ho, C. T. 2002.** Free radicals in foods: Chemistry, nutrition, and health effects. ACS Symposium Series 807. *Am. Chem. Soc.*, Washington, DC.

- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S. 1987.** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26: 2231-2234.
- Mshvildadze, V., Favel, A., Delmas, F., Elias, R., Faure, R., Decanosidze, Q., 2000.** Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica*. *Pharmazie*, 55 : 325–326.
- Muanda, F.N. 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 55-86.
- Mura, F., Silva, T., Castro, C., Borges, F., Zuñiga, M.C., Morales, J., Olea-Azar, C. 2014.** New insights into the antioxidant activity of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic systems: Spectroscopic, electrochemistry, and cellular studies. *Free Radic Res*, 48(12) : 1473-84.
- Nakabayashi, T. 1954.** Coumarin derivatives – V. Constituents of the bark of *Daphne kiusiana* Miquel and others (Thymelaeaceae). *J. Pharm. Soc. Japan* 74 : 192-193.
- Namiki, M. 1990.** Antioxidants/Antimutagens in Food. CRC critical. *Food Science and Nutrition*, 29: 273-300.
- Nawwar, M.A.M., Ishak, M.S., Sherbieny, A.D., Meshaal, S.A. 1977.** Flavonoids of *Reaumuria mucronata* and *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 16 : pp1319-1320.
- Newmann, D. and Cragg, G.M. 2007.** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70: 461-477.
- N'guessan, K., Kadja, B., Zirihi, N.G., Traoré, D. et Aké-Assi, L. 2009.** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences et Nature*, 6(1) : pp1-15.
- Nostro, A., Germano, M.P., D'angelo, V., Marino, A. et Cannatelli, M.A. 2000.** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity letters en microbiologie appliqué, 30(5) : 379
- Novelli, G.P., 1997.** Role of free radicals in septic shock. *Journal of Physiol Pharmacol*. 48 : 517-527.
- Odeh, I., Abu-Lafi, S., Dewik, H., Al-Najjar, I., Imam, A., Valery, M. 2007.** A variety of volatile compound as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101(4) : p1393-1397.
- Okada, Y., Miyauchi, N., Suzuki, K., Kobayashi, T., Tisutsui, C., Mayuzumi, K., Nishibe, S., Okuyama, T. 1995.** Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem. Pharm. Bull*, 43(8) : 1385-1387.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. & Nalhdibadi, H., 2007.** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18 : 1518-1523.

- Oudaina, W., Biougnach, H., Riane, S., El Yaagoubil, I., Tangi, R., Ajdae, L., et al. 2011.** Épidémiologie des teignes du cuir chevelu chez les consultants externes à l'hôpital d'enfants de Rabat. *J Mycol Med*, 21:1.
- Ozenda, P. 1977.** Flore du Sahara, Ed. CNRS. Paris. France, 250-259.
- Oyedemi, S.O, Afolayan, A.J. 2011.** Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific journal of tropical Medicine*, 4 : 952-958.
- Paris, R.R., Moyses, H., 1965.** Précis de matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Editeurs.
- Pszczola, D.E. 2001.** Antioxidants: from preserving food quality to quality of life. *Food Technol*, 55 : 51-59.
- Prado, M.R., Brito, E.H.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Leite, J.J.G., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2008.** Subculture on potato dextrose agar as a complement to the broth microdilution assay for *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Microbiological Methods* 75 : 341-343.
- Paul Iserin, M.M.P. 2001.** Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition ed.). (T. D.-F. Edith Ybert, Ed., & P. Vican, Trans.) Larousse-Bordas (1997). ISBN: 2-03-560252-1. P6-16, 18-53, p335.
- Paris, M. et Hurabielle. 1981.** *Abrégés de matière médicale. Pharmacognosie* Tome 1. Ed Masson. Paris. France.
- Pausas, J.G., Bonet, A., Fernando, T. M., Climent, A. 2006.** The role of the perch effect on the nucleation process in Mediterranean semi-arid oldfields *Acta ecologica*, (29) : 346-352.
- Pedneault, K., Leonharts., Angenol., Gosselin, A., Ramputh, A., Arnason, J.T., 2001.** Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. *Texte de conférence*. Canada, 1-5.
- Philipot, C.M. 1977.** The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. *Sabouraudia*, 15 : 141- 150.
- Pietta, P.G. 2000.** Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod*, 63 : 1035-1042.
- Potterat, O., 1997.** Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Curent Organic Chemistry*, 1 : 415-440.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005.** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(10) : 4290-4302.
- Recio, M.C., Rios, J.L., Villar, A. 1989.** A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988, *Phototherapy. Res*, 3 : 117-125.
- Raman, N. 2006.** Phytochemical technique. New Delhi. *Indian Publishing Agencies*, p19.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Rice-Evans, C.A. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free radical biologie and*

- medicine*, 26(9-10) : 1231-1237.
- Renner, S. 2001.** How common is heterodichogamy. Trends in ecology. *Evolution.Elsevier science*. 19(11).
- Resch, M., Steigel, A., Chem, Z.L. et Bauer, R. 1998.** 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase- 1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*, *J. Nat. Prod.*, 61 : 347-350.
- Ressigle, H., Danesch, E. et O. 1987.** Flore méditerranéenne. Berne : Hallwag SA traduit de l'allemand par M. M. Duckert et C. Favarger, traduction française : Payot Lausanne n° 85-86-87.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Bolwer, P.G., Bramley, P.M. and Ridham, J.B. 1995.** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Rad. Res.* 22 : 375-383.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P. and Sudraud, P. 1972.** Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et contrôle des vins. Ed. Dunod, Paris, p671.
- Riov, J., Gottlieb, H.E. 2006.** Metabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugation. *Physiologia Plantarum*, 50 : 347-352.
- De Hoffmann, E. and Stroobant, V. 2005.** Spectrométrie de masse. 3ème, Paris, pp425.
- Rispail, P. 2005.** Epidémiologie et diagnostic biologique des dermatophytoses. Montpellier-Nîmes.
- Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. 1974.** Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction. *Plant Med*, 26(4) : p346-358.
- Rizk, A. M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. 1975.** Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*, III, Coumarins. *Acta chimica Academiae scientiarum Hungaricae*, 85(1) : p107-115.
- Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., El-missiry M.M., Evans F.J. 1984.** Irritant resiniferonol derivatives from Egyptian *Thymelaea hirsuta* L. *Experientia*, 40(8): 808-809.
- Rizk, A. M. 1987.** *Bot. J. Linn. Soc.* 94, 293.
- Rouxel, T. 1989.** Les phytoalexines et leur intervention dans la résistance hypersensible aux champignons phytopathogènes. *Agronomie*, 9 : 529-545.
- Sadipo, O.A., Akanji, M.A., Kolawole, F.B. & Odutuga, A.A. 1991.** Saponin is the active antifungal principle in *Garcinia Kola*, heckle seed, *Biosci. Res. Commun*, 3 : 171.
- Saez, G., Battesti, M.R. 1972.** L'intérêt de la croissance mycélienne, in vitro, des dermatophytes dans le diagnostic spésofisque. *Annales de dermatologie et de syphiligraphie*, Paris, 99 : 501-509.
- Saldanha, L., Vilegas, W. and Dokkedal, A.L. 2013.** Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. *Molecules*, 18 : 1420-3049.
- Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R.G., Nishibe, S., Daneshtalab, M., 1999.** Synthesis and activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorg. Med. Chem.* 7 (9) : 1933-1940.

- Sarker, S.D., Latif Z., Gray A.I., 2005.** Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), pp1-23.
- Saleh, M.R.I., Haddad, D.Y., Sar, T.M. 1965.** Isolation of the crystalline principle, thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsuta*. *U. Arab Rep. J. Pharm. Sci*, 4 : p49-56.
- Seidel, V., 2005.** Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), pp27-37.
- Seliger, B., 1997.** The effects of coumarins and its metabolites on cell growth and development. *Immunol Toda*, 93-102.
- Senhaji, O., Faid, M., Elyachioui, M., Dehhaoui, M. 2005.** Étude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. pp222.h <http://france.elsevier.com/direct/mycmed/>.
- Scalbert, A. 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.
- Shahidi, F. 2002.** Antioxidants in plants and oleaginous seeds. *In: M. J*, p162-175.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Brooks, J.D., Corke, H., 2007.** *International J. Food Microbiology*, 117 : 112-119.
- Scalbert, A., 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30 : 3875-3883.
- Schmidt, J. et Nellie, S. 1983.** Uses of *Thymelaea hirsuta* (Mitnan) with emphasis on hand papermaking. *Economic Botany*. 37(3) : 310-321.
- Schnaubelt, K. 1998.** Advanced Aromatherapy. Vermont Healing Arts Press.
- Shaltout, K.H. 1987.** Pattern, phenology and sex ratio of Egyptian *Thymelaea hirsuta* populations. *Vegetatio*, 72: 67-73.
- Shaltout, K.H., El-Shourbagy, M.N. 1989.** Germination requirements and seedling growth of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Flora*, 183 : 429-136.
- Shaltout, K.H. 1992.** Dimension analysis of *Thymelaea hirsuta* (L.) ENDL. fibers. *Feddes Repertorium*, 103(1-2) :99-106.
- Shaltout, K.H. 1992.** Nutrient status of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. Egypt. *Journal of arid environments*, 23(4) : 423-432.
- Shaltout, K.H. 1992.** Sex expression in Egyptian *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae) populations. *Plant Systematics and Evolution*, 181(3-4).
- Shaltout, K.H. and El-Keblawy, A.A. 1992.** Sex expression in Egyptian *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae) populations. *Plant Systematics and Evolution*, 181 : 133-141.
- Shaltout, K.H. et Ayyad, M.A. 1988.** Structure and standing crop of Egyptian *Thymelaea hirsuta* populations. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Printed in the Netherlands. *Vegetatio*, 74: 137-142.

- Shaltout, K., Denelle, N., Jacquard, P. et Romane, F. 1989.** Variability among *Thymelaea hirsuta* (L.) ENDL. Populations in Egypt. *Folia Geobotanica*, 24(3) : 305-314.
- Shenbrot, G. 2004.** Habitat selection in a seasonally variable environment: test of the isodar theory with the fat sand rat, *Psammomys obesus*. *Israel/Oikos. Negev Desert*, 106 : 361.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001.** Analyses of condensed tannins: a review. *Animal Food and Technology*, 91 : 21-40.
- Silva, D.B., Turatti, I.C.C., Gouveia, D.R., Ernst, M., Teixeira, S.P., Lopes, N.P. 2014.** Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. *Scientific reports*, 4 : 4309.
- Sikkema, J., De bont, J.A.M. & Poolman, B. 1995.** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol*, 59 : 201-222.
- Singleton, V.L. et Rossi, J.A. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*. 16 : 144-153.
- Somon, E. 1987.** Arbres, Arbustes et arbrisseaux en Algérie. (No Edition 686. ed.). Alger: OPU. p135, 143.
- Stern, J.L., Hagerman, A.E., Steinberg, P.D., Mason, P.K. 1996.** Phorotanninprotein interactions. *J Chem Ecol*. 22: 1887-1899.
- Su Shulan, Cui, W., Zhou, W., Duan, J.A., Shang, E. and Tang, Y. 2013.** Chemical fingerprinting and quantitative constituent analysis of Siwu decoction categorized formulae by UPLC-QTOF/MS/MS and HPLC-DAD. *Chinese Medicine*, 8 : 5.
- Tackholm, Y. 1974.** In *Students Flora of Egypt*, 2nd Edn, Cairo University Press, Beirut. p360.
- Tan, K. 1980.** Studies in the *Thymelaeaceae* II: a revision of the genus *Thymelaea*. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh*, 38: 189-246.
- Tan, K. 1982.** *Thymelaeaceae*. in: Davis, P. H. (ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh Univ. Press, *Edinburgh*, 7 : 521-532.
- Tandon, S., Rastogi, R.P. 1977.** Wikstrosin, a tricoumarin from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry*, 16 : 1991-1993.
- Torel, J., Cillard, J. & Cillard, P. 1986.** Antioxidants activities of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 25 : 383-385.
- Touati, D. 1985.** Contribution à la connaissance du profil biochimique des dicotylédones buissonnantes et arbustes de la Méditerranée. Thèse de 3^{ème} cycle. Université Claude Bernard, Lyon I.
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Bourgou, S., Hajlaoui, H., Abdelly, C. 2010.** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Science and Technology*, 43(4) : 632-639.

