

# République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présentée par

**Bensikaddour Hafidha**

**Bachkat Samia**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER**

**Spécialité: VALORISATION DES SUBSTANCES NATURELLES**

**VÉGÉTALES**

**THÈME**

**Etude phytochimique et activité biologique de  
mélange (feuilles, fleurs et brindilles) de  
*Thymelaea hirsuta*.**

DEVANT LE JURY

Président	M Ghelamellah Amine	M.C.B U. Mostaganem
Encadreur	M Bouzouina Mohamed	M.C.A U. Mostaganem
Examineur	M Debba Mohamed El-Bachir	M.A.A U. Mostaganem

*Année universitaire : 2016/2017*



## *Remerciements*

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant,  
pour nous avoir donné la force et la patience.

Nous exprimons d'abord notre profonds remerciements et notre vive  
connaissance à M **Bouzouina Mohammed**, pour avoir encadré et dirigé ce  
travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseil et la  
confiance qui nous avons été accordée nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous adressons notre sincère remerciement à M **Dabba mohamed El- Bachir**  
et M **Ghelamellah Amine** qui ont fait l honneur d'être dans les jurys de notre  
soutenance.

Nous remercions tout le personnel de laboratoires pédagogiques M **Redouane** et  
M<sup>elle</sup> **Rachida** et toute personne qui a participé de près ou de loin, directement  
ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Et tous la promotion de valorisation des substances naturelles végétales

2016-2017

# *Dédicace*

*J'ai L'honneur de dédier ce travail tous d'abord à mon pays.*

*A mes très chers parents qui m'ont soutenu et encourager durant toute la période de mes études et se qui je souhaite une longue et heureuse vie, que dieu les protège et me donne la force pour que je puisse leurs rendre un petit peu de leurs bien faits malgré que je ne peux jamais arriver à faire ça.*

*A toute la famille Bachkat.*

*A mes très chères sœurs : Hadja, Kheira.*

*A mes chers frères : Saddam, Idriss, Cherif.*

*A ma très chère binôme Hafida et sa famille.*

*A mes chères amies et à tout qui me connaisse.*

*A tous ceux qui j'aime de loin et de prés.*

*A tous ma promotion de valorisation des substances naturelles  
végétales.*

*2016-2017.*

**Samia**

# *Dédicace*

*Avant tout grâce à dieu que je suis arrivé là.*

*Je dédie ce mémoire à:*

*Mes parents*

*A mon cher père qui a toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique monde de labeur et de persévérance. J'espère qu'il trouvera dans ce travail toute ma reconnaissance.*

*A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi maman toutes mes joies, et ma reconnaissance.*

*A mes chères sœurs : kheira, Hadja, djamaia.*

*A mes chères frères : Omar et sa femme Kebayli Hadja, Saleh, Hamou. Pour leur soutien moral et leur sacrifice le long de ma formation.*

*A toutes mes amis(e)*

*A mon chère amie, mon binôme Samia et toute la famille*

*Bensikaddour*

*A tous ceux que j'aime de loin et de près.*

*A toute ma promotion Valorisation des substances naturelles végétales.*

**2016-2017**

***Hafida***

## Résumé

*Thymelaea hirsuta*, plante médicinale, constitue une source de métabolites secondaires. L'intérêt de ce travail est de déterminer la période de sa récolte, par l'estimation de la disponibilité des composés phénoliques et l'évaluation de leur potentiel antioxydant. Des lyophilisats méthanoliques et éthanoliques ont été issus d'un mélange feuilles/fleurs/brindilles prélevé chaque mois, d'une manière aléatoire. Les composés phénoliques et l'activité antioxydante (DPPH et ABTS) des extraits ont été dosés photométriquement. L'étude quantitative a révélé l'abondance des composés phénoliques totaux ( $280,67 \pm 1,41$ ) et des flavonoïdes ( $507,75 \pm 12,6$  mg/g. Lyo.), lors du mois d'avril. De même, l'activité antioxydante a confirmé la puissance du lyophilisat éthanolique du mois d'avril avec 35,49 et 45,84% d'inhibition du radical DPPH et ABTS à raison de 2mg/ml d'extrait, respectivement. Ces résultats justifient l'utilisation de cette plante lorsqu'elle récolté en fin de son cycle phénologique.

**Mots clés :** *Thymelaea hirsuta*, Mois, Composé phénolique, DPPH, ABTS.

**Abstract**

*Thymelaea hirsuta* is medicinal plant, is source of secondary metabolites of interest. This work was aimed to estimate the phenolic content, evaluate the antioxidant activity, before extraction the phenolic content were determined by photometry. The antioxidant activity was assessed by the method of scanning the radical DPPH and ABTS. Quantitative evaluation revealed the abundance of the phenolic content in the month April phenolic ( $280,67 \pm 1,41$ ), flavonoids ( $507,75 \pm 12,6$  mg/g.lyo). The antioxidant activity confirmed the ethanolic lyophilisate in the month April 35,49 and 45,84% inhibition the scanning radical DPPH and ABTS of extract 2mg/ml. This result is confirmed in utilisation this plant by finally cycle phenologic there recolt. .

Key words: *Thymelaea hirsuta*, month, the content of phenolic, DPPH, ABTS.

Introduction.....	1
Partie bibliographique	
Chapitre: plantes médicinales	
I-1) Plantes médicinales.....	2
I-1-1) Généralités.....	2
I-1-1) Généralités.....	2
I-1-2) Définition.....	2
I-1-3) Domaines d'application.....	2
I-2) Phytothérapie.....	3
I-2-2) Types de la phytothérapie.....	3
I-2-3) Avantages de la phytothérapie.....	4
I-2-4) Inconvénients de la phytothérapie.....	4
Chapitre II: Métabolites secondaires	
II) Métabolites secondaires.....	5
II-1) Alcaloïdes et composés azotés.....	5
II-2-1) Stéroïdes, Stérols et Terpénoides.....	5
II-3) Composés phénoliques.....	7
II-3-2) Tanins.....	8
II-3-3) Acides phénoliques.....	9
II-4) Relation entre métabolisme primaire et secondaire.....	10
Chapitre III: Thymelaea hirsuta	
III-Thymelaea hirsuta.....	12
III-1) Généralités.....	12
III-3) Description botanique.....	12
III-4) classifications botaniques.....	13
III-5) Classification phylogénétique.....	13
III-5-1) Classification phylogénétique des Thymelaeaceae.....	14
Chapitre IV: Activités biologiques	
IV) Activité antioxydant .....	15
IV-1) Stress et radicaux libres.....	15
IV-1-1) Généralités.....	15
IV-1-2) stress oxydatif.....	15
IV-1-2-1) Définition .....	15

IV-1-2-2) Origine du stress.....	15
IV-1-2-3) Conséquences du stress oxydant.....	15
IV -1-3) Les radicaux libres.....	16
IV-2) Les antioxydants.....	16
IV-2-1) Définition.....	16
IV-2-2) Mécanisme d'action.....	16
IV-2-3) Classification des antioxydants.....	17
IV-2-3-1) Les antioxydants d'origine végétale.....	17
IV-2-3-2) Les antioxydants enzymatiques.....	18
Partie expérimentale	
Chapitre V: matériels et méthodes	
V-Matériels et Méthodes.....	19
V-1) Matériels.....	19
V-1-1) Drogue végétale.....	19
V-1-2) Produits chimique utilisé.....	20
V-1-3) Réactifs chimique utilisé.....	20
V-1-4) Appareillages et les instruments de laboratoire utilisée.....	20
V-2) Méthodes.....	21
V-2-1) Extraction .....	21
V-2-1-1) Macération /filtration .....	21
V-2-1-2) évaporation.....	21
V 2-1-3) lyophilisations.....	22
V-2-2) Etude quantitative.....	22
V-2-2-1) : Rendements des extraits.....	22
V-2-3) Analyse phytochimique.....	22
V-2-3-1) Quantification des composés phénoliques totaux.....	22
V-2-3-2) Quantification des flavonoïdes.....	23
V-2-3-3) Quantification des flavonols.....	23
V-2-3-4) Quantification des Tanins.....	23
V-2-4) Evaluation in vitro de l'activité antioxydant .....	24
V-2-5) Analyse statistique.....	25
Chapitre VI: Résultat et discussion	
VI) Résultats et discussion.....	26
VI-1) Rendements.....	26

VI-2) Analyse quantitative.....	27
VI-2-1) Détermination des composés poly phénols totaux.....	27
VI-2-2) Détermination des Flavonoïdes totaux .....	31
VI-2-3) Détermination des Flavonols .....	34
VI-2-4) Détermination les Tanins.....	37
VI-3) Activité antioxydant par le test DPPH et ABTS.....	40
VI-3-1) Corrélation entre l'activité antioxydants et les composés phénoliques.....	
VI-3-2) Corrélation entre l'activité antioxydants dans les extraits méthanoïques et éthanoïques de mélange (Feuilles, Fleurs et Brindilles) de <i>Thymélaea hirsuta</i> .....	43
Conclusion	
Conclusion et perspectives.....	44

<b>Figure1</b> : Structure générale des saponosides .....	6
<b>Figure2</b> : structure générale de flavonoide.....	7
<b>Figure 3</b> : structure générale de coumarine.....	9
<b>Figure4</b> : Relation entre métabolismes primaire et secondaire.....	11
<b>Figure5</b> : vue générale de la plante médicinale de <i>Thymelaea hirsuta</i> .....	13
<b>Figure 6</b> : les étapes des préparations le poudre fine de la plante <i>Thymelaea hirsuta</i> .....	19
<b>Figure7</b> : Vue de l'extrait brut filtré.....	21
<b>Figure8</b> : méthode de l'évaporation.....	21
<b>Figure 9</b> : Teneurs des rendements des extraits de <i>Thymelaea hirsuata</i> (le mélange).....	26
<b>Figure 10</b> : courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	27
<b>Figure 11</b> : Répartition mensuelle des composés phénoliques totaux. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).....	28
<b>Figure 12</b> : Teneurs en composés phénoliques par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $p < 0,05$ ).....	29
<b>Figure 13</b> : Teneurs comparative en composés phénoliques totaux du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )) .....	30
<b>Figure 14</b> : courbe d'étalonnage de Rutine.....	31
<b>Figure 15</b> : Répartition mensuelle des flavonoïdes. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).....	32
<b>Figure 16</b> : Teneurs en flavonoïdes par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, $p < 0,05$ ).....	33
<b>Figure 17</b> : Teneurs comparative en flavonoïdes du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ ))...	33
<b>Figure 18</b> : courbe d'étalonnage de rutine.....	34

**Figure 19** : Répartition mensuelle des flavonoïdes. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, (p< 0,05).....35