- Traoré, C.M.L. 1999.** Contribution à l'étude des Combretaceae médicinales du Mali. Thèse de pharmacie. Bamako, p 99, 38, 165.
- Trigui, M, Hsouna, A.B., Tounsi, S. and Jaoua, S. 2013.** Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41 : 150-157.
- Trivalle, C. 2002.** Gérontologie préventive : élément de prévention du vieillissement pathologique. Ed : *Masson* (Paris), p104-106.
- Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. 2006.** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7 : 140-146.
- Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P. et Cilapraz J. 1978.** L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant*.
- Valnet, J., 2005.** L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. ISBN : 2-253-03564-5.
- Van der Bank, M., Fay, M.F., Chase, M.W. 2002.** Molecular phylogenetics of Thymelaeaceae with particular reference to African and Australian genera. *Taxon*, 51: 329-339.
- Veldhuizen, E., Tjeerdsma-Van Bokhoven, C., Zweijter, S.A., Burt. & Haagsman, H.P. 2006.** Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem*, 54 : 1874-1879.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B.D. 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 : 4113-4117.
- Vernon, H., Heywood, R.K., Brummitt, A.C. and Seberg, O. 2007.** Flowering Plant Families of the World. Firefly Books: Ontario, Canada.
- Verpoorte, R, Cotin, A., Memelink, J. 2002.** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, 1(1) :13-25.
- Veste, M., Staudinger, M., Koppers, M. 2008.** Spatial and temporal variability of soil water in drylands: plant water potential as a diagnostic tool. in China. *Forestry Studies*, 10(2) : 74-80.
- Vickery, J.R. 1980.** The fatty acid composition of seed oils from ten plant families with particular reference to cyclopropene and dihydrosterculic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 87-91.
- Vickery, J.R. 1981.** The occurrence of dihydromalvalic acid in some seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58 : 731.
- Villars, D. 1807.** Catalogue méthodique des plantes. F.G. Levrault, éditeur. Strasbourg. p103.
- Wang, S., Liu, L., Wang, L., Hu, Y., Zhang, W., Liu, R. 2012.** Structural Characterization and Identification of Major Constituents in Jitai Tablets by High-Performance Liquid

- Chromatography/Diode-Array Detection Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, 17 : 10470-10493.
- Wagenitz, G. 1964.** Reihe Thymelaeales. In : Melchior, H. (ed.), *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Auflage, *Gebrueder Borntraeger*, Berlin, 9(10) : 316-322.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F. 1994.** Stabilization of canola oil with flavonoids. *Food Chemistry*, 50 : 393-396.
- Wagner, H. and Bladt, S. 1996.** Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Second edition. New York Tokyo. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, p 384.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. 1996.** Plant drug analysis, a thin-layer, chromatography atlas, 2nd éd. New York, Berlin Heidelberg. *Springer Verlag*, p320.
- Waridel, P. 2003.** Investigation phytochimique des plantes aquatiques. Lusanne France.
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E. and Prior, R.L. 2004.** Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agricultural and Food Chem*, 52 : 4026–4037.
- Xing, J., Xie, C., Lou, H. 2007.** Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (2) : 368-378.
- Yang, Y.Z., Ranz, A., Pan, H.Z., Zhang, Z.N., Lin, X.B., Meshnich, S.R., 1992.** Daphnetin : a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 46 (1) : 1520.
- Yangthong, M., Hutadilok-Towatana, N., Phromkunthong, W. 2009.** Antioxidant Activities of Four Edible Seaweeds from the Southern Coast of Thailand. *Plant Foods Human Nutrition*, 64 : 218–223.
- Yang, M.H. Ali, Z. Khan, S.I. Khan, I.A 2014.** Characterization of chemical constituents from *Thymelaea hirsuta* with PPAR α/γ modulation activity. *Planta Medica*, 80(10).
- YAN, D., Jin, C., Xiao, X.H., & Dong, X.P., 2008.** Antimicrobial properties of berberines alkaloids in Franch *Coptis chinensis* by microcalorimetry. *J Biochem Biophys Methods*, 70 : 845-849.
- Yanz, L. et Chunru, J.I. 1987.** Chemical constituents and pharmacological actions of Thymelaeaceous plants. *Zhongcaoyao*, 18 (2) : 80-89.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. 2004.** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr*, 59 : 113-122.
- Ybert E., Astrid, D.D. 2000.** Encyclopédie des plantes médicinales. Identifications – préparations – Soins. Larousse, Londres. p 335.
- Ybert, E. 2001.** Petit Larousse de la Médecine. Larousse/VUEF. Canada. p1087.
- Yoshikawa, M., Harada, E., Naitoh, Y., Inoue, K., Matsouda, H., Shimoda, H., Yamahara, J. et Murakami, N. 1994.** Developpement of bioactive Function in *Hydrangeae dulcis folium*. III. On the

- antiallergic and antimicrobial Principles of *Hydrangeae dulcis folium*. *Chem. Pharm. Bull*, 42 : 2225-2230.
- Zakaria, Z., Aziz, R., Lachimanan, Y.L., Sreenivasan, S., Rathinam, X. 2008.** Antioxidant activity of *Coleus blumei*, *Orthosiphon stamineus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from Lamiaceae family. *Int J Nat Eng Sci*, 2 : 93-95.
- Zee-Cheng, R.K., 1997.** Anticancer research on Loranthaceae plants. *Drugs Future*, 22(5) : 515-530.
- Zhang, B.B., Dai, Y., Liao, Z.X. 2011.** Chemical constituents of *Saus-surea eopygmaea*. *Chin J Nat Med*, 9 : 33.

ANNEXES

Annexe I

Composition des réactifs

®Liquueur de Fehling

Réactif à chaud

Solution A

CUSO₄35 g

Eau distillée500 ml contenant 5 ml d'H₂SO₄

Laisser refroidir puis compléter au litre avec l'eau distillée

Solution B

Sel de Seignette150 g

Eau distillée500 ml

Refroidir puis ajouter 300 ml de lessive de soude non carbonaté, compléter au litre avec l'eau distillée.

NB: mélanger les 2 solutions à volume égal au moment de l'emploi

®Réactif de Baljet

Acide picrique1 g

Ethanol 50°100 ml

®Réactif de Keede

Acide dinitro 3-5 benzoïque1 g

Ethanol 96°100 ml

®Réactif de Raymond Marthoud

1-3 m dinitrobenzène1 g

Ethanol 96° qsp100 ml

Papier picrosodé

En trempant du papier a filtré dans une solution obtenue à chaud de 1g d'acide picrique et 100g d'eau, solution préalablement additionnée de 10 g de carbonate de soude ; ce papier se colore en rouge en présence des vapeurs d'acide cyanhydrique (imbibé le papier).

®Réactif de Guignard

Préparation papier picrosodé

Acide picrique1 g

Carbonate de sodium10 g

Eau distillée100 ml

®Réactif de Dragendorff:

Il s'agit d'un mélange (V/V) de deux solutions A et B.

- Solution A

Nitrate de bismuth.....1,7 g

Acide tartrique concentré.....20 g

Eau distillée..... 100 ml

- Solution B

Iodure de potassium.....10 g

Eau distillée100 ml

Le mélange a été ensuite additionné de 10 g d'acide tartrique. Une agitation de 30mn a été nécessaire après avoir ramené son volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

®Réactif de MAYER :

Chlorure de mercure.....1,36 g

Iodure de potassium.....5 g

Eau distillée.....qsp 100 ml

®Réactif de DNS

Deux (2) g de DNS et 3,2 g de soude ont été dissous dans 70 ml d'eau distillée. Ensuite, 60 g de tartrate double de sodium-potassium ont été progressivement ajoutés à ce mélange sous chauffage et agitation. Le volume de ce mélange a été complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

Annexe II**Préparations des milieux de culture****1- milieu Sabouraud gélose**

- Peptone..... 10 g
- Glucose.....20 g
- Agar..... 15 g
- Eau distillée stérile..... 1000 g

p H : 6 ,0 ± 0,2

La peptone, le glucose et l'agar ont été dissous dans un litre d'eau distillée. Attendre 5 min puis bien agiter afin d'obtenir une suspension homogène. Chauffer en agitant jusqu'à dissolution complète. Le milieu ainsi préparé est stérilisé à l'autoclave à la température de 121°C pendant 15 min.

2- Sabouraud gélose + Chloramphénicol + Actidione

- Peptone..... 10 g
- Glucose..... 20 g
- Agar.....15 g
- Chloramphénicol.....1 0,5 g
- Eau distillée stérile..... 1000 g
- Actidione (cycloheximide).....0,5g

p H : 6 ,0 ± 0,2

On a procédé au chauffage du mélange en agitant jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Le milieu ainsi préparé a été stérilisé à l'autoclave pendant 15 mn à 118 °C (après contrôle du pH).

Annexe III

Tableau 1. Teneurs des extraits aqueux de *T.hirsuta* en polyphénols totaux, flavonoïdes, tannins, sucres totaux et sucres réducteurs.

Extraits	Phénols totaux ^(a)	Flavonoïdes totaux ^(b)	Tannins ^(c)	Sucres totaux ^(d)	Sucres réducteurs ^(e)
Feuilles	61,12±1,28	3,15±0,15	60,16±0,35	262,44±0,58	12,20±0,07
Fleurs	113,96±9,97	5,70±0,06	67,85±0,81	177,55±6,41	14,06±0,23
Brindilles	93,78±3,12	2,61±0,13	46,35±1,44	96,89±2,33	22,39±0,15

^(a)mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de lyophilisat (mg EAG/g d'extrait de lyophilisat).

^(b) mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait de lyophilisat (mg EQ/g).

^(c) mg d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait de lyophilisat (mg EC/g).

^(d) mg d'équivalent de maltose par gramme d'extrait de lyophilisat (mg EMA/g).

^(e) mg d'équivalent de maltose par gramme d'extrait de lyophilisat (mg EAG/g).

Annexe IV

Tableau 2 : Résultats de dépouillement détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymelaea hirsuta* en mode négatif.

N°	Temps de rétention	MS	Fragmentation MS-MS ou MS2
1	0.01 et 0.94	155	87-111-136.84
2	0.01 et 2.10	117.06	73 -99
3	0.02 et 14.41	174.99	154.92-156.84
4	0.02 et 21.50	157.06	89-113-138.92-157
5	0.02 et 22.70	219.17	112.92-172.92-150.91-174.92
6	0.15	234.88	214.84-216.84-220.09
7	0.85 et 0.98	173.04	131-154.84-156
8	0.96 et 1	159.08	114.92-115.92
9	0.99 et 23.44	321.44	233.09-277.01
10	1 et 2.96	133.27	114.92
11	1 et 7.57	483.09	321.01
12	1.03 et 22.02	191.19	85.08-93.09-111-127-171-173
13	1.04 et 1.87	165.18	105.09-129-147
14	1.05 et 2.92	317.16	164.92-224.92-240.92
15	1.07 et 1.78	195.21	129-159-177.01
16	1.11 et 1.21	192.03	85.08-93-111-127-171-173
17	1.85 et 19.89	323.20	161-179-204.09-233.01-263.01
18	1.93 et 28.21	295.19	96.92-165.09-251.17-277.17
19	2.75 et 27.99	325.13	183
20	2.94 et 3.82	457.18	163-205-325.01
21	2.97 et 3.48	315.19	109-152.92-164.92
22	2.06 et 3.03	151.33	107-108
23	2.08 et 2.73	152.36	108-109
24	2.11 et 9.72	153.33	109-109.92
25	2.15 et 2.65	150.52	106-107
26	2.21 et 2.60	164.34	147
27	3.03 et 3.10	113.46	68.92- 84.92
28	3.07 et 14.87	331.18	240.92-295.18-313.18
29	3.12 et 3.62	458.17	163-205-325.01
30	3.13 et 13.37	451.27	180.92-240.92-256.92-405.18
31	3.16	405.26	160.92-167-179-225-243.01-386.93
32	3.18 et 16.48	343.16	181-240.92-256.92-328.09
33	3.54 et 3.84	203.31	116-142-159-186.01
34	3.71 et 4.37	345.16	180.92-240.92-309.01
35	3.84 et 27.77	485.20	240.92-427.10-485.26

36	3.90 et 18.76	351.18	215.01-336.01
37	3.92 et 27.23	353.20	179-191-232.92
38	3.99 et 23.83	307.23	179- 199.09-289.01
39	4.37 et 4.87	179.33	135-135.92
40	4.54 et 4.71	177.37	132.92-133.92
41	4.72 et 5.15	357.21	180.92-240.92
42	5.17 et 5.56	176.46	93-111-132.92-135-155
43	5.52 et 15.69	593.19	285.01-353.09-383.09-473.10-503.10-575.10
44	5.92 et 7.38	421.20	164.92-224.92-299.01
45	5.96 et 9.80	431.28	385.09
46	5.99 et 8.09	385.28	153-161-205.09-223.09-267.01
47	6.13 et 6.26	423.26	205.09-226.92-301.01-303.01-377.18-385.09-387.18-405.10
48	6.37 et 8.16	367.28	173-191-193
49	6.39 et 6.78	163.40	119
50	6.44 et 11.29	401.22	180.92-240.92
51	6.56 et 13.69	371.24	249.01-327.01-353.01
52	6.57 et 8.27	427.22	240.92-256.92-367.09-397.09
53	6.65 et 15.48	594.18	285.01-353.09-383.09-473.10-503.10-575.10
54	6.80 et 15.34	595.15	285.01-354.09-474.10-504.10-576.10
55	7.20 et 8.03	429.23	240.92-256.92-341.01-369.09
56	7.40 et 13.21	409.15	180.92-240.92-365.01-394.01
57	7.53 et 15.75	327.22	171.09-211.09-229.09-256.92-291.18-309.18
58	7.59 et 37.30	269.31	135-223.17-251.17-
59	7.77 et 9.15	349.17	180.92-240.92
60	8.10 et 8.87	350.14	180.92-240.92-349.01
61	8.18 et 15	465.20	180.92-240.92-256.92
62	8.29 et 11.65	467.22	180.92-240.92-256.92-323.09-423.10
63	8.58 et 17.57	387.28	240.92-343.26
64	8.60 et 9.06	466.19	180.92-240.92-256.92-467.10
65	8.91 et 27.80	468.18	192.92-240.92-422.18
66	9.12 et 10.10	469.19	180.92-240.92-242.92-468.10
67	9.21 et 9.25	583.26	435.09-493.10-565.10
68	9.27 et 9.70	493.18	317.01
69	9.40 et 9.55	415.30	160.92-179-225-369.18
70	9.47 et 13.19	417.31	150.92-165.92-181-371.18-402.10
71	9.57 et 17.19	407.31	251.17-289.17-327.26-345.26-353.18
72	9.68 et 9.76	507.18	256.92-331.01
73	9.70 et 14.24	411.24	180.92-240.92-256.92-327.01
74	10.10 et 10.59	533.19	371.01
75	10.14 et 10.58	322.14	233.09-277.01-
76	10.28 et 10.47	534.20	372.01
77	10.45 et 10.78	363.14	180.92-240.92
78	10.71 et 10.95	341.23	96.92-180.92-240.92
79	10.74 et 10.82	607.27	298.01-313.01