**Figure 20** : Teneurs en flavonoïdes par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, p< 0,05)..... 36

**Figure 21** : Teneurs comparative en flavonols du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, (p< 0,05)...36

**Figure22**: courbe d'étalonnage de Catéchine.....37

**Figure 23** : Répartition mensuelle des tanins. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, (p< 0,05).....38

**Figure 24** : Teneurs en tanins par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, p< 0,05).....39

**Figure 25** : Teneurs comparative en tanins du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, (p< 0,05).....39

<b>Tableau 1:</b> Exemples de plantes médicinales souées d'activité antioxydante.....	17
<b>Tableau 2:</b> Rendements (%) des extraits méthanoliques et éthanoliques du mélange (feuilles/fleurs/brindilles) de <i>Thymélaea hirsuta</i> L.....	26
<b>Tableau 3 :</b> Répartition mensuelle des composés phénoliques totaux.....	28
<b>Tableau 4 :</b> Teneurs en composés phénoliques totaux, par solvant de <i>T. hirsuta</i> .....	29
<b>Tableau 5 :</b> Répartition mensuelle des flavonoïdes. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).....	31
<b>Tableau 6 :</b> Teneurs des flavonoïdes par solvants de <i>T.hirsuta</i> .....	32
<b>Tableau 7 :</b> Répartition mensuelle des flavonols. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).....	34
<b>Tableau 8 :</b> Teneurs des flavonols par solvants de <i>T.hirsuta</i> .....	35
<b>Tableau 9 :</b> Répartition mensuelle des tanins. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).....	37
<b>Tableau 10:</b> Teneurs des tanins par solvants de <i>T.hirsuta</i> .....	38
<b>Tableau 11 :</b> les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par test ABTS à différentes concentrations des extraits méthanoliques.....	41
<b>Tableau 12:</b> les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par test ABTS à différentes concentrations des extraits méthanoliques.....	41
<b>Tableau 13 :</b> les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par test DPPH à différentes concentrations des extraits méthanoliques.....	42
<b>Tableau 14 :</b> les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par test DPPH à différentes concentrations des extraits méthanoliques.....	43
<b>Tableau 15:</b> Coefficient de corrélation Pearson (r) entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par test DPPH.....	43
<b>Tableau 16:</b> Coefficient de corrélation Pearson (r) entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par test ABTS.....	43
<b>Tableau 17:</b> Corrélation entre les activités antioxydantes (DPPH et ABTS) des extraits éthanoliques de mélange <i>Thymélaea hirsuta</i> .....	44
<b>Tableau 18:</b> Corrélation entre les activités antioxydantes (DPPH et ABTS) des extraits méthanoliques de mélange <i>Thymélaea hirsuta</i> .....	44

**Liste des abréviations**

**g** : gramme.

**Mg** : milligramme.

**ml** : millilitre.

**%** : pourcent.

**µl** : microlitre.

**ER** : équivalent rutine

**EAG** : équivalent acide gallique.

**°C** : degré Celsius.

**Lyo** : lyophilisat.

**EC** : équivalent catéchine

**DPPH** : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl.

**ABTS** : acide 2,2-azinobis (3-éthyl-6 benzothiazolium sulfonique)

**R<sup>2</sup>** : coefficient de corrélation.

**MS** : matière sèche.

## Introduction

De nos jours, dans de nombreux pays à travers le monde, les plantes aromatiques et médicinales ont connu une importante attention (Al-Tawaha,2014). En Algérie, de nombreux chercheurs se sont intéressés à étudier et à explorer les constituants bioactifs de leur métabolisme secondaire, pour leur utilisation prolongée en médecine traditionnelle (Ziani, 2015). *Thymelaea hirsuta*), communément appelée «Methane» en Algérie, est un arbuste à feuilles persistantes appartenant à la famille des " Thymelaeaceae ", originaire de la région Méditerranéenne, au nord de l'Europe centrale et l'est de l'Asie centrale.

La plupart des antioxydants isolés à partir des plantes sont des polyphénols. Dans cette famille, sont retrouvés une classe de métabolites secondaires reconnus responsable de ces nombreuses activités biologiques comme les flavonoïdes qui sont dotés d'activités antioxydantes, anti-inflammatoire, antiallergiques et anti-carcinogénèse (Bruneton, 2007).

*Thymelaea hirsuta* est utilisé dans de nombreuses régions du monde comme antiglycémiant (Brouham et al.,2007), purgatif dans le traitement des rhumes des brebis au médecine vétérinaire, hypertension et comme antiseptique (Huang et al., 2005).

En Algérie, plus précisément dans les régions paysannes de l'ouest algérien, *Thymelaea hirsuta* est traditionnellement utilisées pour le traitement des infections cutanées et elle s'avère efficace. Ainsi, les utilisateurs s'intéressent à la collecte de cette plante à la fin de son cycle phénologique (Avril).

L'objectif principal de ce travail vise apporter de nouvelles informations sur la Biochimie des métabolites secondaires et leur activité biologique et de justifier par conséquent sa période de récolte. Pour se faire, différents extraits méthanoliques et éthanoliques, préparés le long de la période de floraison de *Thymelaea hirsuta* ont été préparés.

Deux investigations ont été réalisées :

- La première a été basée, principalement, sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques totaux, les flavonoïdes, les flavonols et les tanins.
- Le second aspect a été consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante *vis-à-vis* du radical libre DPPH et ABTS, afin de déterminer l'efficacité de chacun des extraits et d'établir la relation pouvant exister entre l'évolution des composés phénoliques et cette dernière.

## **I-1) Les plantes médicinales**

### **I-1-1) Généralités**

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remède pour les maladies humaines, parce qu'elles contiennent des composantes de valeurs thérapeutiques. En effet, depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments, grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. 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. L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations récoltées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement guérit le malade (Bruneton, 1993)

### **I-1-2) Définition**

La plante médicinale est toute plante possédant des propriétés agissant sur l'organisme humain ou animal de façon bénéfique. Les plantes médicinales sont utilisées en médecine naturelle. Généralement, seule une partie de la plante est utilisée, que ce soit le bulbe, les racines, les feuilles, les graines, les fruits ou les fleurs, pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (Cavin, 1999). Elles continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Fouché et Hambuché, 2000).

### **I-1-3) Domaines d'application**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mises à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composées on retrouve, dans une grande mesure, les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (Iserin, 2001). Ces produits sont utilisés en médecine conventionnelle en tant que médicaments pour l'homme : en urologie, dermatologie, gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, laxatifs, sommeil et désordres nerveux et pour les systèmes cardiovasculaires. Quant aux maladies du stress, des activités antioxydantes ont été prouvées avec le thé noir, le thé vert et le cacao qui sont riches en composés phénoliques.

En agriculture, les huiles de l'arbre *Azadirachta indica* ont des utilisations dans le contrôle de divers insectes et nématodes. Quand au domaine de l'alimentation, les épices et les herbes aromatiques utilisées sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table, considéré

Comme condiments et aromates. La popularité des épices et herbes aromatiques a été et reste très liée à leurs propriétés organoleptiques.

En cosmétique, de nombreux produits de beauté, parfums et articles de toilettes et produits d'hygiène sont à base de plantes.

## **I-2) La phytothérapie**

### **I-2-1) Définition**

La phytothérapie est une branche de la médecine qui repose essentiellement sur l'emploi thérapeutique de plantes dites « médicinales ». Consommées sous différentes formes, les plantes traitent ou soulagent différents troubles mineurs. Elles sont utilisées en complément d'une prise en charge médicale adaptée. (Favier, 2003)

### **I-2-2) Types de la phytothérapie**

Il existe plusieurs types de phytothérapie :

- **Aromathérapie** : Elle utilise les essences des plantes, appelées huiles essentielles. Ces substances aromatiques sont extraites par distillation. Il faut cependant utiliser l'aromathérapie avec précaution et respecter les doses prescrites. L'utilisation la plus fréquente est l'application par voie cutanée ;

- **Gemmothérapie** : Elle consiste à utiliser les extraits alcooliques et glycinés de jeunes pousses de végétaux ou de bourgeons. Ces extraits sont alors dilués au dixième pour pouvoir être utilisés en tant que plantes médicinales ;

- **Herboristerie** : Ce type de phytothérapie est le plus classique et le plus ancien. Elle se sert de la plante fraîche ou séchée, soit entière, soit en partie. Une préparation d'herboristerie repose sur des méthodes simples, le plus souvent avec de l'eau comme les infusions, les décoctions, les macérations et les gélules peuvent être également trouvées ;

- **Homéopathie** : Elle a recours aux plantes mais pas uniquement. Les plantes fraîches sont utilisées après une macération alcoolique ;

- **Phytothérapie chinoise** : Elle inclut l'acupuncture et la diététique chinoise. Elle vise à modifier les quantités et les actions des différentes énergies de l'organisme.

- **Phytothérapie pharmaceutique** : Elle utilise des produits d'origine végétale, obtenus après extraction et par dilution. Celle-ci consiste à se servir de doses suffisamment importantes de végétaux pour avoir une action soutenue et rapide. Les concentrations sont alors élevées, parfois proches de la limite assurant que le médicament n'est pas toxique pour l'organisme.

### **I-2-3) Avantages de la phytothérapie**

- Une médecine totalement naturelle ;
- Alternative aux médicaments "lourds" des laboratoires pharmaceutiques ;
- Peu d'effets secondaires ;
- Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car elles sont utilisées dans la fabrication des médicaments plus efficaces pour traiter des malades graves

### **I-2-4) Inconvénients de la phytothérapie**

- Les plantes comportent des dizaines de molécules qui interagissent entre elles, il est donc plus difficile de les mélanger ; deux organes d'une même plante peuvent même avoir des indications totalement différentes ;
- Certaines plantes sont plus riches en principes actifs l'été que l'hiver. Certains laboratoires mélangent alors les différentes récoltes. Les préparations peuvent alors dans les meilleurs des cas, ne pas contenir suffisamment de principes actifs et dans les pires des cas, en contenir trop, ce qui peut être toxique pour l'homme.

## II) Métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites secondaires par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les lipides et les glucides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces, ils semblent intervenir dans les relations qu'entretient la plante avec l'organisme vivant qui l'entoure. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. La relation entre les métabolites réside dans la production de petites molécules par le métabolisme primaire, constituant les molécules de départ pour les différentes voies du métabolisme secondaire (Bate-Smith, 1954).

Les différents types de métabolites secondaires se résument comme suit :

- Les alcaloïdes et composés azotés ;
- Les composés terpéniques ;
- Les composés phénoliques.

### II-1) Alcaloïdes et composés azotés

Les alcaloïdes sont des composés azotés, basiques qui s'extraient soit dans l'eau acide soit dans des solvants comme le chloroforme après alcalinisation. Ils précipitent généralement avec des réactifs iodométriques (réactif de Dragendorff) et sont très souvent biologiquement actifs. En effet, des molécules comme la quinine, des drogues (cocaïne), des anticancéreux (la vincristine et le taxol), des molécules utilisées comme poisons (strychnine) et des stimulants (caféine) peuvent être retrouvées. La plupart des alcaloïdes naturels sont d'origine végétale, essentiellement chez les angiospermes, avec encore des exceptions (lycopodine du lycopode, palustrine chez *Equisetum*) (Abdel-Hameed, 2009).

### II-2) Composés terpéniques

#### II-2-1) Stéroïdes, Stérols et Terpénoïdes

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoïdes 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) (Bahorumet al., 1997).

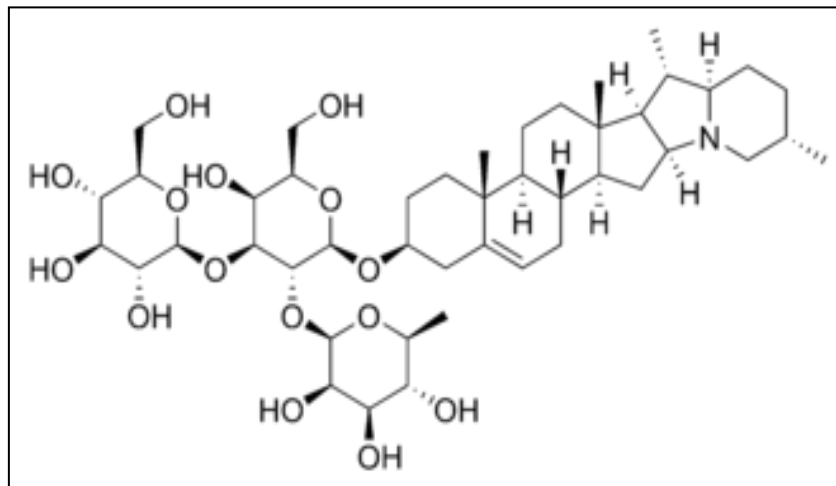
Les stéroïdes et les Terpénoïdes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes (Chang, 2002)

### II-2-2) Saponosides

Hétérosides formés d'une génine de type triterpène appelée sapogénine (Fig. 1), et de groupements osidiques. Il s'agit de composés souvent amers, aux propriétés tensioactives qui ont pu être mises à profit pour la confection de détergents. Ces molécules ont également la propriété d'affecter la stabilité membranaire par interaction avec le cholestérol membranaire. Par ailleurs, les saponosides sont également impliqués dans la résistance à des pathogènes (Crozier, 2006).

On distingue :

- **Les saponosides** : à géninetriterpéniquepentacyclique ;
- **Les saponosides** : à géninestéroïde ;
- **Les saponosides** : à alcaloïde stéroïdiens qui correspondent aux glucoalcaloïdes qu'on retrouve par exemple chez les Solanacées.



**Figure1:** Structure générale de saponosides

### II-2-3) Huiles essentielles

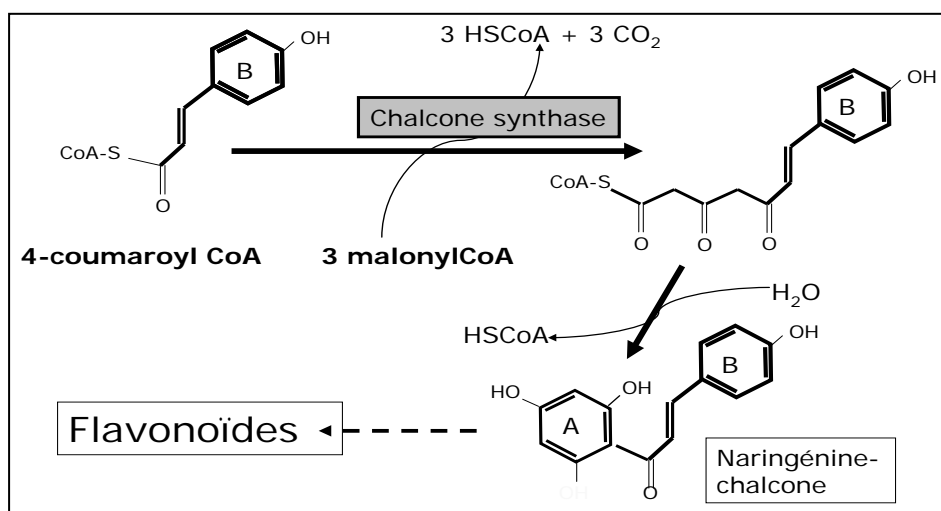
Les huiles volatiles, ou essences aromatiques végétales nommées huiles essentielles, renferment la "Quintaessentia", la fragrance de la plante, sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, totalement solubles dans les alcools, l'éther et dans les huiles végétales et minérales. Lorsqu'elles sont pures et naturelles, elles ne contiennent aucun corps gras : elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles, 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 (Djeridane, 2006).

### II-3) Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Harbone, 1993). La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester) (Ibn Tatou, 1991).

#### II-3-1) Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des dérivés phénylpropanoïdes solubles dans l'eau, souvent incolores ou jaunes (sauf exceptions dont les anthocyanes). Ces composés sont des dérivés de la naringénine-chalcone, elle-même issue de la condensation de trois résidus malonyl-CoA avec une molécule d'acide cinnamique. La structure de base comporte deux cycles aromatiques à 6 carbones joints par un hétérocycle à oxygène (Fig. 2). Les flavonoïdes constituent en eux même une famille de composés extrêmement vaste, jouant des rôles physiologiques importants (interactions Légumineuses/Rhizobium, filtres UV...)(Dixon, 1995).



**Figure 2:** Structure générale des flavonoïdes

On distingue les groupes des flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit

#### II-3-1-1) Flavones et flavonols

Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C<sub>5</sub> et en C<sub>7</sub>. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C<sub>4'</sub> ou di-substitué en C<sub>3'</sub> et C<sub>4'</sub> par des groupements OH ou méthoxyles (OCH<sub>3</sub>). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C<sub>3</sub> (Hennebelle, 2004).

### II-3-1-2) Flavanones et hydroflavonols

Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C<sub>2</sub> et le C<sub>3</sub> et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C<sub>3</sub> (Harbone, 1980).

### II-3-1-3) Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C<sub>3</sub> et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C<sub>4</sub>. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols). Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C<sub>3</sub> dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine. Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (Girotti-Chanus, 2006)

### II-3-1-4) Chalcones et aurones

Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le 17 cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone. Néanmoins, selon d'autres auteurs (Ghedira, 1999), la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes et plus précisément avec les anthocyanidols.

### II-3-2) Tanins

C'est une substance phénolique polymérique, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons. Ils présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. 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 (Formica et Regeson, 1995).

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 ellagitanins (Bruneton, 1993).

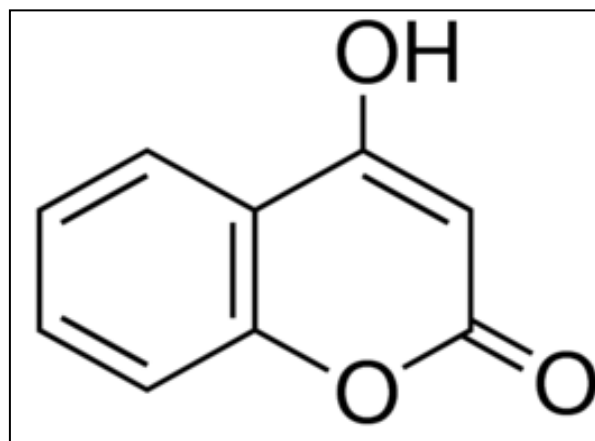
❖ **Tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols** qui se diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables, car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule, et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Bruneton, 1993).

### II-3-3) Acides phénoliques

Ce sont des 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 (Fluck, 1990).

### II-3-4) Coumarines

Ces composés issus de la cyclisation du résidu C<sub>3</sub> de dérivés du cinnamate. Sont souvent synthétisés en réponse à des attaques pathogènes. On parle de coumarines pour les dérivés du noyau de base qu'est la coumarine. Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques, ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (ex : la scopolétine qui s'accumule chez le tabac au cours de la réaction hypersensible). La coumarine est une molécule aromatique (au sens olfactif). Elle est présente sous forme glycoconjuguée (Fig 3) chez certaines graminées (ex : la flouve odorante) (Danelle et Puech, 1985).



. **Figure 3:** Structure générale de la coumarine

### II-3-5) Quinones

Les quinones sont des molécules très réactives, à noyaux aromatiques, avec deux substitutions cétoniques. Elles sont des composés qui régénèrent des radicaux libres, et par conséquent se complexent irréversiblement aux acides aminés nucléophiles des protéines. Elles sont ubiquitaires dans la nature, principalement dans le règne végétal et sont fortement réactifs (Hammiche, 1988).

### II-4) Relation entre métabolisme primaire et secondaire

Les jonctions entre métabolisme primaire et secondaire sont nombreuses et parfois complexes. Les principales sont synthétisées dans le schéma suivant (Fig. 4), qui indique également l'origine biosynthétique des principales phytohormones. Les étapes enzymatiques les plus représentatives sont :

- ❖ La phénylalanine ammonia lyase (PAL) qui initie la synthèse de la plupart des composés phénoliques à partir d'un acide aminé ;
- ❖ La chalcone synthase qui initie la synthèse des flavonoïdes à partir du malonylCoA et d'un élémentphénylpropane ;
- ❖ La voie mévalonate indépendante de biosynthèse de l'isopentényldiphosphate (IPP), à l'origine de la synthèse de plus grande partie des terpénoïdes.