80	10.80 et 13.06	413.28	180.92-240.92-253.18-413.10
81	10.82 et 11.14	577.21	268-283.01
82	10.86 et 11.07	578.21	268-283.01
83	11.09 et 13.13	449.27	180.92-240.92-256.92-285.01
84	11.16 et 11.31	521.20	345.01
85	11.29 et 17.37	448.19	255.01-284.01-327.01
86	11.46 et 12.66	453.27	180.92-240.92-242.92-452.10
87	11.61 et 11.67	475.23	298.01-313.01
88	11.67 et 12.87	450.26	180.92-240.92-256.92-451.10
89	11.69 et 11.97	445.21	283.01
90	11.73 et 11.86	446.22	283.01
91	11.99 et 12.75	452.23	180.92-240.92-256.92-451.10
92	12.37 et 12.64	643.11	437.01-481.01-499.01
93	12.77 et 13.52	657.21	351.01-
94	13.08 et 13.23	455.27	180.92-240.92-375.09-386.84-437.18
95	13.17 et 13.77	435.23	240.92
96	13.25 et 14.47	575.27	180.92-240.92-506.76-556.68
97	13.69 et 14.22	328.31	171.09-211.09-229.09-239.09-291.18-309.18
98	13.71 et 14.36	527.31	180.92-240.92-447.18-459.10-527.18
99	13.79 et 15.34	329.31	171.09-211.09-229.09-293.18-311.18
100	14.24 et 33.12	227.33	165.09-183.09-
101	14.43 et 15.15	301.31	221.17-265.17-283.18
102	14.49 et 14.92	242.34	181.09-225.09-226.09
103	14.54 et 14.60	809.24	417.09-565.18-613.18-667.18-713.19-743.27-791.27
104	14.62 et 15.07	464.39	396.84-402.26-420.26-446.26
105	14.75 et 21.38	243.25	174.92-197.17-225.09-243.17
106	14.89 et 15.15	330.34	171.09-211.09-229.09-293.18-311.18
107	15.50 et 16.18	287.31	241.17-269.17
108	15.60 et 16.08	288.32	241.17-269.17
109	15.71 et 15.93	289.27	242.17-270.17
110	15.75 et 15.97	355.26	287.17-309.18
111	15.95 et 16.82	395.19	240.92-256.92-326.84-380.93
112	15.99 et 18.31	143.45	98.92 -100.84-101.92-116-125
113	16.10 et 16.42	481.19	160.92-437.01
114	16.16 et 16.33	482.14	160.92-438.01
115	16.40 et 16.84	285.30	139-155.09-211.19-216.92-241.17-265.17-267.09-
116	16.54 et 17.50	352.11	336.01-323.01
117	16.61 et 16.65	396.22	240.92-256.92-380.93-
118	16.71 et 26.60	309.33	96.92-291.18
119	16.99 et 17.12	408.36	290.17-328.18-344.18-354.18
120	17.16 et 23.51	142.29	97.92- 99.84-100.84
121	17.46 et 17.67	223.23	112.92- 154.92-180.01-206.92-22.01
122	17.52 et 31.64	239.23	171.09-195.09-221.17-
123	17.71 et 40.02	883.57	518.18-533.18

124	18.03 et 29.22	299.18	169.17-253.26-281.18
	18.37 et 18.70	215.21	146.92-171-196.84-215.01
125	18.66 et 39.60	884.61	518.18-533.18
126	18.68 et 28.23	293.28	96.92-221.09-236.01-275.09
128	18.82 et 19.02	221.36	112.92- 152.84-164-177.01-205.09-221.09
129	18.96 et 34.74	241.31	223.17
130	19.10 et 32.72	390.37	228.09-255.17-322.84-347.18
131	19.26 et 20.41	305.25	125-135-249.09-277.01-287.09
132	19.83 et 26.38	311.36	183
133	20.94 et 37.43	255.31	237.17
134	21.50 et 32.21	391.37	255.17-322.84-345.26-347.26
135	21.58 et 23.98	171.45	127-144-150.92-153-171.09
136	21.88 et 22.32	172.35	111-144.92-154.84
137	21.90 et 39.48	283.28	221.09-265.17-268.01
138	22.98 et 23.40	313.36	185.09-215.09-277.17-295.18
139	23.10 et 23.23	314.34	186.09-216.09-278.17-296.18
140	23.42 et 27.28	297.29	183-279.17
141	23.83 et 25.37	265.29	96.92
142	24.13 et 24.77	266.19	96.92
143	24.28 et 35.29	267.17	96.92-98.92-249.17
144	25.18 et 25.80	312.28	183-311.18
145	25.39 et 25.54	271.37	225.17-253.17
146	25.88 et 26.39	310.25	97-309.18
147	26.62 et 27	354.25	353.18
148	27.08 et 27.15	326.28	183
149	27.78 et 28.04	294.26	96.92
150	28.03 et 29.28	339.31	183
151	28.33 et 28.58	199.41	181.09
152	28.57 et 28.80	340.24	183-339.18
153	28.80 et 28.93	205.43	189.09
154	28.93 et 29.08	300.31	169.17-253.26-281.26
155	29.35 et 29.72	225.43	157.09-207.09-226.09
156	31.77 et 31.95	277.40	233.17-259.09-275.09
157	32.15 et 36.20	685.57	255.17-279.17-423.18
158	32.23 et 35.75	671.56	255.17-279.17-391.18-409.18-415.18
159	32.74 et	885.52	519.09-529.10-534.10
160	32.84 et 36.79	253.37	209.09-235.17-254.17
161	33.14 et 33.52	254.29	235.17
162	33.84 et 34.66	279.35	261.17
163	36.32 et 36.71	282.30	263.26
164	36.56 et 36.67	659.66	423.18-591.18-623.52-659.44
165	36.73 et 40.01	1190.71	369-500.17-598.18-827.44-925.44-1154.70
166	37.35 et 40.01	1191.74	369-500.17-599.18-828.44-926.44-1155.70
167	37.45 et 40.01	1192.74	369-500.17-598.18-827.44-927.44-1156.70
168	39.52 et 40.01	1193.73	369-500.17-599.18-828.44-926.44-1155.70

Tableau 3 : Résultats de dépouillement détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux des feuilles de *Thymelaea hirsuta* en mode positif.

N°	Temps de rétention	MS	Fragmentation MS-MS ou MS2
1	0.01 et 25.24	185.07	143-167
2	0.01 et 20.65	239.05	89-111-133-151-177195.01-221.01
3	0.14 et 2.81	217.05	111-130.92-155-173-199.01-
4	0.82 et 1.10	123.05	81.92
5	0.84 et 2.29	175.08	60.08-116-130-157-158
6	0.89 et 1.06	151.05	109.92
7	0.96 et 1.04	125.15	84-84.92
8	1.06 et 1.18	176.08	60.08-116-130-157.09-158
9	1.08 et 14.78	266.15	87-104-126.92-248.01
10	1.09	246.15	175.17-266.09
11	1.10 et 1.93	189.15	60.17-74.08-116-130-144-158-172
12	1.12 et 1.14	292.21	118-175
13	1.14 et 1.18	221.15	104.09-162.92
14	1.16 et 1.49	138.16	96.92-130.92-144
15	1.16 et 1.60	116.31	70- 106.50
16	1.20 et 1.34	247.15	118-229.09
17	1.20 et 1.64	130.15	70.08-84.08-112
18	1.40 et 2.86	112.28	81-88-94-103
19	1.60 et 1.84	132.16	86.08
20	1.68	115.22	70
21	1.71 et 10.02	229.12	70-124-142-211.01
22	1.73 et 2.71	223.08	130.92
23	1.75 et 4.46	305.08	287.09-305.09-306.09
24	1.78 et 1.82	241.13	84-128-144-196.01-197.01
25	1.86 et 2.06	170.14	152
26	1.95 et 2.42	154.13	110-112.92-135.92
27	2.06 et 2.10	332.12	314.09
28	2.12 et 12.58	166.14	120
29	2.20	322.08	166.09-185.09-306.09-322.01
30	2.22 et 3.22	136.18	91-108-114.92-115.92-126.92
31	2.31 et 2.55	120.19	74-93-99-103-110.92
32	2.40 et 19.61	167.08	83-121-125.92
33	2.81et 3.31	268.09	136
34	2.88 et 3.58	261.13	168.92-214.92-243.01-261.09
35	3.04 et 27.71	301.14	240.17-245.01-259.09
36	3.09 et 24.84	269.13	136-136.92-224.09
37	3.15 et 28.17	429.22	232.01-371.09-398.10-429.26-430.26
38	3.24 et 6.74	481.16	317.01-349.01-481.18
39	3.33 et 14	205.11	184.01-188.01
40	3.38 et 3.49	277.10	184.92-233.01-259.01-260.01
41	3.54 et 6.70	497.09	200.92-333.01-365.01-407.01-453.10-479.10

42	3.61 et 3.81	188.12	144.09 -146
43	3.85 et 4.32	321.14	228.92-275.01-277.01-303.01-312.01
44	3.88 et 4.33	300.23	259.09-283.09
45	3.99 et 4.28	306.16	305.09-306.09
46	4.35 et 17.63	365.18	262.17-307.18
47	4.48 et 5.04	344.21	327.18
48	4.58 et 4.65	326.13	184.92-235.01-267.01-281.01-308.01-309.01-317.01
49	4.79 et 4.95	350.18	349.09-350.09
50	4.97 et 9.78	395.15	184..92-233.01-364.01
51	5.06 et 5.75	373.18	193-211-285.01-355.09
52	5.13 et 9.69	411.14	249.09-291.09-393.10
53	5.18 et 5.32	493.17	204.92-266.01-445.10-463.10
54	5.34 et 5.41	463.19	204.92-266.01-415.10-433.10-445.10
55	5.36 et 9.73	393.22	202.92-231.09-311.09-393.18
56	5.48 et 5.64	388.26	371.18
57	5.71 et 19.27	475.16	331.09-475.26
58	5.77 et 5.91	168.19	83-84
59	5.86 et 9.57	409.15	184.92-202.92-229.01-247.01-289.01-319.09-349.09-391.09
60	5.93 et 29.88	425.18	305.01-323.09-365.09-407.10
61	6.05 et 25.62	233.64	213.01
62	6.12 et 21.50	437.24	303.01-437.18
63	6.17 et 6.35	410.18	184.92-202.92-229.01-247.01-289.09-349.09-392.09
64	6.37-8.66	427.20	265.01-366.09-383 .09-409.10
65	6.40 12.51	211.18	119-135-175.09-181.01-193.09-194.01
66	6.49 et 6.72	476.35	459.18
67	6.72 et 15.42	617.17	331.01-497.01-581.02-599.10
68	6.74 et 15.24	595.15	458.01-476.10-529.10-560.10-577.10
69	6.93 et 15.36	618.14	331.01-599.10
70	6.96 et 7.06	596.13	457.01-475.10-530.10-559.10-578.10
71	7.01 et 7.06	633.15	513.01-543.02-573.02-615.02-624.02
72	7.08 et 33.16	337.64	281.09-317.01
73	7.10 et 7.16	525.30	525.27
74	7.18 et 8.20	273.21	213.01-215.01-252.92-255.01-273.09
75	7.23 et 7.53	507.11	344.93
76	7.25 et 7.58	564.38	547.27
77	7.31 et 7.33	765.23	603.10
78	7.60 et 7.80	621.26	381.01-395.01-459.10-591.10
79	7.62 et 7.98	608.39	591.27
80	7.67 et 7.96	613.32	613.27
81	7.87 et 7.92	629.28	585.18-611.10-629.27
82	7.99 et 8.35	652.37	635.35
83	8.13 et 10.65	345.24	114.92-211.01-253.09-271.01-285.01-313.01-