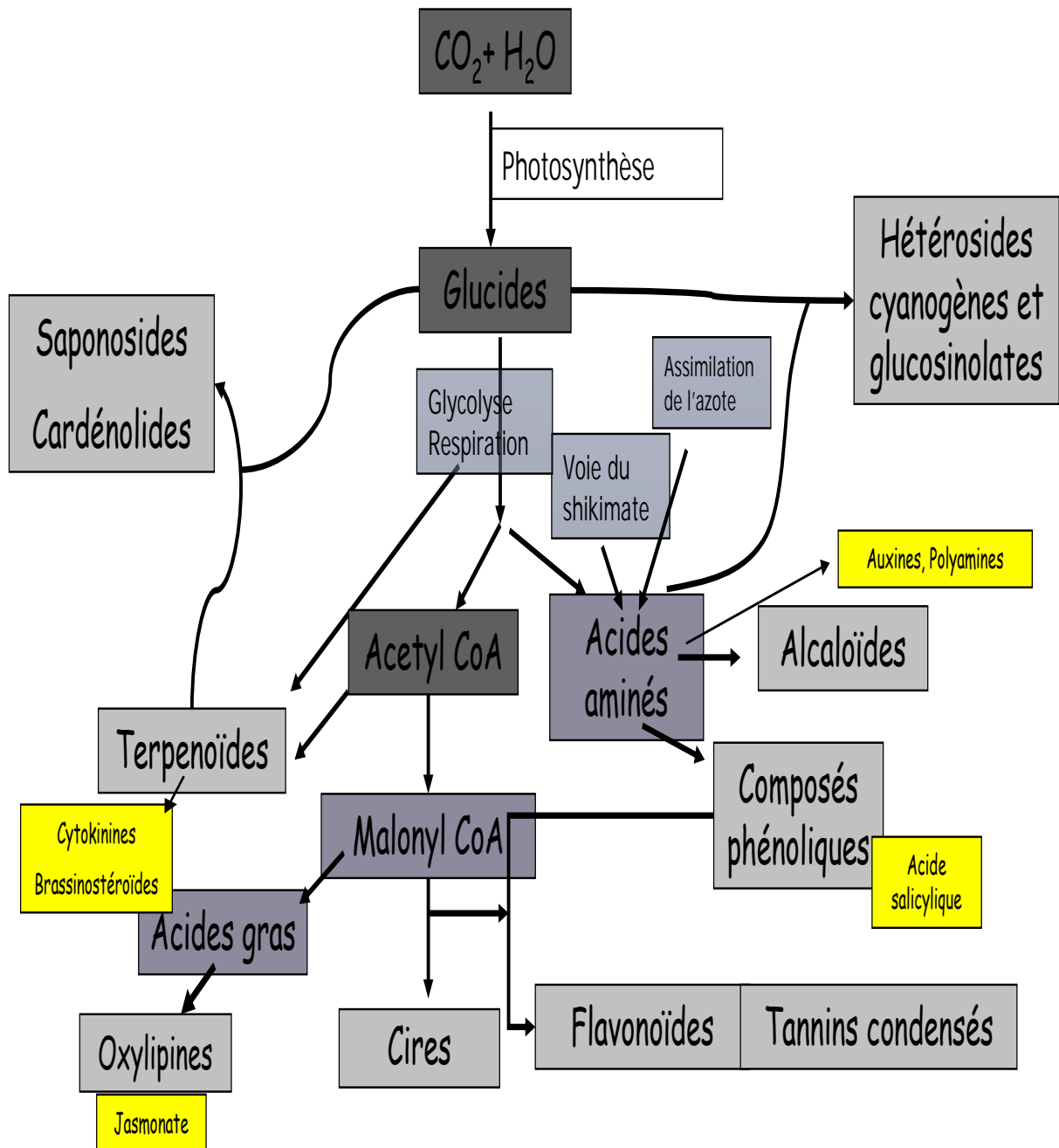


Figure 4 : Relation entre métabolisme primaire et secondaire.

### **III-*Thymelaea hirsuta***

#### **III-1) Généralités**

La famille des *Thymelaeaceae* comprend environ 500 espèces d'arbres et arbustes, généralement toxique. Elle est répartie dans toutes les régions tempérées et tropicales de planètes (Borri et Blasko, 1988).

Les membres de cette famille sont répartis particulièrement en Afrique, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids. Les *thymelaeaceae* sont réputées toxiques par leur teneur en esters de terpéniques de type tiglane ou daphnane, composés qui ont une distribution restreinte à deux familles seulement les *Thymelaeaceae* et les *Euphorbiaceae* (Farnsworth et al., 1986).

#### **III-2) Répartition géographique**

Le genre *Thymelaea* comprend 20 espèces que l'on trouve autour de la Méditerranée, et jusqu'en Asie centrale et Pakistan. Son aire de distribution est essentiellement circumméditerranéenne (sud de l'Europe, Sud-ouest de l'Asie, Afrique du Nord). Elle s'étend cependant à l'ouest au littoral atlantique du sud de l'Espagne, du sud du Portugal et du Maroc nord-occidental, En Afrique du Nord, la limite sud de son aire coïncide à peu près exactement avec la bordure du Sahara (Mohammedi, 2013).

#### **III-3) Description botanique**

*Thymelaea hirsuta* est une plante vivace, arbustive (Akrouf, 2011) et haute de 60 à 90cm sa tige droite est divisée en plusieurs rameaux portant de nombreuses inflorescences en forme de petit capitule, chacun d'eux est formé de 3-15 fleurs jaunâtres de diamètres variables, et sont rassemblées par 2-5 en glomérules et regroupées en deux types : unisexuées et hermaphrodites.

Elles sont petites 5mm environ. Les femelles ont un calice renflé, alors que chez les mâles est cylindrique. Les feuilles sont alternes, petites de 6mm environ, nombreuses, très rapprochées, ovales, aiguës presque imbriquées, vertes et glabres en dessus, blanches et cotonneuses à leurs faces inférieures. Les fruits de *thymelaeahirsuta* (Fig. 5) sont des baies glabres entourés d'un tube persistant et sont consommés par les animaux (Azza et Marnissi, 2012).



**Figure 5:** Vue générale de *Thymelaea hirsuta*. (Photo originale)

#### III-4) classifications botaniques

<b>Règne :</b>	Végétal
<b>Embranchement :</b>	Phanérogames
<b>Sous Embranchement :</b>	Angiospermes
<b>Classe :</b>	Magnoliopsida (Dicotylédone)
<b>Ordre :</b>	Malvales
<b>Famille :</b>	Thymelaeaceae
<b>Genre :</b>	<i>Thymelaea</i>
<b>Non latin :</b>	<i>Thymelaeahirsuta</i> Endel.
<b>Non arabe :</b>	Methnane.

#### III-5) Classification phylogénétique

La dernière décennie a vu se développer la cladistique moderne, ou systématique moléculaire, basée sur l'analyse des séquences de gènes 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), ou 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, de cellules mucilagineuses et d'écorces fibreuses robustes dans cette famille (Nabil, 1991)

**III-5-1) Classification phylogénétique des Thymelaeaceae****Classe** :Rosopsida**S/Classe** :Rosidae**Ordre** :Malvales**Famille** : Thymelaeaceae**III-6) 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 (Nawwar et Ishak,1977).Selon Shenbrot (2004), *Thymelaeahirsuta*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,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. Il semble que la salinité du sol, sa faible teneur en humidité et ses températures extrêmes favorisent les activités phénologiques de *Thymelaeahirsuta* (Rizket Ismail, 1974).

## **IV)Activité antioxydante**

### **IV-1) Stress et radicaux libres**

#### **IV-1-1) Généralités**

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolisme toxique : les radicaux libres. Pour se protéger, l'organisme développe des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (glutathion peroxydase), de vitamines (A, C, E), d'oligo-éléments (sélénium) et de protéines (ferritine) (Bratt, 2000)

#### **IV-1-2) stress oxydatif**

##### **IV-1-2-1) 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 (Bakkali et al., 2008).

##### **IV-1-2-2) 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, la balance antioxydants /pro oxydants 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-1-2-3) Conséquences du stress oxydant**

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion. Des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, fibrose, dépôt de protéines anormales, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés (Favier, 2003).

**IV -1-3) Les radicaux libres**

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

**IV-2) Les antioxydants****IV-2-1) Définition**

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. 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 (Amadou, 2005)

**IV-2-2) 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 de protons d'hydrogènes ou d'électrons souvent aromatiques tels que des 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 attaqués 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 (Anderson et al., 1996).

**IV-2-3) Classification des antioxydants**

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes.

- ❖ Les antioxydants enzymatiques ;
- ❖ Les antioxydants non enzymatiques ;
- ❖ Les antioxydants d'origine végétale.

**IV-2-3-1) Les antioxydants d'origine végétale**

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydants (Tableau1). Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les oligoéléments et surtout les poly phénols (Reched, 2009)

**Tableau1:** Exemples de plantes médicinales douées d'activité antioxydants

Non scientifique	Non commun	Composés actifs
<i>Solanumlycopersicum</i>	Tomate	Rutine, acide ascorbique, acide chlorogénique, lycopène.
<i>Glycine max</i>	Soja	Eugenol, maltol, alcool benzylique.
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	Thymol, carvacrol, terpinène.
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	Acide carnosoique.
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Poivre noir	Arbutine, magnoflorine.
<i>Syzygium aromaticum</i>	Giroflier	Eugenol, eugenyl acétate.

➤ **Vitamine C :**

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs des espèces réactives de l'oxygène.

➤ **Vitamine E :**

Il prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en captant les radicaux pyroxyles, il est présent dans les huiles végétales (huile d'arachide, de soja, de palme, de maïs, de tournesol et d'olive pressée à froid, ainsi les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes .

➤ **Antioxydant phénoliques**

La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger le radical libre : radical hydroxyle, l'anion du peroxyde et les radicaux peroxydes. Les flavonoïdes inactivent

et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle(-OH) fortement réactif. Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidiques

#### **IV-2-3-2) Les antioxydants enzymatiques**

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

✚ **Les superoxydesdismutases (SOD) :** La famille des superoxydesdismutases comporte trois isoformes (SOD<sub>1</sub>, SOD<sub>2</sub>, SOD<sub>3</sub>) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>(Favier, 2003).

✚ **Les catalases :** Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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-Sehpard, 1993).

✚ **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).

#### **IV-2-3-3) Les antioxydants non enzymatiques**

Cette classe regroupe des composés endogènes de faibles poids moléculaires qui peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion) ou issue du métabolisme cellulaire (acide urique). Des protéines tel que la ferritine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydant secondaire en chélatant les métaux de transition permettant ainsi de prévenir la formation du radical hydroxyle via la réaction de Fenton(Martinez-Cayueeta,1995).

Le présent travail a été réalisé au laboratoire deculture *in vitro*,département d'Agronomie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

### Site et conditions d'échantillonnage

La zone d'échantillonnage se situe dans la région de Jdiouia (Lat. 35°55'33" N, Long. 0°49'23" E), et à 83m au dessus du niveau de la mer. Cette dernière est distance de 35Km du chef-lieu de la willaya de Rélizane (Algérie).

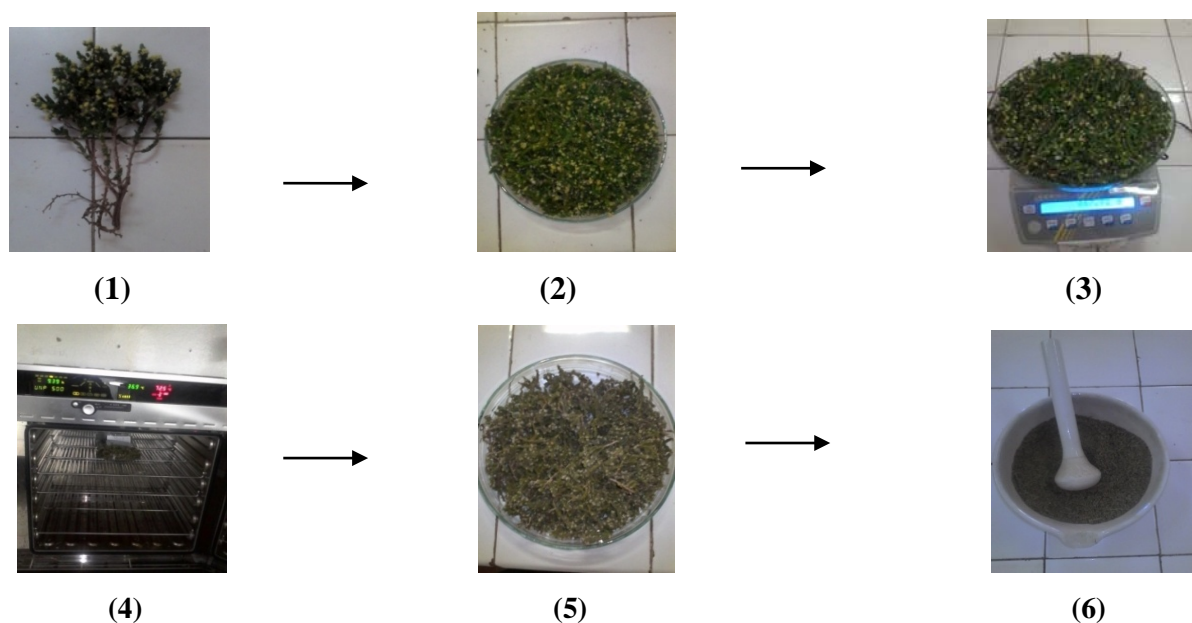
Un échantillonnage, réalisé mensuellement sur la partie aérienne (feuilles, fleurs, brindilles) de la plante, d'une manière aléatoire, s'est étalé du mois de novembre 2016 à Avril 2017.Emballés dans des sacs en plastique noir, les prélèvements ont été transportés au laboratoire pour être analysé.