			327.09-328.09-
84	8.23 et 8.28	673.35	511.01-529.10-625.10-655.19
85	8.33 et 8.59	696.48	679.35
86	8.35 et 8.38	764.30	459.09-424.10-538.10-734.19
87	8.45 et 8.64	412.22	249.09-411.10
88	8.69 et 8.90	740.48	723.35
89	8.85 et 26.87	399.21	202-399.18
90	9.02 et 24.36	401.27	392.68-401.26
91	9.06 et 9.16	784.49	767.36
92	9.14 et 9.98	153.19	69-111.92-132.92
93	9.48 et 9.50	394.23	185-203-231.09-273.09-303.09-333.09-375.09
94	9.52 et 9.61	396.20	185-233.09-275.09-377.18
95	9.75 et 20.04	139.08	96- 97.92-98.92-120.92
96	9.80 et 9.84	605.20	395.09-575.18
97	9.89 et 10.05	331.22	273.09-313.09-331.09
98	9.91 et 22.87	459.22	232-411.10-429.10-459.26
99	9.96 et 10.72	625.20	204.92-415.09-429.09-577.10-595.10-607.10
100	10 et 10.03	461.25	234-413.10-431.10-443.10-
101	10.04 et 10.66	557.16	395.01
102	10.07 et 10.17	460.18	232-411.10-429.10
103	10.16 et 10.51	573.15	411.01
104	10.19 et 10.36	558.11	395.01
105	10.34 et 10.53	249.15	172.92-191.01-193.09-226.92-231.01-240.01
106	10.53 et 10.67	379.15	185-217.01-308.01-348.09-
107	10.62 et 19.25	519.31	375.18-519.27
108	10.69 et 10.86	631.20	317.01-337.01-499.01-613.10
109	10.74 et 10.84	632.20	317.01-337.01-499.01-613.10
110	10.81 et 11.25	601.16	307.01-317.01
111	10.83 et 11.13	602.19	307.01-317.01
112	10.87 et 11.88	285.10	270.01-285.01
113	10.89 et 11.58	579.15	285.01
114	11.16 et 11.30	685.28	204.92- 249-445.09-459.09-475.10-637.19- 655.19-667.19
115	11.24 et 11.60	471.13	184.92-308.92
116	11.29 et 11.51	472.16	184.92-310.01
117	11.32 et 11.41	287.08	164.92-213.01-219.84-241.01-269.01-287.01
118	11.43 et 11.56	655.23	204.92-415.09-429.09-458.09-607.10-625.18-
119	11.49 et 17.22	155.07	112-113.92
120	11.55 et 11.72	499.16	337.01
121	11.60 et 11.97	315.16	255.09-300.01-315.09
122	11.67 et 11.99	469.19	307.01
123	11.73 et 22.17	470.12	171.09- 307.01-453.26
124	11.92 et 13.30	140.15	96-98.92-99.92- 119.42
	11.97 et 12.07	255.17	213.01
125	12.06 et 12.13	389.27	371.09-389.18

126	12.17 et 26.17	575.28	375.18-515.18
128	12.69 et 14.51	607.29	410.09-559.10-577.10
129	12.99 et 18.31	309.19	240.84-268.09-291.09-
130	13.38 et 13.47	213.18	171.92-192.51-195.01-204.92
131	13.41 et 14.25	200.25	116.09-132.84-200.17-201.17
132	13.67 et 14.22	351.23	235.01-281.09-315.09-333.09
133	13.73 et 14.11	367.21	211-251.01-297.01-331.09-349.09
134	13.93 et 14.09	637.25	410.09-440.09-589.10-607.18
135	14.56 et 14.59	833.31	439.01-453.01-467.09-637.18-649.10-785.19-803.19
136	14.85 et 18.01	353.21	178.92-235.01-267.01-335.18-337.93
137	14.94 et 15.12	205.66	185.01-194.01
138	14.99 et 33.76	369.22	239.09-252.09-326.18-369.26
139	15.50 et 35.70	368.25	252.09-326.18
140	15.62 et 16.01	311.24	293.09
141	15.63 et 15.70	279.21	221.01-247.01-261.01
142	15.72- 15.97	327.20	309.09-310.09
143	16.19 et 16.69	271.14	202.84-224.92-240.17-252.84-271.09-272.09
144	16.53 et 16.60	158.14	98.92-102-117.84-136.92
145	17.11 et 21.13	302.26	184.17-260.17
146	17.13 et 18.24	186.20	57-71.08-85.08-144-165
147	17.40 et 22.43	343.29	240.17
148	17.42 et 17.54	240.26	95-109-183.09-240.17
149	18.32 et 18.44	455.24	295.09-383.09
150	18.69-18.78	329.23	117-287.17-329.18-330.18
151	18.98 et 22.28	431.25	287.09-431.18
152	19.15 et 22.12	514.35	171.08-497.35
153	19.34 et 27.88	446.22	216.92-252.09-404.10-445.26
154	20.34 et 20.48	397.19	183-237.01
155	20.46 et 21.38	256.80	126.92-236.09
156	21.15 et 33.53	328.29	117-286.17
157	21.22 et 21.58	169.28	127.92-148.50-157.50
158	21.33 et 21.45	453.19	236.92-240.09-281.01-350.18-378.84-324.09-384.84-435.18
159	21.49 et 21.93	359.25	359.18
160	21.56 et 21.70	354.30	103-175.09-337.18
161	21.61 et 21.75	360.24	359.18
162	22.57	591.39	368.29-446.18-547.35-591.35
163	22.59 et 22.66	547.34	375.09-547.27
164	22.64 et 22.77	503.32	331.09-503.27
165	22.80 et 24.63	313.24	268.17-313.18-314.18
166	22.85 – 22.94	415.29	243.01-415.18
167	23.70 et 23.76	616.45	599.35 -615.52
168	23.78 et 23.83	572.43	415.18-555.35
169	23.87et 23.94	528.45	511.35

170	23.96 et 24.06	489.36	489.26
171	23.97et 24.04	484.39	467.26
172	24.34 et 24.50	357.30	357.18
173	24.90 et 32.26	286.25	242.17 -243.17
174	25.33	674.54	233.67 -328.26-368.26-446.18-674.52
175	25.42 et 25.44	630.50	459.18-613.35
176	25.64 et 25.71	702.53	227.09-357.09-685.35
177	25.73 et 25.85	658.50	227.09-641.35
178	25.80 et 25.83	663.43	463.18
179	25.87 et 26.01	619.42	419.18-619.35
180	25.89 et 25.99	614.44	227.09-597.35
181	26.03 et 26.13	570.48	227.09-553.35
182	26.15 et 26.35	531.33	331.09
183	26.22 et 26.29	526.41	227.09-509.27
184	26.31 et 26.54	487.33	487.26
185	26.43	488.28	328.34 -368.26-446.26-487.35
186	26.94 et 27.11	447.27	216.92-252.09-268.09-350.18-378.84-404.10-406.10-448.18
187	27 et 32.09	346..31	117-286.17-304.18-328.18
188	27.90 et 28.16	295.24	114.92-158.84-207.01-226.84-239.01-254.01-277.09-295.18
189	27.91 et 32.24	370.27	353.09-327.18-328.18-369.26
200	28.23 et 28.39	423.19	301.09
201	28.28 et 28.47	385.31	385.26
202	28.52 et 28.60	341.31	298.09-341.18 -342.18
203	32.26 et 35.09	907.56	553.18-629.18
204	32.28 et 34.79	615.65	615.52
205	32.91 et 32.96	338.26	281.09-338.18
206	32.98 et 33.06	325.24	257.01-326.34
207	33.38 et 34.11	684.15	340.92-355.01-429.01
208	33.43 et 33.95	908.54	553.18- 629.18
209	33.63 et 39.98	1178.73	949.53-967.53
210	33.87 et 36.43	773.53	544.26-562.23
211	34.05 et 39.99	1179.69	949.53-967.53
212	34.97et 39.99	1100.73	871.52-889.52-
213	35.56 et 39.99	1101.76	871.52-889.52
214	35.61 et 40	1180.73	950.53-968.53
215	36.02 et 36.30	1026.77	797.52-815.52-
216	36.73 et 36.76	535.39	355.18-411.26

Tableau 4 : Résultats de dépouillement détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux des fleurs de *Thymelaea hirsuta* en mode négatif.

N°	Temps de rétention	MS	Fragmentation MS-MS ou MS2
2	2.96	117	73-99
3	3.48	174.99	155-157
4	21.59	157	89-113-139
5	22.53	219	113-151-175-205-219
7	1.02	173	131-155-156
8	1.02	159	115-116
9	7.49	137	93
10	1	209	163-191
11	1.09	405	191-387
12	1.03 et 22	191	85-111-127-173
13	1.04 et 1.78	192	85-111-127-171-173
14	1.04 et 3.10	133	115
15	1.06 et 9.68	317	165-207-225
16	1.06 et 29.77	225	207-225
17	1.07et1.84	195	129-159-177
18	1.11	165	105-129-147
19	1.13 et 9.86	161	99-101
20	1.20 et 19.89	323	161-179-233-263-278-323
21	1.49 et 2.88	117	73 -99
22	1.98 et 16.41	437	393-419-437
23	2.15	324	161-179-234-264
24	2.17 et 2.60	164	147
25	2.19 et 2.34	118	73-74 -75- 100
26	2.37 et 5	151	107-108
27	2.39 et 2.54	152	108-109
28	2.56 et 10.23	153	109-135
29	2.62 et 27.64	326	183-325
30	2.84 et 3.03	422	161-233-278-305
31	2.94	162	99-100-102
32	3.07 et 3.76	315	153-165
33	3.20 et 3.42	113	69-69-81-85
34	3.22 et 3.87	203	116- 142-159-186
35	3.37 et 28.59	293	96-221-236-293
36	3.40 et 3.84	457	163-205-325
37	3.50 et 11.61	447	284-327
38	3.67 et 4.20	436	161-202-233-292-305
39	3.86 et 11.48	448	255-284-327
40	4.18 et 27.55	353	191-337-353.18
41	4.22 et 23.56	351	336
42	4.35 et 14.99	331	161-179-313

43	4.48 et 5.16	179	135-136
44	4.52 et 4.78	463	168-287-331-445
45	4.69 et 24.15	307	179-199- 289
46	4.82 et 22.82	491	251-281-371
47	4.89 et 5.02	177	133-134
48	5.04 et 15.51	593	285-353-473-503
49	5.17 et 5.27	470	161-233-305-326
50	5.29 et 9.15	349	181-241-331
51	5.53 et 5.76	121	77-78
52	5.55	176.59	93-109-111-133-158-179-
53	5.78 et 8.34	367	173-193
54	5.80 et 16.37	483	321-438
55	5.86 et 15.38	594.	353-473-503
56	5.91-6.66	401	165-225-299
57	6.15 et 7.47	421	224.92-299
58	6.51 et 6.72	289	179 -205-245
59	6.60 et 8.70	193	134-149-178
60	6.94 et 7.07	595	354-474-504-576
61	7.25 et 7.62	484	321
62	7.47et 14.54	371	312-327-353
63	7.50 et 7.96	187.	125 -126
64	7.71 et 8.64	639	463
65	7.77 et 15.68	327	171-211-229-291-309
66	7.81 et 11.14	577	268-283
67	7.88 et 8.19	377	331
68	8.04 et 8.40	319.	237.92-301.01-463.02
69	8.15 et 8.85	509	333
70	8.32 et 8.47	651	327-339-633
71	8.49 et 33.46	254	235-254
72	8.59 et 8.65	433	271-313-387
73	8.66 et 8.95	465	151-241-257-285-303-447
74	8.68 et 9.55	419	266-338-533-
75	8.72 et 9.22	467	323
76	8.87 et 9.21	597	357-387-417-489-477-579
77	8.93 et 9.48	839	371.01-533.10-677.10
78	8.97 et 9.13	598	358.01-388.01-418.01-478.10-580.10
79	9.11 et 10.03	493	317.01
80	9.23 et 9.70	246	113- 157.92-299.01-317.01
81	9.24 et 10.08	477	301.01
82	9.72-11.63	475.24	298.92-373.09-415.18
83	9.86 et 23.42	321.15	233.09-277.01
84	9.96 et 16.01	322.07	233.09-277.01-321.01
85	10.10 et 10.96	533.18	371.09
86	10.21 et 10.80	534.12	371.09
87	10.32 et 11.60	555.13	375.01-393.01