## V-Matériels et Méthodes

### V-1) Matériels

#### V-1-1) Drogue végétale

Au laboratoire, les échantillons ont été étalés et laissés sécher à l'aire libre et à l'abri de la lumière pendant une semaine. Le séchage étant le moyen de conservation le plus simple, sa durée dépend de la proportion d'eau dans les parties végétales ainsi que de la température ambiante(Kunckel et Lobmeyer,2007).Après élimination des tiges, le mélange(feilles, fleurs et brindilles) de *Thymelaea hirsuta* a étérecueilli, desséché dans une étuve à température  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  jusqu'à obtenir un poids constant. Enfin, un broyage a été réalisé sur l'ensemble des organes à l'aide d'un mortier en porcelaine(Fig. 6).



**Figure 6:** Étapes de préparation de la drogue de *Thymelaea hirsuta*.

**V-1-2) Produits chimiques**

- Méthanol(Sigma) ;
- Éthanol (Sigma).

**V-1-3) Réactifs chimiques**

- Acide gallique  $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$  (Merck) ;
- Folin-Ciocalteu  $H_3PW_{12}O_{40} + H_3PMO_{12}O_{40}$  (Biochem);
- Carbonate de sodium  $NaHCO_3$  (Biochem) ;
- Quercetine  $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$  (Acros organics);
- 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (Sigma);
- 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  (DPPH) (Aldrich);
- Acétate de sodium ;
- Rutine(Sigma) ;
- Acidechlorhydrique(Sigma) ;
- Vanilline(Sigma) ;
- Trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$ (Sigma).

## V-2) Méthodes

### V-2-1) Extraction

#### V-2-1-1) Agitation /filtration

Le matériel végétal finement broyé (25g.) a été agité dans des flacons sombres contenant 250ml de solvant organique dilué (80% : v/v) ; méthanolet éthanol. Cette démarche a été réalisée par le biais d'un agitateur orbital (Stuart®, reciprocating Saker |SSL<sub>2</sub>|) à raison de 180rpm. Après 24h, le mélange a été filtré sous vide sur papier wattman #1. Cette méthode a été répétée trois fois pour avoir une meilleure extraction et obtenir un meilleur rendement des composés phénoliques. Enfin les filtrats récupérés ont été mélangés (Nwosu, 2011).



**Figure7** : Extrait brut filtré

#### V-2-1-2) évaporation

Le solvant a été évaporé sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif (Büchi, modèle RP 210) à une température de 40°C (concentration de l'extrait).

L'extrait brute ainsi obtenu a été conservé à 4° C.



**Figure8**: Méthode d'évaporation du solvant.

### V 2-1-3) Lyophilisations

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (sublimation).

Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité.

### V-2-2) Étude quantitative

#### V-2-2-1) : Rendements

Les rendements des extraits méthanoliques et éthanoliques du mélange (feuilles, fleurs et brindilles) de *Thymelaea hirsuta* ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rd(\%)} = \{(P1-P2) / P3\} \times 100$$

**P1** : poids du ballon après lyophilisation.

**P2** : poids du ballon avant lyophilisation (ballon vide).

**P3** : poids de la matière végétale de départ.

### V-2-3) Analyse phytochimique

#### V-2-3-1) Quantification 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.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits ont été déterminées par spectrophotométrie, suivant le protocole décrit par Milliauskas et al. (2004). Brièvement, 1ml (1mg/ml) de l'extrait 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 étalon a été réalisé avec des concentrations croissantes d'acide gallique (standard) allant de 0 à 100µg/ml. Après une heure d'incubation, à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 765 nm contre un blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre de type Jenway 6715. L'expression des résultats a été obtenue à partir de l'équivalence du standard (acide gallique) par gramme de lyophilisat (mg /EAG/g. Lyo.).

### V-2-3-2) Quantification des flavonoïdes

La teneur des flavonoïdes totaux 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' $\text{AlCl}_3$  (2%) a été mélangé à un volume égal d'extrait (2mg/ml). 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 des concentrations de la Rutine comme substance de référence (0 à 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Les expressions des résultats ont été obtenues à partir de l'équivalence du standard (Rutine) par gramme de lyophilisat (mg ER/g. Lyo).

### V-2-3-3) Quantification des flavonols

Les flavonols sont l'une des classes importantes des flavonoïdes. Les flavonols montrent des propriétés antioxydants qui peuvent être déterminées en appliquant la méthode décrite par (Abdel-Hameed, 2009). Approximativement, un volume de 1ml d'extrait (2mg/ml) a été mélangé à un volume égal d' $\text{AlCl}_3$  (2%).Les densités optiques ont été lues à 440 nm après 2,5 heures d'incubation à l'aide du spectrophotomètre, contre une courbe d'étalonnage tracée avec des concentrations croissantes de la Rutine (0 à 100 $\mu\text{g/ml}$ ). Les expressions des résultats ont été obtenues à partir de l'équivalence du standard (Rutine) par gramme de lyophilisat (mg ER/g. Lyo.).

### V-2-3-4) Quantification des Tanins

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, 50 $\mu\text{l}$  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 500nm. La concentration des tanins condensés a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine. Les résultats ont été exprimés en équivalent catéchine par gramme de lyophilisat (mg EC/g. Lyo.).

#### V-2-4) Évaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante

A cause de la propriété essentielle de l'antioxydant (piégeur des radicaux libres), deux méthodes ont été mises en place pour évaluer l'efficacité de l'antioxydant à piéger les radicaux libres (ABTS et DPPH) (El-Kalamouni, 2010).

A fin d'évaluer l'activité antioxydants, il a été recommandé d'employer une méthode stable et rapide. De nombreuses techniques ont été développées pour estimer la capacité scavenging du radical et l'activité antioxydante totale. La méthode la plus utilisée et la plus fiable permettant la détermination de la disparition de radicaux libres (en utilisant un spectrophotomètre).

##### V-2-4-1) Détermination de l'activité de balayage des radicaux libre par DPPH

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Samarth et al., 2008). En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en couleur jaune (Maataoui et al., 2006).

Une série de dilutions a été réalisées à partir d'une solution mère d'échantillon à tester (2mg/ml) et une substance de référence représentée par Trolox.

Pour chacune des concentrations, un volume de 50µl a été mélangé avec un volume de 5ml de DPPH (0,004 dans le méthanol). Après 30min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm. Un blanc a été traité dans les conditions, tout en remplaçant l'extrait par 50µl de méthanol.

Les résultats ont été exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où inhibition des radicaux libres, en pourcentage, en utilisant la formule suivant :

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

**AB:** Absorbance du blanc

**AA:** Absorbance de l'échantillon

##### V-2-4-2) Détermination de l'activité de balayage des radicaux libre par ABTS

La méthode de l'activité de balayage du cation ABTS adoptée est celle de Bahman (2008). Le cation radical ABTS a été produit en mélangeant la solution de stock ABTS (7mM dans l'eau distillé) avec une solution de persulfate de potassium 2,45Mm. Le mélange a été gardé à l'obscurité et à la température ambiante pendant 12-16 heures avant son utilisation. En suite, la solution ABTS a subi plusieurs dilution, dans le but d'atteindre une absorbance égale à  $0,70 \pm 0,02$  à 734nm. Fraichement préparé, 5ml de cette solution ont été ajoutés à 50µl de chaque extrait

préparés à différentes concentrations. La lecture a été faite à 734 nm après 10 mn, et chaque concentration a été testée en trois répétitions.

Le taux d'inhibition de l'ABTS en pourcentage a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - (\text{Abs échantillon} - \text{Abs Blanc}))}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Avec:

**I:** Taux d'inhibition

**Abs contrôle:** Absorbance du contrôle.

**Abs échantillon :** Absorbance de l'échantillon.

En parallèle, la solution ABTS (5 ml) et éthanol (50 µl) a été utilisée comme un contrôle

En outre, Trolox a été utilisée comme référence (courbe d'étalonnage). Une courbe de régression polynomiale a été tracée en fonction des taux d'inhibition du radical ABTS et la concentration de l'échantillon, sur laquelle la valeur  $IC_{50}$  (concentration inhibitrice), qui signifie la concentration de l'échantillon nécessaire pour diminuer l'absorbance d'ABTS de 50%, a été notée.

#### **V-2-5) Analyse statistique**

Toutes les mesures ont été données en triplicata. Les données des traitements ont été exécutées par l'analyse de la variance (ANOVA bi-factorielle). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  écarts type. Le test de Student-Neuman-Keuls a été utilisé pour comparer les moyennes, lorsque l'ANOVA montre une signification.  $P < 0,05$  indique un effet significatif. Les tests de corrélations entre variables ont été effectués à l'aide du Microsoft Excel 2007. Le coefficient de corrélation utilisé est celui de Pearson (r), également appelé coefficient de corrélation linéaire.

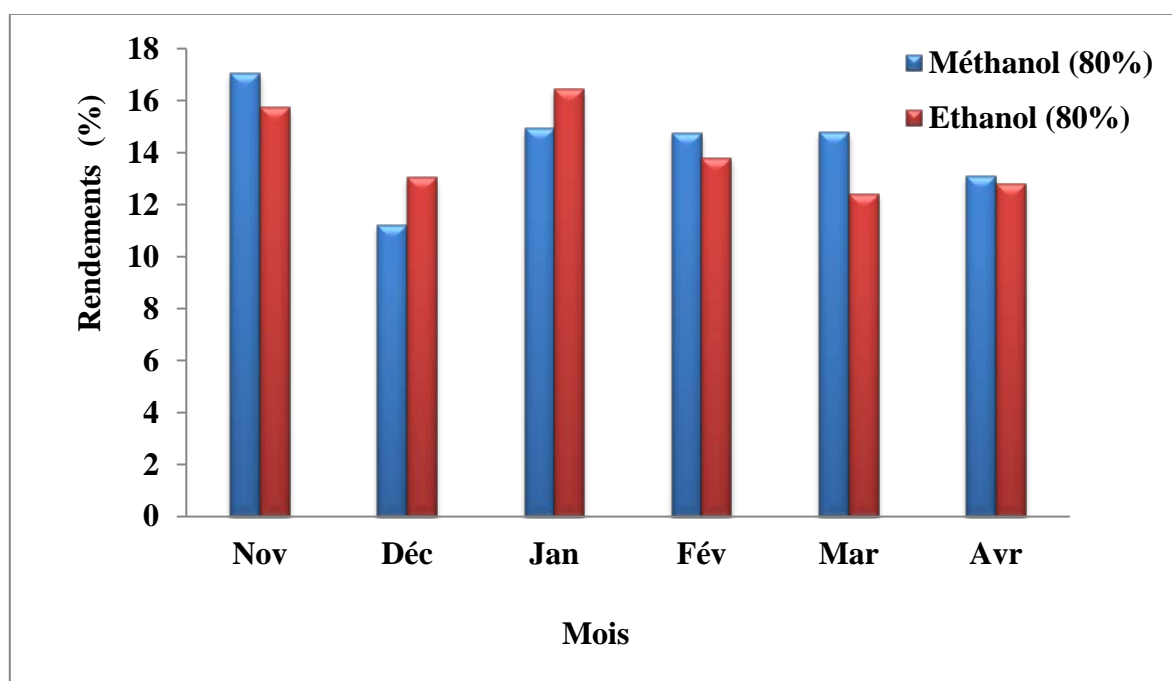
## VI) Résultats et discussion

### VI-1) Rendements

Après extraction et récupération des extraits sous forme de poudre ou pâte, l'aspect physique, la couleur et le rendement de chacun des extraits ont été déterminés et représentés dans le tableau 2 :

**Tableau 2:** Rendement (%) des extraits méthanoliques et éthanoliques des mélanges(feilles/fleurs/brindilles) de *Thymelaea hirsuta* L.