88	10.80 et 11.26	411.23	240.92-256.92
89	10.86 et 11.07	578.21	267.92-283.01
90	10.98 et 11.22	341.23	180.92-240.92
91	11.09 et 11.28	361.24	165-179-313.09-346.09
92	11.16 et 11.58	561.19	351.01- 369.01- 387.01
93	11.30 et 12.86	270.24	254.92-285.01
94	11.31 et 16.58	285.20	213.01- 241.01-257.01-267.01-285.01
95	11.59 et 20.49	541.12	254.92-447.01-497.01
96	11.62 et 39.41	283.23	255.01-268.01-283.26-284.18
97	11.67 et 11.98	445.17	283.01
98	11.71 et 11.89	446.22	283.01
99	11.78 et 17.19	329.28	171.09-211.09-229.09-293.18-311.18
100	12.28 -12.73	643.18	481.01-499.01-541.01
101	12.57 et 13.93	657.14	351.01
102	12.96 et 13.14	542.21	448.01-456.10-498.10
103	11.97 et 15.42	301.32	221.17-265.17-283.18
104	12.38 et 12.57	644.15	481.01-500.01-542.02
105	12.65 et 13.78	658.22	352.01
106	12.84 et 12.88	449.36	287.17-431.26
107	12.90 et 13.24	659.20	353.01-395.01-615.18
108	13.25 et 13.37	373.22	223.01-235.01-327.09-355.09
109	13.30 et 13.76	372.14	312.09-327.09-353.01
110	13.80 et 14.26	328.30	171.09-211.09-229.09-291.18-309.18
111	13.95 et 15.28	357.23	147-151-209-298.09-313.09-342.01
112	14.21 et 14.28	543	417-437
113	14.38 et 32.96	227.29	165.09-183.09-227.17-228.09
114	14.56 et 14.97	242.30	181.09-225.09-226.09
115	14.71 et 14.73	459.26	357.18-399.18-415.18-440.76-444.10
116	14.75 et 21.44	243.26	174.92-182.09-197.17-225.09-226.09
117	14.91 et 15.38	330.29	171.09-211.17-229.09-293.18-311.18
118	13.43 et 37.53	709.25	279.17-447.18
119	15.39-16.45	431.11	351.01
120	15.51 et 30.28	337.18	337.18
121	15.53 et 16.03	432.04	352.01
122	15.55 et 16.16	287.33	241.17-269.17-287.18
123	15.66 et 16.07	288.31	241.17-269.17-288.18
124	16.05 et 16.56	481.15	161 -437.01
	16.09- 16.49	482.13	161 -437.10
125	16.43 et 19.92	352.13	336.01
126	16.61 et 16.99	725.10	335.92-351.01
128	17.13 et 26.91	309.41	96.92-309.18
129	17.21 et 26.69	311.45	183-311.18
130	17.42 et 17.57	387.31	341.18-343.26
131	17.52 et 17.61	223.23	112.92-154.84-180.01-206.92-222.92
132	17.59 et 23.60	142.25	97.75-99.92- 100.84

133	17.74 et 37.14	269.29	135-270.18
134	18.05 et 18.35	143.46	98.92-100.84-101.92-125
135	18.37 et 18.71	215.24	146.92-169.09-171-196.84-215.01
136	16.59 et 17.12	701.09	495.01-598.02-642.01-657.01
137	18.95 et 19.10	221.38	112.92-152.84-164-177.01-202.84-205.01-221.01
138	19.23 et 32.49	390.35	228.09-255.17-322.84-
139	19.91 et 27.75	468.32	193-422.18
140	20.34 et 20.42	305.26	277.01-305.01
141	20.99 et 36.58	255.31	255.26-256.17
142	21.59 et 23.52	313.31	185.09-215.09-277.17-295.18
143	21.61 et 24.01	171.42	127-150.92-153-171.09
144	22.06 et 22.17	172.35	111-154.84
145	22.41 et 40.02	745.60	281.17-509.26
146	23.10 et 23.33	314.34	185.09-215.09-277.17-295.18-296.18
147	23.81 et 27.30	297.28	183 -279.17-297.09-298.09
148	24.13 et 25.55	265.30	96.92-265.09
149	24.39 et 25.07	266.21	96.92- 266.09
150	24.58 et 35.18	267.19	96.92-98.92-249.17- 267.17
151	25.57 et 26.04	312.24	183-311.18
152	25.76 et 28 36	295.37	96.92-165.09-251.17-277.17-295.18
153	26.32 et 26.69	310.24	97-309.18
154	26.71 et 28.33	325.29	183-325.18
155	26.99 et 27.28	354.23	353.18
156	27.30 et 27.90	397.30	397.26
157	27.59 et 28.05	441.33	441.26
158	28.18 et 28.40	294.22	96.92-294.09
159	28.29 et 28.64	199.41	181.09-199.09
160	28.42 et 29.66	339.31	183-339.18
161	28.61 et 32.18	391.31	255.17-322.84-347.18-391.26
162	28.66 et 32.12	380.38	381.18
163	28.79	205.42	189.09-205.09-206.09
164	28.85 et 29.26	299.41	253.26-281.26-299.26-300.18
165	28.94 et 29.11	300.35	253.26-281.26-300.18
166	29.15	340.30	339.18-340.09
167	29.79	213.43	169-197.92-213.09-214.09
168	30.30 et 37.33	746.56	281.17-509.26
169	30.36 et 30.92	381.34	381.18
170	30.94 et 31.66	239.42	221.17-239.17-240.17
171	31.19 et 37.10	1173.76	387.17-459.17-605.35-677.35-895.52-955.53-1117.62
172	31.83 et 31.87	277.41	233.17-259.17-277.18
173	31.95 et 37.02	1174.74	459.17-605.35-678.35-896.52-956.53-1118.62
174	32.21 et 36.16	1175.78	459.17-606.35-677.35-895.52-955.53-1117.62
175	32.51 et 32.63	228.31	228.09
176	32.92 et 34.75	253.38	235.17- 254.17

177	33.64 et 34.71	241.39	241.17-242.17
178	33.85 et 34.12	279.37	261.17 -280.18
179	36.18 et 36.24	256.26	256.17
180	36.26 et 36.94	281.38	281.26
181	36.92 et 38.81	683.60	255.17-277.17-423.18
182	37.16 et 40.01	1190.77	369-500.17-598.26-827.44-1154.70
183	37.18 et 37.99	951.62	540.09-555.18-626.18-905.44
184	37.35 et 37.86	952.61	541.09-555.18-627.18-906.44
185	37.88 et 40.01	1191.77	369-500.17-599.18-828.44-1155.70
186	37.91 et 40.01	1192.75	369-500.17-598.26-827.44-1156.70
187	38.79 et 40.01	1193.72	369-500.17-599.26-828.44-1155.70

Tableau 5 : Résultats de dépouillement détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux des fleurs de *Thymelaea hirsuta* en mode positif.

N°	Temps de rétention	MS	Fragmentation MS-MS ou MS2
1	0.01 et 20.71	239.07	89-133-151-177-221
2	0.01 et 22.61	185.07	143-167
3	0.02	126	84.92-105.92
4			
5	0.02 et 3.86	118.11	59-72-97
6	0.02 et 16.11	173.03	131.84-132.84-154.92
7	0.25 et 2.75	217.07	111-155-173-199.01
8	0.84 et 1.07	123.04	81.92
9	0.84 et 4.71	175.08	60.08-116-130-157.09-158
10	0.88 et 14.61	124.10	81.83 -83-83.92
11	0.91 et 1.05	151.09	109.92
12	0.95 et 1.04	125.16	83-84 -84.92
13	1.06	162.13	60-84-126-144-145
14	1.06 et 14.83	266.15	87- 104.09-229.01-248.09
15	1.08	213.07	196.01
16	1.08 et 1.16	176.11	60.08-116-130-131.92-157-158
17	1.10 et 1.14	171.13	89-115-126.92-149.92-153.92-162
18	1.10 et 2.83	156.14	110.09-112-137.92
19	1.12 et 1.20	221.15	104.09-162.84
20	1.14 et 1.37	381.06	200.92-218.92-236.09-260.01-
21	1.18 et 1.47	138.16	96.92-130.92-144
22	1.20 et 1.63	116.36	70-106.50
23	1.22 et 1.24	247.23	104.09-118-229.09
24	1.27 et 2.25	363.09	270.92- 302.93-345.01
25	1.28 et 1.61	130.19	70.08 -84-112
26	1.33 et 1.44	144.16	70-84-98
27	1.48 et 2.06	112.29	81-88-94-103

28	1.56 et 1.90	132.19	86
29	1.66 et 1.70	231.05	130.92-143-213.01-214.01
30	1.72 et 11.23	229.12	142-211.01-220.01
31	1.74 et 1.85	152.18	121
32	1.74 et 1.85	182.13	136-165
33	1.77 et 1.90	294.13	276.09
34	1.83	276.17	132 – 230.09- 258.09
35	1.87 et 2.28	347.11	257.11 -285.01-329.01
36	1.88 et 2.65	166.19	120-149
37	1.92 et 1.99	189.10	86.08-130-142-143-146-171-172
38	2.08 et 2.74	154.21	93 – 110-112.92-135.92
39	2.27 et 3.19	136.15	91-105-114.92-115.92
40	2.30 et 2.56	120.21	74-93-103-110.92
41	2.43 et 16.11	167.09	120-121-125.92-149
42	2.58 et 2.80	310.14	120-166- 264.09-282.09-292.09
43	2.67 et 32.21	328.17	117-286.17
44	2.80 et 27.66	301.16	245.01-259.09
45	2.85 et 3.10	157.12	98.92-111-113.92-115.92-135.92-138.92-147.92
46	2.89 et 2.94	424.17	388.09-406.10
47	2.91 et 3.25	268.11	136
48	2.96 et 3.59	261.13	132-168.96-214.92-243.01-261.09
49	3.14 et 3.52	277.09	184.92-259.01
50	3.23 et 14.14	205.11	184.01-188.01
51	3.50 et 3.83	188.11	144.09-146
52	3.61 et 4.37	305.18	287.01-305.09
53	3.81 et 4.30	321.18	228.92 -277.01-303.09
54	3.92 et 4.77	135.14	77-78.92-79-107-114.42
55	3.95 et 4.24	300.23	259.01-283.09
56	4.10 et 4.22	306.12	305.09- 306.09
57	4.31 et 4.76	153.15	134.92
58	4.40 et 17.62	365.16	262.17-307.18
59	4.60 et 5.05	349.20	349.09- 350.09
60	4.78 et 5.88	373.20	193-202.92-211-355.09
61	4.80 et 5.01	344.26	327.09
62	4.87 et 12.14	389.14	371.14-372.18
63	4.89 et 4.94	366.15	185-203-334.09-348.09
64	4.96 et 13.71	395.14	185-233.01-364.01-394.18
65	5.05 et 5.17	226.91	206.01 – 215.01
66	5.10 et 5.35	411.09	200.92-291.01-378.01-393.01
67	5.38 et 5.70	393.20	393.18
68	5.45	374.15	193.09-203-211-355.09
69	5.47 et 6.32	409.20	203-229.01-391.01
70	5.49 et 5.59	388.26	371.18
71	5.61 et 33.01	337.10	174.92-185-317.01
72	5.66 et 18.09	353.14	178.92-191.92-338.01- 353.01

73	5.81 et 20.03	155.08	112-113.92
74	5.81 et 20.21	139.10	96-97.92-98.92-120.92
75	5.83 et 21.47	437.22	303.01 -437.18
76	5.88 et 21.43	453.21	202.92-291.01-331.01-393.01-435.10
77	5.99 et 6.18	432.25	415.18
78	6.14 et 6.25	451.21	203-273.09-289.09-393.09-433.10
79	6.23 et 6.84	211.17	181.01-193.01
80	6.27 et 6.72	481.26	437.10-481.18
81	6.28 et 10.02	499.17	319.01-345.01-437.18-481.18
82	6.32 et 6.70	497.26	438.18 -453.10-479.10
83	6.35 et 6.70	476.30	459.26
84	6.51 et 8	273.19	227.01-232.92-255.01-273.09
85	6.72 et 15.35	617.12	581.02-599.10
86	6.74 et 7.11	595.19	457.01-475.10-529.10-559.10-577.10
87	6.87 et 7.19	525.26	525.10
88	6.91 et 7.03	633.15	513.01-573.02-615.10
89	6.94 et 7.04	618.12	599.10
90	6.97 et 7.02	596.18	458.10-530.10-560.10-578.10
91	7.07et 7.62	507.14	345.01
92	7.14 et 7.52	523.01	360.93 – 505.01
93	7.28 et 9.06	355.21	185-193-203-200.92-337.09
94	7.38 et 7.45	508.07	345.01
95	7.61 et 7.90	608.35	591.27
96	7.61 et 7.93	613.30	613.27
97	7.64 et 7.88	629.31	570.27-611.02-629.27
98	7.91 et 26.41	371.18	251.01-311.01-353.09
99	7.92 et 8.14	356.21	185-193-200.92-202.92-337.09
100	8.02 et 8.33	652.41	635.35
101	8.15 et 8.33	657.36	657.27
102	8.19 et 8.29	673.37	614.27-655.10-673.27
103	8.31 et 8.63	696.46	679.35
104	8.33	701.38	701.35
105	8.36	675.26	317.01-381.01-543.10-645.19
106	8.38 et 8.46	717.38	523.01-555.10-699.10-717.27
107	8.48 et 9.56	457.25	277.09-385.09-413.10-427.18-439.18
108	8.65 et 8.88	745.37	745.36
109	8.65 et 8.92	740.44	723.35
110	8.73 et 8.78	761.39	743.11 -761.27
111	8.90 et 26.86	399.20	358.09-399.18
112	8.97 et 9.18	784.54	767.36
113	9.11	789.41	789.36
114	9.21 et 9.45	863.23	395.01-557.10-639.10-701.10-801.19
115	9.28 et 9.40	828.50	811.44
116	9.49 et 9.52	441.21	397.09-423.10
117	9.56	603.20	309.01-441.09

118	9.58 et 9.84	527.15	365.01
119	9.65 et 9.68	543.17	381.01-499.19-525.10
120	9.70 et 28.16	295.20	223.09-227.09
121	9.77 et 10.80	345.07	114.91-211.01-323.01- 327.01-343.93
122	9.99 et 10.86	557.17	395.01
123	10.04 et 10.23	361.07	314.93-342.93-360.93
124	10.04 et 10.63	323.10	251.01-277.01-279.01-305.01-323.01
	10.11 et 29.51	346.03	117-286.17-304.18- 328.18
125	10.14 et 10.77	573.10	411.01- 492.01
126	10.26 et 10.70	558.10	395.01
128	10.65 et 11.37	287.20	205.92-278.01-355.01- 411.01
129	7.21 et 7.59	569.33	523.02-569.27
130	10.83 et 11.12	601.17	307.01-317.01-583.10
131	10.85 et 11.02	602.13	307.01-317.01
132	10.91 et 11.87	285.10	257.01-270.01-285.01
133	10.93 et 18.25	309.18	242.92- 268.09- 298.09
134	11.05 et 11.14	429.18	232.01-398.10
135	11.25 et 11.53	471.15	184.92-308.92
136	11.34 et 11.39	472.15	184.92-309.92
137	11.46 et 11.97	579.20	382.09-399.01-531.10-561.10
138	11.64 et 11.73	315.19	255.09-300.01-315.09
139	11.69 et 11.93	469.12	307.01
140	11.78 et 19.14	470.16	171-308.01-453.26
141	11.96 et 12.10	255.17	213.01
142	12.36 et 12.55	667.15	505.01-605.10
143	12.59 et 13.73	681.13	619.10
144	12.82 et 12.97	682.13	619.10
145	13.18 et 23.84	577.19	577.35
146	13.71 et 14.23	351.23	235.09-281.09-333.18
147	13.80 et 14.12	367.20	211- 237.01- 251.01 -297.01- 331.09- 349.09
148	13.94 et 14.03	352.22	235.09-281.01-333.09-334.18
149	14.33 et 14.54	607.24	410.09-559.10-557.10
150	14.90 et 15.26	205.71	185.01-194.01
151	14.94 et 32.24	369.21	252.09-326.18
152	15.03 et 21.72	354.22	103-175.09-338.01-353.01
153	15.62 et 15 .64	279.19	210.92-220.01-238 .01-247.09-261.09-279.09
154	15.66 et 16.05	311.22	293.09
155	15.66 et 33.96	368.25	252.09- 326.18
156	15.80 et 15.96	327.23	309.09 -310.09
157	16.13 et 16.36	505.06	436.76-460.76-487.26-
158	16.16 et 21.17	302.25	184.17- 260.17
159	16.23 et 16.56	271.20	202.84-225.01-252.92-271.09-
160	16.52 et 17.37	375.09	319.93-347.93-357.09
161	16.59 et 17.07	257.65	140- 236.92
162	16.67 et 16.85	727.11	375.01

163	17.41 et 22.42	343.30	240.17
164	17.44 et 17.53	240.27	95-109-183.09-240.17
165	17.58 et 18.16	186.25	57-71.08-85.08-144-168
166	18.32 et 18.40	455.22	295.09 -383.09
167	18.93 et 22.40	387.23	387.18
168	18.97 et 22.31	431.28	287.09-431.18
169	19.02 et 22.17	475.31	331.09-475.26
170	19.09 et 19.23	519.18	375.18-519.27
171	19.64 et 27.89	446.27	216.92 -404.10-445.26
172	20.05 et 25.71	233.80	192.84- 213.01
173	20.37 et 20.48	397.19	183-237.01
174	20.46 et 21.45	256.79	126.92-236.09
175	20.51	209.10	167.92
176	20.55 et 21.61	169.22	127.92 -148.50-157.50
177	21.49 et 21.93	359.24	359.18
178	21.61 et 21.75	360.24	359.18
179	22.12	514.45	497.35
180	22.63 et 25.75	547.38	547.27
181	22.65 et 25.86	503.31	331.09-503.27
182	22.73 et 26.04	459.28	459.26
183	22.82 et 24.65	313.28	271.09-313.18 -314.18
184	22.82 et 26.23	415.30	415.26
185	23.22 et 24.83	269.22	169-211.01-222.09-251.09-269.17
186	23.70 et 23.77	616.46	599.35-615.52
187	23.80 et 23.82	572.44	415.18-511.35-555.35
188	23.87 et 23.94	533.35	533.27
189	23.89 et 23.96	528.42	511.35
200	23.98 et 24.08	489.34	489.26
201	23.99 et 24.06	484.37	467.35
202	24.08 et 24.24	445.34	445.26
203	24.17 et 24.38	401.34	401.26
204	24.33 et 24.49	357.28	357.18
205	25.12 et 29.79	286.25	242.17- 243.17
206	25.32	674.55	503.26- 657.44
207	25.57 et 25.59	586.51	515.18 et 569.35
208	25.79 et 35.26	663.45	551.27-607.35
209	25.89	498.39	481.26
210	25.91 et 25.98	619.42	419.18-619.35
211	26.04 et 26.16	575.43	375.09-575.35
212	26.18 et 26.34	531.39	531.27
213	26.34 et 26.52	487.33	287.09-487.26
214	26.49 et 26.70	443.30	443.26
215	26.88 et 36.95	685.42	340.92-356.01-430.01-686.35
216	28.20 et 32.52	1030.60	685.35
217	28.27 et 28.32	423.17	301.09

218	28.34 et 28.41	385.32	385.18
219	30.56 et 35.90	686.42	342.92-357.01-431.01-687.44
220	32.23 et 37.68	731.51	607.35-663.44
221	32.49 et 37.40	732.54	608.35-664.44
222	33.44 et 34.77	1057.77	779.48-
223	34.82 et 35.60	733.48	364.09-462.18-477.26-665.44-733.52
224	35.28 et 40	1178.74	949.53-967.53-
225	35.85 et 40	1179.71	949.53-967.53-1179.70
226	36.85 et 40.01	1180.70	950.53-968.53-
227	37.03 et 40.01	1100.81	871.52- 889.52
228	37.71 et 40.01	1101.81	871.52- 889.52-1101.70

Tableau 6 : Résultats de dépouillement détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux des brindilles de *Thymelaea hirsuta* en mode négatif.

N°	Temps de rétention	MS	Fragmentation MS-MS ou MS2
1	0.02 et 36.69	255.28	255.17-256.17
2	0.03 et 23.45	233.21	176.09-204.09-233.09-234.09-
3	0.09	173.14	111-127-154.92
4	0.98 et 6.28	367.14	173-193
5	0.98 et 16.50	483.36	321.01-438.01
6	0.99 et 23.52	309.24	291.18-309.18
7	0.96 et 12.78	644.74	438.01-482.01
8	0.99	375.28	359.01
9	1.01	169.35	150.92
10	1.01 et 26.27	339.13	195-339.18
11	1.02	137.28	93
12	1.04	118.33	72.83-73-74-74.08-75-75.17-99.75-100-100.92
13	1.04 et 21.85	192.14	85.08-93-109-111-127-155-171-173-174-191.09-192.01
14	1.05	259.08	191.25-317.09-339.18-383.09
15	1.07 et 9.14	317.14	181-224.92-299.01
16	1.08 et 4.09	195.26	129-136-141-147-151-159-177.01
17	1.09	117.40	72.92-73-99
18	1.09 et 1.84	383.13	191
19	1.10 et 10.74	405.11	209-273.01-357.09-387.01
20	1.13	161.58	99.09-101-143
21	1.16	131.54	85-113
22	1.20 et 15.92	323.11	161-234.09-263.01-278.01-323.01
23	1.21	179.46	75.17-99 .09-143-161
24	1.26 et 15.27	447.14	284.01
25	1.29 & 2 .01	191.17	84.92-85.08-93-109-111-127-128.92-154.92-

			170.92-173-192.01
26	1.59 et 4.55	193.07	134-149-177.92
27	2.07	154.27	110-135.92
28	2.21	164.30	147
29	2.26	315.13	152.92-164.92
30	2.44	165.21	121-147-148
31	2.64	205.13	160.92-186.92-190.01-205.09-206.09
32	2.70	113.47	68.75-69-69.08
33	2.78	175.25	85-113-115-129-131-132-156.92
34	2.84 et 3.09	457.17	162.92-325.01
35	2.90 et 16.73	343.13	171.09-229.09-328.09
36	3.21 et 3.30	459.15	315.01-357.01-397.09
37	3.21 et 3.32	489.19	195-237-357.01
38	3.29 et 15.61	357.11	136-151-209-313.09-342.09
39	3.29 et 3.61	305.14	96.92-225.01-287.01
40	3.35	288.12	241.26-269.17-288.18
41	3.41	217.26	137-155-171.09-173-199.01-200.01
42	3.46 – 35.02	267.18	149-249.17-267.17
43	3.49 et 4.03	203.22	116-142-159-186.01
44	3.58	181.30	109-137-137.92-162.92
45	3.61 et 11.61	403.18	223-343.09-373.09
46	3.74 et 3.95	188.25	125.09-126-144
47	3.74 et 3.95	191.17	125.09-126-144-170
48	3.75-12.05	358.16	240.92-329.09-341.09-527.10
49	3.75 et 24.11	353.17	337.01-353.17
50	3.85 et 3.98	186.71	125.09
51	3.92 et 7.77	485.20	322.01
52	4 et 4.67	243.26	181.09-199.09-225.09
53	4 et 12.84	401.17	321.01
54	4.06 et 4.76	421.14	224.92-299.01
55	4.06 et 17.08	371.16	312.09 -327.09-353.01
56	4.09 et 20.42	351.19	336.01
57	4.11 et 3.35	187.30	125.09
58	4.12	138.29	93-94
59	4.15	211.22	167-181.01
60	4.18	159.33	113-123-141
61	4.23 et 15.50	593.20	351.01-473.10-413.09-503.10
62	4.32 et 14.86	349.16	180.92-214.92-240.92-269.09
63	4.35 et 4.99	429.21	205-240.92-249.01-256.92-385.09
64	4.38 et 4.73	347.19	155-267.09-329.01
65	4.44	368.19	193.92
66	4.61 et 15.13	327.33	171.09-211.09-229.096-291.18-309.18
67	4.70 et 6.42	385.22	267.01

68	4.76 et 20.11	341.17	195-309.18
69	4.85 et 34.56	241.22	241.17-242.17
70	4.90 et 6.09	389.19	193-341.01
71	4.94 et 15.36	594.18	353.09-473.10-503.10
72	4.97 et 5.14	350.11	180.92-240.92-349.01
73	5.50 et 10.34	439.19	243.01-315.01-329.09-391.09
74	5.53 et 5.64	681.40	405.18-494.18-511.18-592.27
75	5.71 et 7.89	484.14	321.01
76	5.85 et 7.29	595.20	354.09-474.10-504.10
77	6.00 et 37.03	795.43	422.18-493.18-538.26-749.44-794.44
78	6.33 et 6.39	669.18	493.01
79	6.48	289.17	179-205.01-245.01
80	6.60 et 7.73	467.22	240.92-323.09-377.09-423.10
81	6.90 – 7.23	615.18	375.01- 495.01
82	6.99 et 7.13	596.10	475.10 -505.10-577.10
83	7.08 et 7.11	1187.16	503.42 -593.09
84	6.63 et 7.05	465.26	240.92-256.92
85	7.14 et 13.10	419.33	266.01-287.17-338.01
86	7.20et 14.93	839.24	371.01-533.01-677.10
87	7.44 et 7.74	505.17	342.93
88	7.49 et 7.68	967.09	321-483.01
89	7.53 et 7.62	968.16	320.92-483.01
90	7.56 et 7.62	989.19	320.92-342.92-483.01-505.01-827.02
91	7.56 et 23.54	321.22	233.01-277.01-321.01
92	7.80 et 8.26	603.24	287.01-343.09-588.10
93	7.83 et 7.92	825.19	483.1-645.02-663.10
94	7.83 et 18.92	269.24	135
95	7.92 et 8.07	627.19	321.01- 483.10-525.10
96	8.01 et 8.10	604.26	287.01 –343.09-441.01-588.10-603.10
97	8.04 et 8.16	363.21	180.92-240.92
98	8.07 et 8.10	653.21	315.01-473.01-477.01-491.01-533.01-
99	8.13 et 8.43	503.20	341.01
100	8.16 et 18.09	270.21	135-135.92-254.92-285.01
101	8.19 et 8.73	651.28	327.09-339.09-621.18-633.19
102	8.19 et 22.27	541.14	254.92- 415.01-447.01-497.10
103	8.28 et 23.17	285.17	155.09-165-211.17-239.17-239.17-267.17-285.17
104	8.34 et 10.25	345.29	171-211.09-229.09-327.18
105	8.45 et 8.67	652.26	328.09-340.09-634.19
106	8.51 et 8.60	687.26	651.19
107	8.64	295.20	277.01
108	8.64 et 10.43	533.21	371.01
109	8.70 et 10.11	441.23	327.18-361.09-395.01
110	8.70 et 8.91	565.24	271.01
111	8.76 et 12.36	657.16	351.01 -613.10
112	8.76 et 9.23	411.23	240.92-256.92-327.01