Solvants/Mois	Rendements (%) MS					
	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr
Méthanol (80%)	17,04	11,20	14,94	14,75	14,78	13,10
Ethanol (80%)	15,73	13,05	16,44	13,79	12,42	12,80



**Figure 9:** Rendements des extraits de *Thymelaea hirsuta*

En se référant aux données récapitulées sur le tableau 02 et la figure 09, il est à noter que le rendement obtenu a été sous la dépendance du solvant d'extraction utilisé. En effet, quelque soit le mois de collecte de la matière végétale de *Thymelaea hirsuta*, relativement, de forte rendements ont été obtenus avec méthanol. Les taux enregistrés lors des mois de novembre, janvier, février et mars semblent être les plus importants avec respectivement 17,04, 14,94, 14,75 et 14,78%.

Comparativement, les mois de décembre et avril n'ont permis de produire que 11,20 et 13,10% pour cent gramme de matière sèche, respectivement. Les rendements d'éthanol sont distingués de ceux du méthanol par les taux élevés obtenus lors des mois de novembre (15,73%) et janvier (16,44% MS), alors que le reste des mois ont noté des valeurs de l'ordre de 13,05 (décembre), 13,79 (février), 12,42 (mars) et 12,80% MS (avril).

## VI-2) Analyse quantitative

Les résultats des quantifications des métabolites secondaires envisagés sont récapitulés dans les tableaux 3, 5, 7 et 9

### VI-2-1) Détermination des composés poly phénols totaux

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

Les résultats sont présentés dans le tableau 3 et la figure 11 et sont exprimés en milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait « lyophilisat » (mg EAG/g. Lyo.). La courbe d'étalonnage a été ajustée avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 99,8\%$  et une équation de régression  $y = 0,0075x$  (Fig. 10).

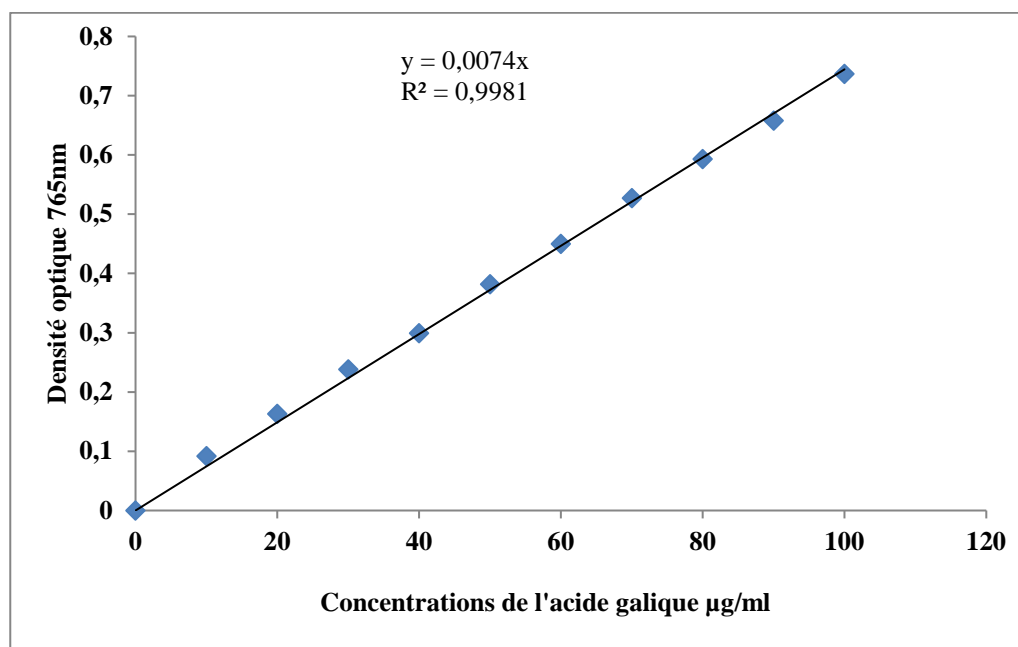


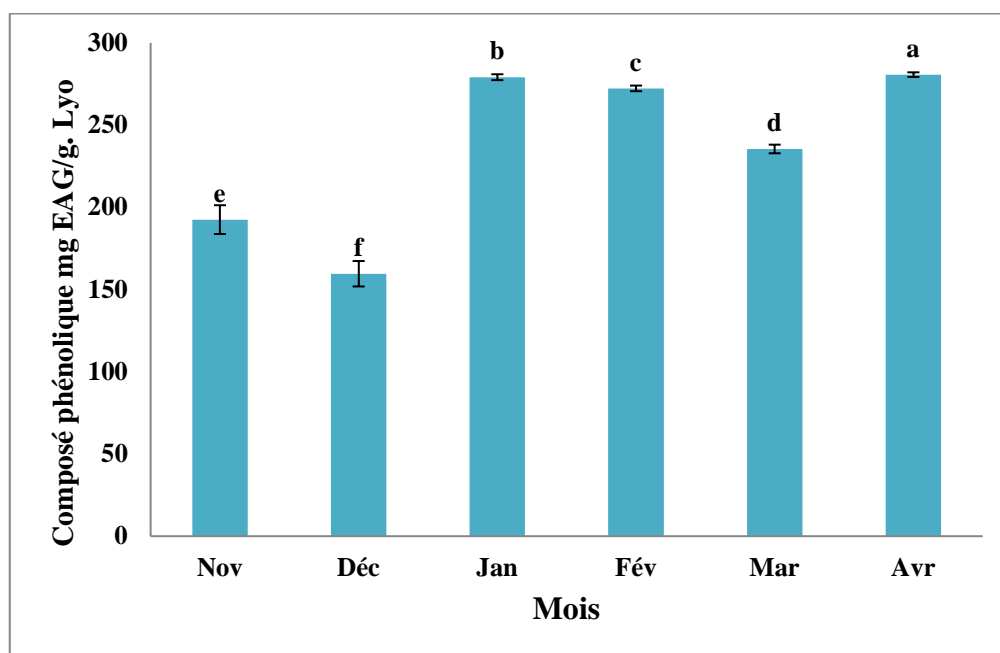
Figure 10: courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

L'analyse des données statistiques a décelé l'importance du facteur Mois sur la répartition des composés phénoliques totaux ( $F_{5,1}= 12148,42$  ;  $P=0$ ). C'est ainsi que la valeur la plus élevée a été enregistrée sur le mélange feuilles/fleurs/brindilles du mois d'avril ( $280,67 \pm 1,41$  mg EAG/g. Lyo.) (Tab. 3).

**Tableau 3 :** Répartition mensuelle des composés phénoliques totaux.

Extraits./Mois	Composés phénoliques totaux (mg EAG/g. Lyo.)					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
Mélange (Fe, Fl et Br)	292,51a ± 8,75	159,60f ±7,73	279,11c ±1,79	272,31d±1 ,71	235,47e+2 ,63	280,67b±1 ,41

Données (Moyenne±Ecart type, n=3). Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).



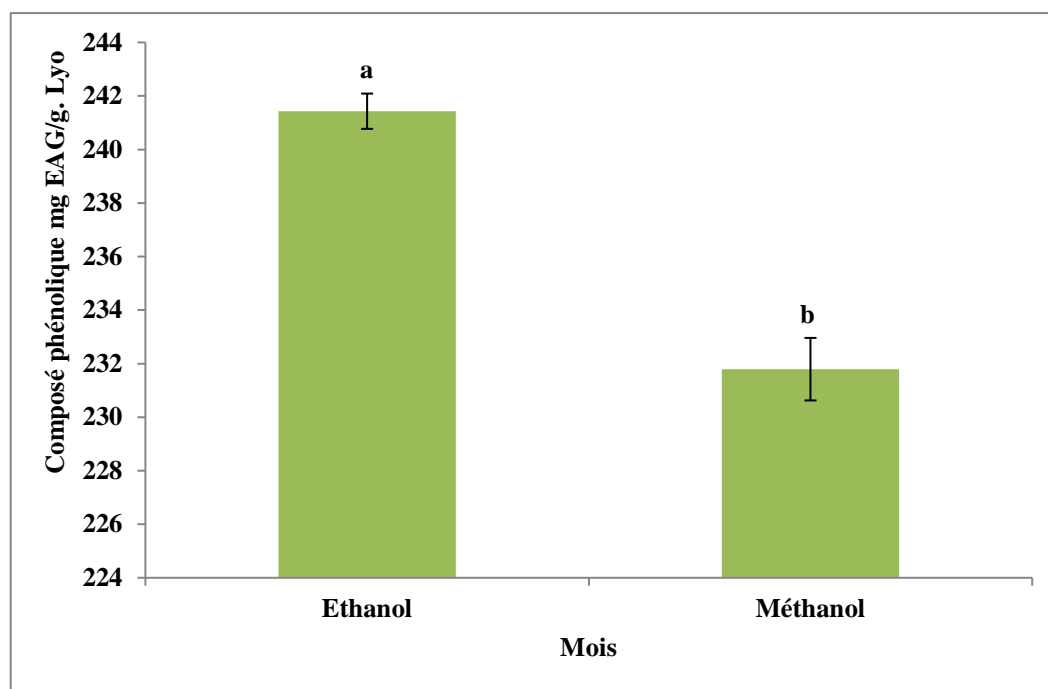
**Figure 11 :** Répartition mensuelle des composés phénoliques totaux. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).

Pour les différents solvants, une différence significative ( $F_{5,1}= 656,033$  ;  $P=0$ ) dans les teneurs en composés phénoliques totaux a été notée, justifiant par conséquent leur effet solubilisant. La disponibilité en composés phénoliques totaux varie entre un maximum de  $241,43 \pm 0,66$  mg EAG/g. Lyo. produit par l'éthanol et un minimum de l'ordre de  $231,79 \pm 1,17$  mg EAG/g. Lyo. Noté pour le méthanol (Tab. 4).