113	8.76 et 9.84	534.18	371.09
114	8.82 et 11.82	555.18	375.01-393.01-525.18
115	8.97 et 9.63	535.19	372.01
116	9 et 9.64	266.28	185-371.01-372.01
117	9.05 et 9.21	597.23	357.09-387.09-477.10
118	9.18 et 9.60	1007.23	371 et 533.01
119	9.24 et 9.54	1089.22	393-555.01
120	9.30 et 9.57	1068.22	371 et 534.01
121	9.58 et 9.84	677.19	371.01-533.10 -575.10
122	9.60 et 9.78	442.22	327.18-361.18-395.01
123	9.63 et 9.75	338.30	266.01-307.01-575.10
124	9.66	678.21	534.01- 576.02
125	9.69 et 11.27	579.29	285.01- 417.09
126	9.75 et 12.16	491.17	315.01
128	9.81 et 10.14	561.21	351.01-369.01
129	9.83 et 10.11	521.19	345.01
130	9.87 et 9.99	663.20	357.09 – 457.01-501.01
131	9.87 et 16.12	322.12	233.09-277.01-321.01
132	10.14 et 10.55	701.18	315.92 -491.01-525.01
133	10.23 et 10.52	601.27	373.09-421.09-553.18
134	10.28 et 10.34	435.20	209-225-387.09
135	10.40 et 13.73	387.16	151-181-372.09
136	10.43 et 10.61	715.20	328.92-505.01
137	10.49	249.29	321.09
138	10.54 et 15.58	287.34	241.17-269.17-287.18
139	10.63 et 11.24	805.21	499.01-643.10-685.10-715.10-745.10
140	10.75 et 10.84	806.21	499.01-644.10-686.10-716.10-746.10
141	10.77- 11.66	607.27	298.01-313.01
142	10.81 et 16.96	703.22	415.01-541.01-577.10
143	10.81 et 10.93	499.19	337.01
144	10.87 et 10.96	608.24	298.01-313.01
145	10.89 et 11.64	577.19	283.01
146	10.90 et 13.87	643.21	437.01- 481.01-499.01
147	10.92 et 11.39	578.23	283.01
148	10.94 et 11.30	705.25	417.01-579.10
149	10.97 et 16.49	437.20	357.09-393.01
150	11.09 et 11.21	706.16	418.01-580.10
151	11 et 20.63	542.21	309.01-415.01-447.01-497.10
152	11.15 et 11.54	361.27	165- 179-313.09-346.09
153	11.17 et 13.76	433.28	352.01 -373.09
154	11.27 et 11.45	362.28	165-179-313.09-346.09
155	11.30 et 12.28	658.18	352.01-614.10
156	11.39 et 11.60	448.16	284.01- 327.01
157	11.46 et 24.37	373.25	210-313.09-343.09-355.09

158	11.57 et 14.22	557.33	509.18-539.18
159	11.67 et 11.84	475.22	313.01
160	11.69 et 12.40	372.15	312.09 -327.09-353.01
161	11.75 et 12.37	445.25	283.01
162	11.81 et 12.13	446.19	283.09- 283.92
163	11.85 et 17.67	329.34	171.09-211.09-229.09-293.18-311.18
164	11.88 et 39.55	283.26	283.26-268.01
165	11.93 et 12.22	659.18	352.01- 615.10
166	12.25et 12.98	301.30	221.17-265.17-283.18
167	12.31 et 12.87	644.18	437.01- 481.01
168	12.37 et 12.46	1049.28	353-371-515.9-533.09
169	12.58 et 28.81	299.35	139.09-253.26-281.18-299.26
170	12.64 et 14.57	328.29	171.09-211.09-229.096-291.18-309.18
171	12.81 et 15.18	583.26	357.09-369.09-535.10-
172	12.90	584.26	358.09-370.09-536.10
173	12.95 et 13.44	417.18	205-337.01-371.09-387.09
174	13.01 et 14.05	431.05	351.01
175	13.13 et 13.27	418.21	205-236.01-285.17-338.01-372.09
176	13.21 et 13.88	432.05	351.09-351.93
177	13.56 et 14.28	331.36	171.09-212.17-230.09-313.18-331.18
178	13.76 et 13.82	332.30	313.18-332.18
179	13.82 et 16.07	330.36	171.09-211.09-229.09-293.18-311.18
180	14.02 et 14.25	613.27	387.09-417.09-565.18-583.10
181	14.08 et 15.44	358.16	151-209-313.09-342.01
182	14.19 et 14.54	543.16	417.01-437.01
183	14.25 et 14.48	544.15	417.01-437.01
184	14.27 et 14.51	553.21	357.09-411.09-505.10-535.10
185	14.60 et 38.54	809.32	277.17-553.26-613.18-741.44-761.19-
186	14.65 et 38.48	810.32	277.17-553.26-613.18-791.19-811.52-
187	14.80 et 14.92	770.70	580.27-685.35
188	15.10 et 20.51	286.29	155.17- 221.17-239.17-267.17-286.18
189	15.36 et17.04	307.29	185.09-235.09-289.09
200	15.59 et 16.15	207.32	163.09
201	15.78	119.42	74.83-75-76.83-76.92-91.83-92-92.09-93-100.92
202	15 .87 et 19.70	337.09	163-191
203	16.04 et 16.76	481.13	161-437.01
204	16.09 et 16.61	482.11	161-437.10
205	16.30 et 16.18	438.14	393.09
206	16.44 et 16.59	520.29	245.09-440.18
207	16.50 et 16.53	440.29	245.09
208	16.50 et 16.58	344.18	328.09
209	16.56 et 16.73	793.44	704.35
210	16.64 et 18.66	352.11	336.01
211	16.81 et 16.87	704.16	415.01-541.10-577.10-659.10
212	16.99 et 17.16	271.25	150.92-176.92

213	17.05 et 24.96	293.30	96.92-221.09-236.09-293.18
214	17.72 et 32.39	228.34	180.09-188.84-228.09
215	18.26 et 31.31	239.20	157.09-179-195.09-209.01-221.17-239.09-240.09
216	18.58	133.38	91
217	18.78 et 23.43	311.30	183 -311.18
218	18.95 et 28.08	199.31	155-180.92-199.09-200.09
219	18.98 et 32.1	404.30	228.09- 344.18
220	19.18 et 32.39	380.27	381.26
221	20.71 et 21	313.29	171.09-183.09-201.01-277.17-295.18
222	20.83 et 21.76	297.16	183-297.09
223	21.20 et 21.99	265.22	96.92-265.09
224	22.04 et 22.44	284.07	268.01- 283.09
225	22.38 22.97	312.23	183 -311.18
226	23 et 24.93	325.23	183-325.18
227	23.55 et 26.52	382.31	381.18
228	23.63 et 34.21	381.31	338.18- 381.18
229	23.69 et 24.48	326.30	325.18
230	24.99 et 28.02	458.26	192.92-422.18-457.18-459.26
231	25.02 et 29.34	773.52	277.17-513.26
232	25.19 et 25.78	340.28	339.26
233	25.89 et 39.99	935.59	277.17-343-379.09-572.18-657.27-899.44
234	26.31 et 32.69	227.43	227.17 – 228.09
235	26.34 et 27.90	460.29	192.92-424.18-459.26
236	26.42 et 39.99	936.57	270.92-343-379.09-572.26-658.27-900.44
237	27.32 et 27.84	468.25	193-422.18-469.26
238	27.93 et 33.47	981.56	657.27-935.53
239	28.18 et 38.42	819.52	277.17-513.26-773.52-819.44-.
240	28.21 et 36.29	256.34	256.17-257.17
241	28.60	300.38	253.26-281.26-300.18
242	28.63 et 33.81	253.47	209.09-235.17-253.17
243	28.87 et 38.80	815.58	559.26-816.44
244	29.14 et 36.54	712.60	255.17-277.17-532.43-550.43
245	29.49 et 36.17	281.39	281.26
246	29.79	833.55	277.17-391.17-553.18-773.44-815.44-
247	29.96 et 30.52	713.58	255.17-277.17-533.43-551.43
248	30.05 et 36.50	748.61	712.52
249	30.49 et 39.98	785.54	422.18-749.44
250	31.31 et 35.35	913.59	277.17-379.09-635.35-675.27
251	31.34 et 32.49	530.38	265.01-494.18-529.35
252	31.58 et 32.83	914.58	277.17-379.09-636.35-658.27
253	31.58 et 32.86	831.53	255.17-277.17-391.43-553.26-575.18-832.44
254	31.96 et 32.76	959.60	635.35-913.53
255	32.43 et 39.98	787.58	422.18-624.93-751.44
256	32.46 et 38.20	749.58	422.18-713.44
257	32.65-32.72	268.44	236.26-268.26

258	32.69 et 39.99	786.68	422.18-624.98-750.44
259	33.05 et 33.24	254.35	235.17-254.17-255.17
260	33.12 -33.47	971.58	277.17-379-397.09-415.09-657.27-935.53
261	33.28 et 38.48	811.64	277.17-630.52-743.44-811.52-
262	33.38 et 38.36	820.63	277.17-513.26--774.44-819.44-
263	34.53 et 38.52	899.57	270.92-343-572.18-670.27
264	33.75 et 37	750.60	423.18-712.52
265	33.77 et 34.50	279.37	216.17-279.18
266	34.99 et 35.04	426.45	383.18
267	35.32 et 37.59	900.56	270.92-343-573.18-671.27
268	35.70 et 37.15	816.60	559.26- 816.44
269	36.45	282.38	282.18
270	36.78 et 39.81	745.62	281.25-509.26
271	37.59 et 39.99	937.52	270.92-343-572.18-598.26-670.27-901.44
272	38.17 et 40	812.60	277.17-553.26-743.44-752.52-813.52
273	38.18	1005.81	255.34-749.61-785.53
274	38.55 et 40.00	788.65	422.18-625.93-698.02-750.44-789.19
275	38.58 et 39.11	938.50	270.92-343-573.18-599.26-671.27-900.44
276	39.08 et 39.94	863.60	270.92-369.01-500.18-598.26-827.44
277	39.21 et 40	1190.74	369-500.17-598.26-827.44-1154.70
278	39.31 et 39.81	857.61	265-452.34-494.18-520.26-821.44
279	39.78 et 40	1192.62	369-500.17-598.18-827.44-1156.62
280	39.91 et 39.94	1191.74	369-500.17-599.26-828.44-1155.70

Tableau 7 : Résultats de dépouillement détectés par LC-MS au sein de l'extrait aqueux des brindilles de *Thymelaea hirsuta* en mode positif.

N°	Temps de rétention	MS	Fragmentation MS-MS ou MS2
1	0.01 et 15.70	173.06	114.92 -131.84-132.84
2	0.01 et 22.61	185.11	143-167
3	0.02 et 20.29	139.06	97.92-120.92
4	0.02 et 20.67	239.11	89-111-133-151-177-221
5	0.02	126.03	84.92
6	0.04	114.05	93.92
7	0.05 et 3.94	118.11	59-72-97
8	0.11 et 20.26	209.04	168
9	0.13 et 0.78	143.06	69-84.92-101.92
10	0.40 et 2.79	217.05	155-173-199.01
11	0.80 et 1.07	123.09	81.92
12	0.86 et 1.05	151.08	109.92
13	0.88 et 1.06	124.11	83-83.92

14	0.89 et 1.04	125.13	84
15	0.95 et 0.99	128.15	109.92
16	1.02 et 2.85	154.14	111-112.92-133.42-135.92
17	1.05 et 1.73	251.14	215.09 -233.09-234.01
18	1.07 et 2.01	189.20	116-130-144-158-172
19	1.08 et 1.79	175.18	60.08-116-130-158
20	1.08 et 14.85	266.18	87-104.09-222.84-248.09
21	1.10 et 1.14	171.05	109- 115-126.92-153.92-162
22	1.11 et 1.18	221.18	104.09-162.84
23	1.12 et 1.16	156.09	110.09-112-137.92
24	1.14 et 1.16	176.06	131.92
25	1.14 et 1.68	138.15	96.92 – 120.92
26	1.16 et 1.26	247.21	104.09 -118-229.01
27	1.18 et 1.50	116.22	70 -69.22
28	1.18 et 13.88	395.15	359.18-377.18-378.09
29	1.20 et 1.57	144.19	70-84-98
30	1.52 et 9.93	229.16	70-142-211.01
31	1.24 et 1.53	130.19	84-112
32	1.59 et 1.72	223.14	130.92
33	1.61 et 1.88	132.18	86.08
34	1.74 et 1.84	241.14	84-128-144-196.01
35	1.75	225.13	72.08 -208.01
36	1.77 et 1.86	137.12	96.92- 115.92-118.92
37	1.82 et 1.90	152.14	121- 134
38	1.86	190.07	60.08 -74-98.92-116-130-144-158-172.09-181.01
39	1.87 et 2.03	170.15	152
40	2.06 et 2.65	166.18	120
41	2.08	112.23	81 -88-94-103
42	2.10 et 2.87	249.01	230.92
43	2.24 et 15.66	167.11	120 -121-139.09-150
44	2.25 et 2.52	120.20	93-99.50-103-110.92
45	2.59 et 2.72	233.08	215.01
46	2.87 et 4.46	305.15	287.01-305.09
47	2.89 et 2.96	157.16	115.92-138.92
48	2.99 et 6.51	277.12	175 -184.92-202.01-259.01
49	3.88 et 4.28	300.18	259.09 -283.09
50	3.23 et 14.15	205.10	188.01
51	3.54 et 3.78	188.13	146
52	3.79 et 4 .35	321.15	228.92-261.01-277.01-303.09
53	3.97 et 4.26	306.14	305.09
54	4.28 et 17.62	365.17	125.92-262.17-307.18-347.09
55	4.30 et 5.07	349.19	349.09-350.09
56	4.49 et 4.51	275.15	121-233.92-257.01-275.09
57	4.53 et 5.03	344.23	327.18
58	4.80 et 4.92	366.19	185-235.01-307.01-321.01-348.09-357.01