**Tableau4** : Teneurs en composés phénoliques totaux, par solvant de *T.hirsuta*

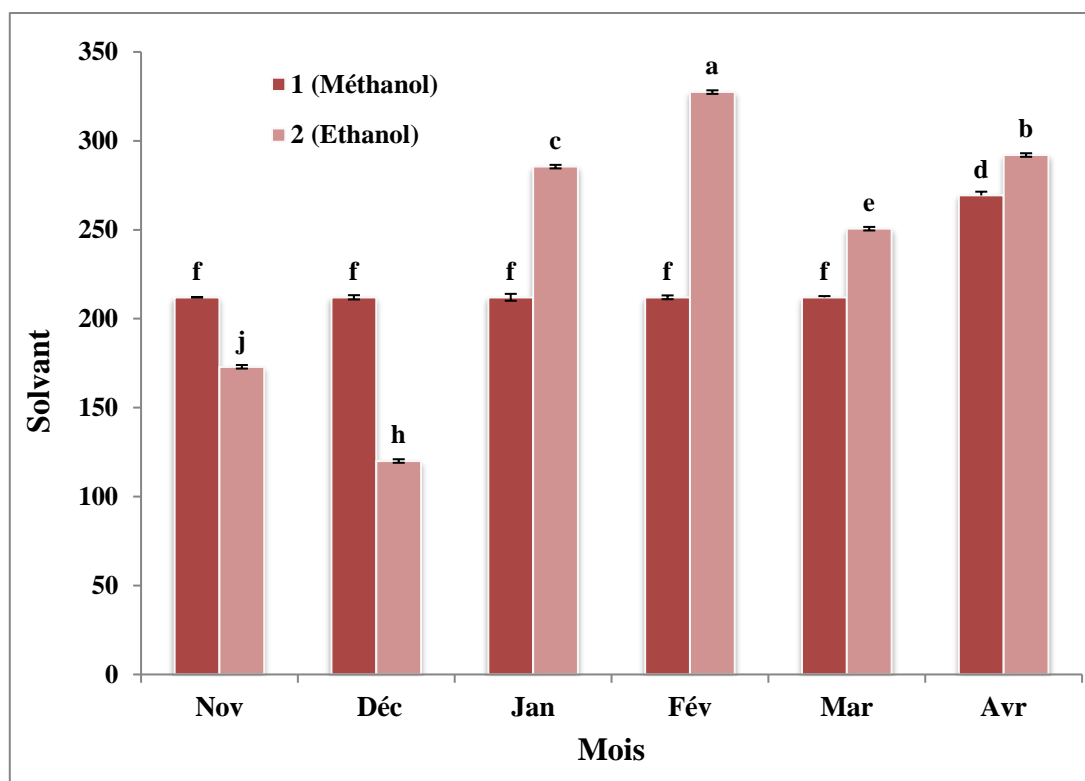
Extraits./Mois	Composés phénoliques totaux (mg EAG/g. Lyo.)	
	Méthanol	Ethanol
Mélange (Fe, Fl et Br)	231,79 <b>b</b> ± 1,17	241,43 <b>a</b> ± 0,66

Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).



**Figure 12:** Teneurs en composés phénoliques par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

De même, l'effet inter-actif a montré également une différence significative ( $F_{5,1} = 4942,583 ; P=0$ ). Les résultats indiquent la supériorité de l'extrait éthanolique obtenu au mois de février avec  $327,422 \pm 0,72$  mg EAG/g. Lyo. Alors que ceux méthanoliques, se sont les mois de janvier ( $272,711 \pm 0,61$  mg EAG/g. Lyo.) et avril ( $269,289 \pm 0,90$  mg EAG/g. Lyo.) qui l'emportent.

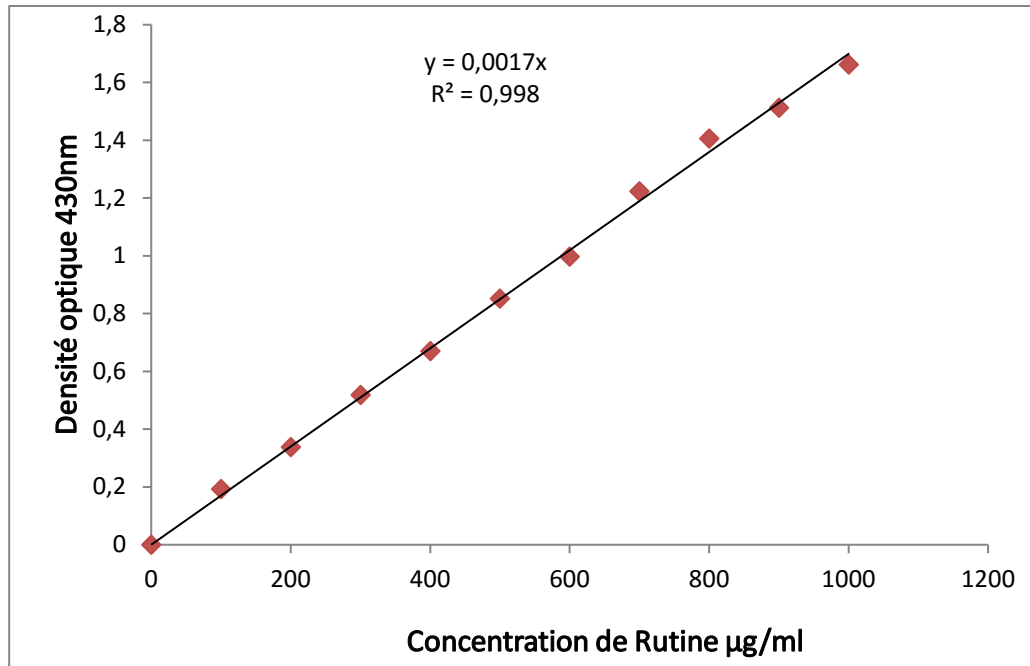


**Figure 13 :** Teneurs comparative en composés phénoliques totaux du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ ))

#### VI-2-2) Détermination des Flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par (Change et al., 2002). Les teneurs en flavonoïdes totaux de mélange (feuilles, fleurs et brindilles) de la plante étudiée et pour chacun des solvants ont été estimés grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec une substance de référence la rutine à différentes concentrations.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent rutine par gramme d'extrait « lyophilisat » (mg ER /g). La courbe d'étalonnage a montré un coefficient de corrélation  $R^2 = 99,8\%$  et une formule de régression  $y = 0,001 x$ . (Fig. 14).

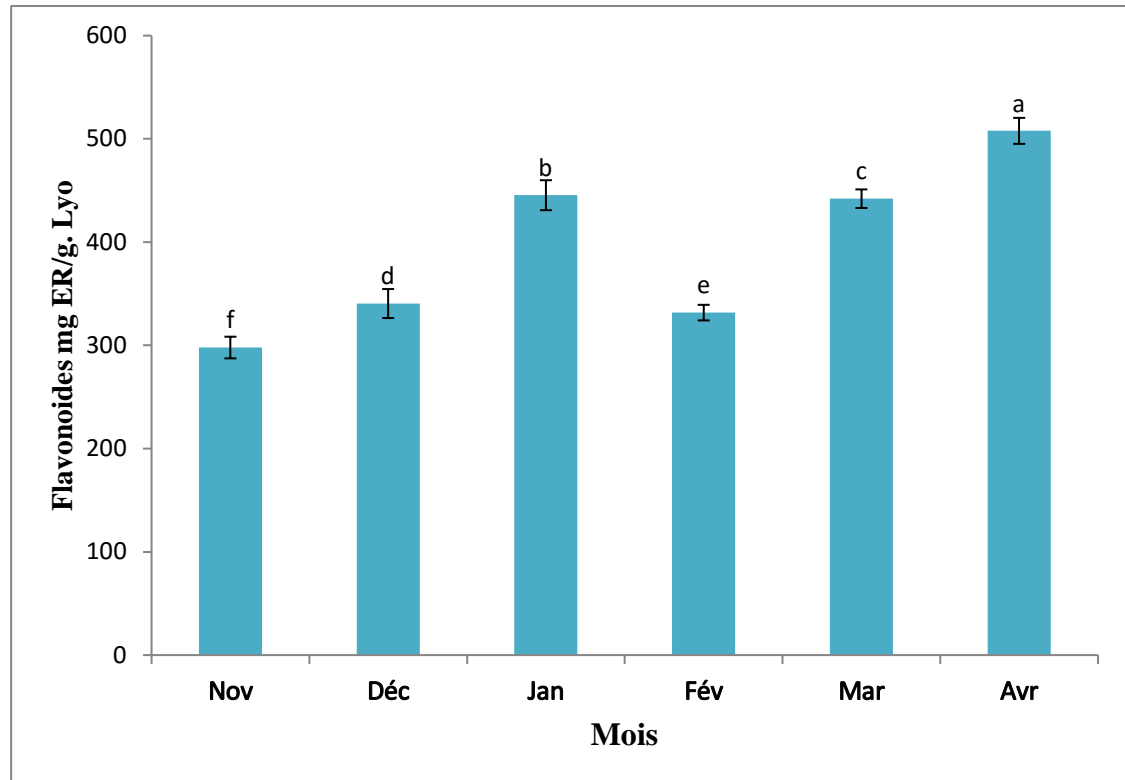


**Figure 14** : courbe d'étalonnage de Rutine.

Comme précédemment, la comparaison des taux moyens des flavonoïdes (Tab. 5) par mois de mélange (Feuilles, Fleurs et brindilles) de *Thymelaea hirsuta* ( $F_{5,1}=7072,32$ ;  $P=0$ ) une nette différence entre les somme de moyenne. La disponibilité de des mois au niveau le mélange, le mois d'Avril dépasse largement ceux estimés dans les autre mois  $507,75 \pm 12,6$ .

**Tableau 5** : Répartition mensuelle des flavonoides. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls,  $(p < 0,05)$ ).