59	4.83 et 4.94	350.18	349.09-350.09
60	4.96 et 4.99	291.17	199.01-233.01-245.01-273.01-282.01
61	5.05 et 5.37	319.16	227.01-301.01-319.09-320.09
62	5.10 et 5.72	393.22	393.18
63	5.14 et 6.31	463.16	204.92-266.01-415.10-433.10
64	5.38 et 5.65	409.20	341.18 -365.09-391.09-400.01
65	5.40 et 5.65	388.24	371.18
66	5.52 et 5.58	371.27	133-177-221.01-265.09-283.09-327.09-353.09
67	5.67 et 10.98	617.13	581.10-599.10
68	5.70 et 7.64	345.01	354.01
69	5.72 et 9.76	595.20	457.10-529.10-559.10-577.10
70	5.75 et 6.04	363.19	317.01-363.18
71	5.82 et 21.52	437.26	303.01-437.18
72	5.99 et 21.48	453.22	186.92-281.01-384.84-435.10
73	6.06 et 6.20	432.28	415.18
74	6.27 et 6.57	333.20	315.01-333.09
75	6.31 et 6.74	481.27	481.18
76	6.38 et 6.50	561.18	351.09 -399.09
77	6.52 et 8.19	591.18	429.09 -561.10
78	6.54 et 6.68	476.34	459.18
79	6.55 et 12.81	497.26	302.01-371.01-467.10-479.10
80	6.74 et 6.78	211.16	94-119-167-169.92-181.01-190.92-193.01
81	6.79 et 7.21	525.29	525.18
82	6.81 et 7.09	633.19	513.01-543.02-573.02-615.10
83	6.84 et 7.07	618.17	497.10-581.10-599.10
84	6.94 et 7.06	596.18	458.01-530.10-560.10-578.10
85	7.02	1211.23	507.10-595.19-617.10-633.10-1211.21
86	7.12 et 7.57	523.02	360.93-505.01
87	7.14	520.37	185.17-273.17-323.09-377.26-491.18-507.10-
88	7.24 et 7.53	508.09	345.01
89	7.24 et 8.16	273.20	215.01-255.01-273.09
90	7.26 et 7.43	282.67	262.01-270.92
91	7.28 et 7.39	765.24	441.09-603.18
92	7.34 et 15.84	323.08	251.01-277.01-279.01-305.01-323.01
93	7.46 et 7.60	569.27	523.02-569.27
94	7.48 et 7.58	307.13	232.01-276.01
95	7.60 et 7.82	621.18	381.01-395.01-459.10-591.10
96	7.65 et 7.98	613.35	613.27
97	7.65-15.05	608.38	410.09-577.10-591.27
98	7.84 et 7.97	629.33	467.01-570.28-611.18-629.27
99	7.85	689.25	185.09-273.17-413.10-613.27-629.27-689.19
100	7.99 et 8.34	657.35	657.35
101	8.01 et 8.30	652.41	635.35
102	8.02	195.12	89-133-153.92-174.42-177.09-186.01-195.01

103	8.04	691.28	185.17-273.17-355.18-433.18-657.36-691.19-817.28
104	8.06 et 8.28	673.36	511.10-655.19-673.27
105	8.21 et 8.39	391.22	184.92-228.92-373.09-391.18
106	8.30 et 8.45	675.27	317.01-381.01-543.10-645.10-657.10
107	8.31et 8.36	403.20	205.92-355.01-385.09
108	8.35 et 8.63	696.47	679.35
109	8.36 et 8.66	701.41	490.10-701.35
110	8.41 et 8.61	717.35	492.10-687.19-717.27
111	8.61 et 11.27	429.15	232.01-398.10
112	8.66 et 8.90	740.49	579.18-723.35
113	8.67 et 26.85	399.19	202-351.01-381.09-399.18
114	8.78 et 8.85	745.41	745.36
115	8.83 et 9.40	400.14	202-351.09-384.01
116	9.01 et 22.97	415.17	397.01-415.18
117	9.05 et 24.34	401.21	392.68-401.26
118	9.33 et 10.39	603.19	309.01-317.01-441.09-483.09
119	9.47 et 9.66	604.24	309.01-395.09-441.09-573.10
120	9.52 et 25.99	619.20	419.18-619.35
121	9.64 et 22.31	431.18	287.09-431.18
122	9.73 et 12	655.23	204.92-415.09-429.09-459.09-607.18-625.18-637.19
123	9.74 et 10.31	625.22	204.92-415.09-429.09-577.18-595 .18
124	9.81 et 21.11	155.07	113.92
	9.88 et 22.90	459.24	228-232-249.01-411.10-429.10-459.26
125	9.95 et 10.07	626.26	204.92-415.09-429.09-577.10-595.18
126	10.02 et 10.14	460.19	228-232-249.01-411.10-429.10-
128	10.07 et 10.44	345.08	114.92 -211.01-253.09-287.01-327.09-345.09
129	10.17 et 10.91	557.16	395.01
130	10.29 et 10.84	573.10	411.01 -492.01
131	10.34 et 10.81	558.15	395.01
132	10.46 et 10.74	552.20	355.01-373.01-
133	10.64	287.18	205.92-277.93-355.01-410.93
134	10.67	574.15	557.10-573.10
135	10.69- 10.86	631.18	317.01-337.01-499.10-613.10
136	10.76-10.79	632.21	317.01-337.01-499.01-613.10
137	10.80 et 11.31	602.16	307.01-317.01
138	10.83 et 11.16	601.17	307.01-317.01
139	10.86 et 12.16	579.23	285.01
140	10.88 et 22.15	285.08	270.01 -285.01
141	11.10 et 11.19	430.15	232.01-398.10
142	11.14 et 11.71	457.19	232-303.01-409.10-427.10-439.10
143	11.18 et 28.37	385.18	185.92-385.26
144	11.22 et 32.21	685.24	340.92-355.01-430.01-459.09-655.19-686.44
145	11.26 et 11.43	471.16	184.92-308.92-351.01
146	11.26 et 12.11	427.18	232.01-397.09-409.10
147	11.34 et 11.68	581.26	384.29-533.18-563.18

148	11.46 -20.49	397.19	182.92-237.01-379.01-478.27
149	11.48 et 11.74	777.35	384.09-397.09-428.09-581.18-729.19-759.27
150	11.59 et 11.66	499.16	337.01
151	11.67 et 12.06	469.15	307.01
152	11.73 et 19.14	470.14	307.01-453.26
153	11.76	485.08	285.09-469.18-579.19-
154	11.79	915.15	285.09-469.18-579.19-
155	11.81 et 11.83	447.14	285.01
156	12.10	381.18	185.17 -341.18-381.09-427.18-579.27-683.27-701.19-851.29-
157	12.12 et 12.65	683.27	456.09-520.93-653.19-683.35
158	12.19 et 12.43	527.17	216.92-247-302 .01-371.01-401.09-497.10
159	12.28 et 15.75	667.17	440.09-505.01-635.19
160	12.33 et 13.68	668.14	440.09-505.01-619.18
161	12.38 et 12.61	483.16	188.92-321.01-465.01
162			
163	12.51 et 12.53	653.28	427.09-456.09-605.10-623.10-635.10-653.27
164	12.63 et 12.76	571.19	409.01
165	12.65 et 15.15	607.25	410.09-599.10-577.10
166	12.80 et 14.44	623.23	412.09-427.01-453.10-575.10-593.10-605.10-623.27
167	12.83 et 26.69	443.18	232-443.26
168	12.88 et 14.03	681.17	619.10
169	12.93 et 13.11	441.17	245.01 -411.10-425.10
170	12.97 et 14.42	609.23	397.01-412.09-579.18
171	12.98	440.17	185.17-270.09-443.18-609.27-681.19-859.36
172	13 et 13.02	270.25	249.51
173	13.07 et 13.12	140.08	96- 98.12
174	13.11 et 14.37	577.26	380.01-393.09-529.10-559.10
175	13.30 et 13.38	669.29	429.09-443.09-459.09-623.10-639.19
176	13.35 et 24.48	357.27	321.09-357.18
177	13.45et 15.18	833.30	409.09-439.09-453.09-467.09-637.18-785 .19
178	13.60 et 18.05	353.14	178.92-191.92-335.18-338.01-353.01
179	13.80 et 14.29	351.25	235.09 -281.09-333.18
180	13.82 et 14.70	637.30	410.09-440.09-589.10-607.10
181	13.87et 13.98	893.35	439.09-453.09-667.18-845.27
182	13.90 et 14.10	638.28	410.09-440.09-589.10-607.18
183	14 et 14.22	367.23	211-237.01-251.01-297.01-331.09-349.09
184	14.17 et 14.79	863.35	439.09-453.09-667.18-815.19-833.19
185	14.25	864.37	185.17-351.26-607.27-863.28-
186	14.55 et 15.08	834.32	439.09-453.09-467.09-637.18-785.19-803.19
187	14.84 et 14.91	355.24	301.01 -337.18-338.18
188	15.08 et 15.17	417.17	167-233.01-387.09
189	15.11 et 15.36	205.72	185.01
200	15.13 et 32.28	369.28	239.09-252.09-326.18-351.09-369.26
201	15.20 et 15.27	699.47	333.09-369.09-667.19

202	15.20 et 21.73	354.27	103-175-315.18
203	15.45 et 15.54	635.25	371.01-401.01-410.09-605.10
204	15.64	279.22	235.01-238.01-247.09-261.09-279.18
205	15.68 et 32.82	368.32	252.09-326.18
206	15.81 et 16.11	311.28	293.18
207	16.13 et 16.37	505.14	383.09-405.18-436.85-447.18-505.27
208	16.18 et 20.88	302.25	184.17-260.17
209	16.26 et 16.56	271.21	225.01-240.17-253.09-271.09-325.09
210	16.46 et 18.23	309.24	268.09- 290.18
211	16.62 et 16.83	325.20	289.09 -307.09-323.09
212	16.63 et 17.12	375.08	319.93-347.93-357.09
213	16.72 et 18.88	310 .20	292.18
214	17.40 et 17.89	186.23	57- 71.08- 85.08-144-168
215	17.44 et 17.55	240.24	95-109- 154-183.09-240.17
216	17.44 et 17.55	343.30	240.17
217	18.02 et 25.97	614.37	227.09-358.17-542.27-586.27-597.35
218	18.34 et 18.39	455.28	295.09 -383.09
219	18.95 et 22.38	387.27	387.18
220	19.03 et 19.28	475.31	331.09 -475.26
221	19.09 et 19.23	519.33	375.09-519.27
222	19.16 et 19.18	563.36	419.18-563.27
223	19.97 et 27.87	446.27	216.92-404.10-445.26
224	20.47 et 21.43	256.78	126.92 -236.09
225	20.52 et 21.59	169.26	127.92- 148.50
226	21.02 et 32.28	328.30	117-286.17
227	21.50 et 21.94	359.26	359.18
228	21 .59 et 21.78	360.24	359.18
229	21.62 et 21.66	405.29	103-175-337.18-387.18-478.27-500.27
230	22.59 et 25.58	233.82	192.84 – 213.01
231	22.63 et 22.68	547.35	375.18 -547.27
232	22.66 et 22.80	503.35	503.09-503.27
233	22.82et 24.64	313.28	272.09 -295.09-313.18
234	23.17 et 33.01	337.27	209.01-281.09-319.09-337.26
235	23.27 et 24.84	269.26	169-222.09-269.26-270 .26
236	23.70 et 23.73	616.48	459.18 -599.35
237	23.82 et 23.84	572.45	415.18-555.35
238	23.89-23.96	528.41	371.18-511.35
239	23.91 et 23.93	533.36	533.27
240	23.98 et 24.07	489.39	489.26
241	24.03 et 24.05	484.41	467.26
242	24.07 et 24.23	445.35	445.26
243	24.96 et 25.13	242.09	85.08-221.01
244	25.07 et 39.99	493.55	493.51
245	25.65 et 25.72	702.50	227.09-359.17-685.44
246	26.01et 26.17	575.42	375.18-575.35

247	26.16 et 26.35	531.39	331.09-531.27
248	25.36 et 32.11	286.29	242.17
249	25.74 et 25.85	663.46	463.18-663.35
250	26.33 et 26.51	487.39	487.26
251	27.23 et 27.69	301.18	245.01-259.09
252	27.93 et 28.15	295.26	193-226.84-239.01-254.01-277.09-295.18
253	28.17 et 31.98	346.30	117-286.17-304.18-328.18
254	28.53 et 33.86	758.62	459.09-496.26-671.44-698.44-759 .52
255	28.57et 31.06	775.59-	497.26-519.26-774.44
256	32.24 et 40.00	845.51	616.35-634.35-846.44
257	32.26 et 36.14	494.60	493.51
258	32.30 et 36.33	773.52	544.26 -562.26-774.44
259	32.85 et 39.97	731.54	607.35-663.44
260	34.77 et 39.58	732.53	608.35-664.44
261	36.21 et 39.98	1178.74	949.53-967.53-1179.62
262	36.73 et 38.12	733.50	328.17-364.17-462.18-480.18-665.44-733.52
263	39.37et 39.99	1179.72	949.53-967.53-1179.70
264	39.85 et 40	1100.75	871.52-889.52-1101.70