Extraits/Mois	Flavonoides (mg ER /g Lyo)					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
<b>Mélange (Fe, Fl et Br)</b>	297,89 <sup>f</sup> ± 10,5	340,49 <sup>d</sup> ± 14,05	445,44 <sup>b</sup> ± 14,52	331,72 <sup>e</sup> ± 7,55	442,06 <sup>c</sup> ± 09	507,75 <sup>a</sup> ± 12,6

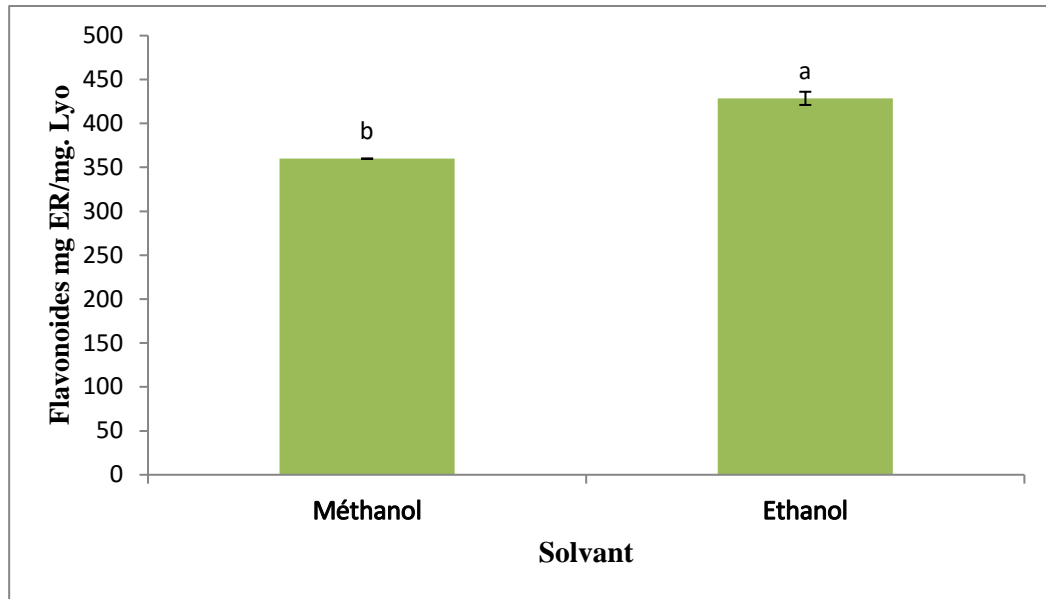


**Figure 15:** Répartition mensuelle des flavonoïdes. Moyennes suivies de lettres différentes différent significativement (Newman-Keuls, (.p.< 0,05).

Selon le solvant et plus précisément pour le mélange (Feuilles, Fleurs et Brindilles) de *Thymelaea hirsuta* ( $F_{5,1}=7392,668; P=0$ ) l'éthanol semble la plus riche  $428,56 \pm 3,78$ , suivie par le solvant de méthanol  $359,87 \pm 7,52$ . Le (Tab.6) montre ces résultats.

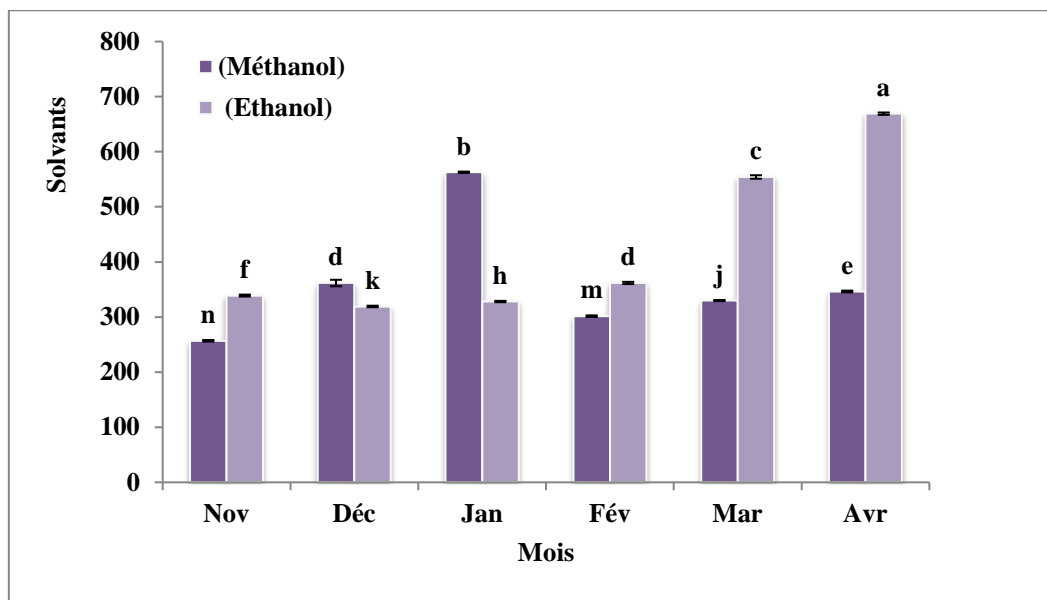
**Tableau 6 :** Teneurs des flavonoïdes par solvants de *T.hirsuta*

Extraits./mois	Flavonoïdes (mg EC/g Lyo)	
	Méthanol	Ethanol
Mélange (Feu, Fle et Bri)	359,87b ± 7,52	428,56a ± 3,78



**Figure 16 :** Teneurs en flavonoïdes par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

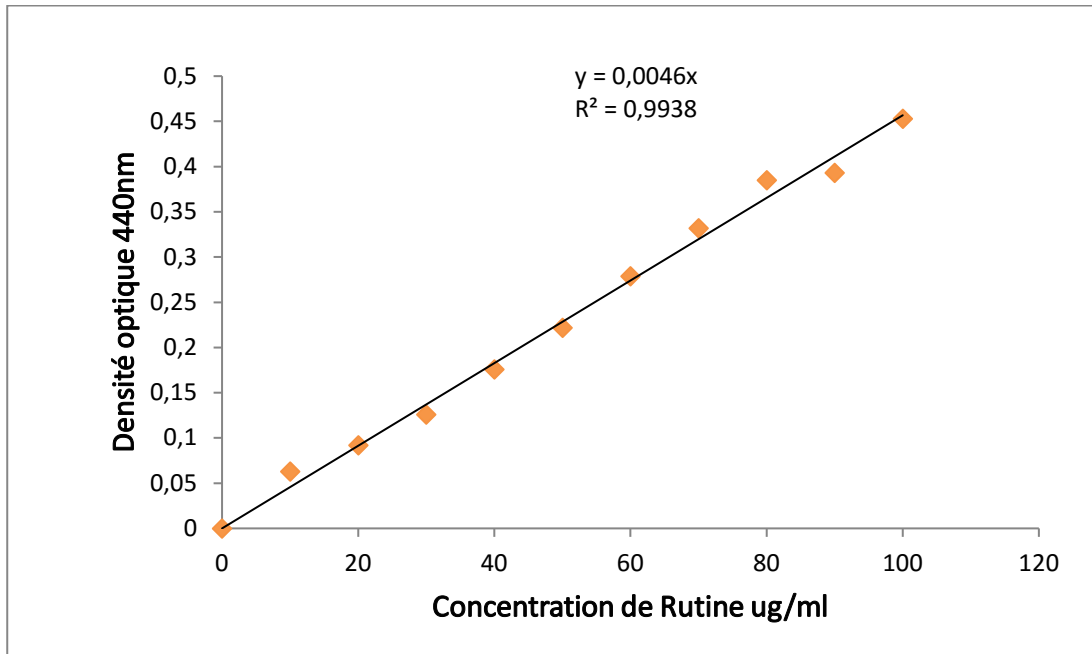
Dans la même analyse, l'étude comparative interactive (Mois /Solvant) montre également une différence significative ( $F_{5,1} = 10093,74, P=0$ ). Le maximum de l'extrait Avril/ méthanol et Avril/éthanol, ces résultats enregistré dans le (Fig.15).



**Figure 17 :** Teneurs comparative en flavonoïdes du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ ))

### VI-2-3) Détermination des Flavonols

L'analyse des flavonols a été réalisée par la méthode décrite par (Abdel-Hameed ,2009),en utilisant comme standard la rutine.La teneur des flavonols a été exprimée en mg équivalent rutine par gramme d'extrait de lyophilisat (mg ER/g.lyo),à partir des données des absorbances et de corrélation  $R^2= 99,3\%$  et une équation de régression  $y= 0,004 x$ .(Fig.18).

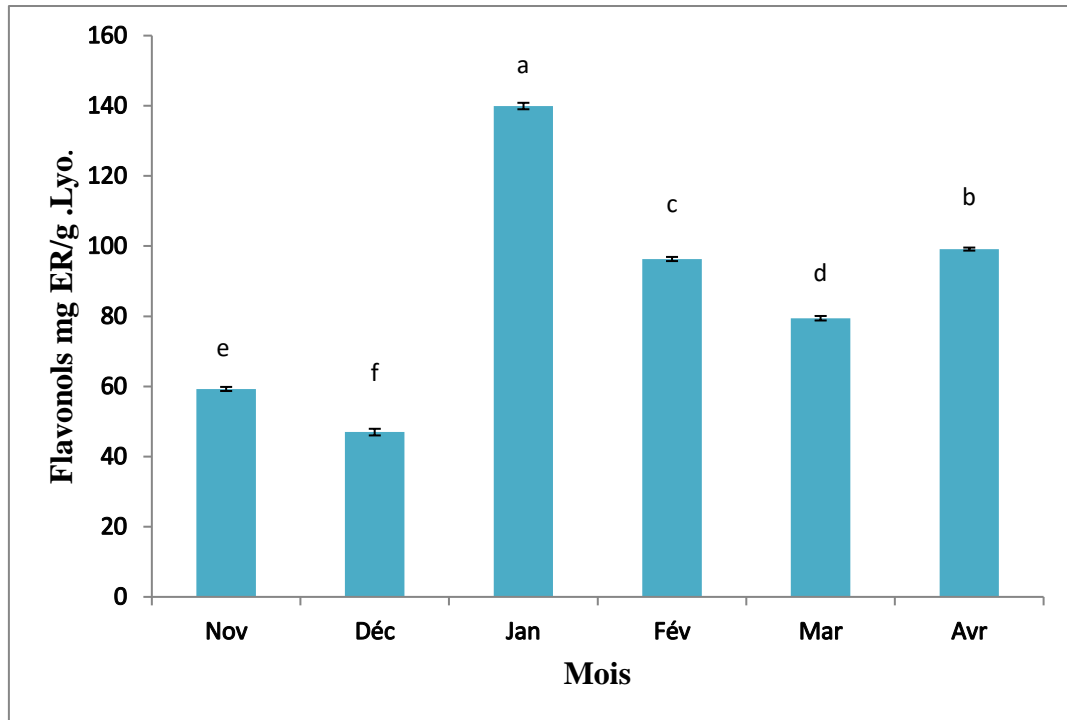


**Figure 18:** courbe d'étalonnage de rutine

Les moyennes en flavonols de mélange (Feuille, Fleurs et Brindilles) de *Thymelaea hirsuta* montrent une différence significative ( $F_{5,1} = 10403,31; P=0$ ). Ce sont les mois Janvier et Avril qui ont enregistré les valeurs la plus élevée. Les teneurs sont donc classées comme suite  $139,928 \pm 2,12$  et  $99,149 \pm 1,00$ . C'est alors le mois de Décembre qui a montré une valeur extrême se chiffrant à  $46,975 \pm 2,12$  (Tab.7).

**Tableau 7 :** Répartition mensuelle des flavonols. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).

Extraits./mois	Flavonols (mg ER /g Lyo)					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
<b>Mélange (Feu, Fle et Bri)</b>	$59,275e$ $\pm$ 4,16	$46,975f$ $\pm$ 2,12	$139,928a$ $\pm$ 2,04	$96,322c$ $\pm$ 1,29	$79,438d$ $\pm$ 1,42	$99,149b$ $\pm$ 01

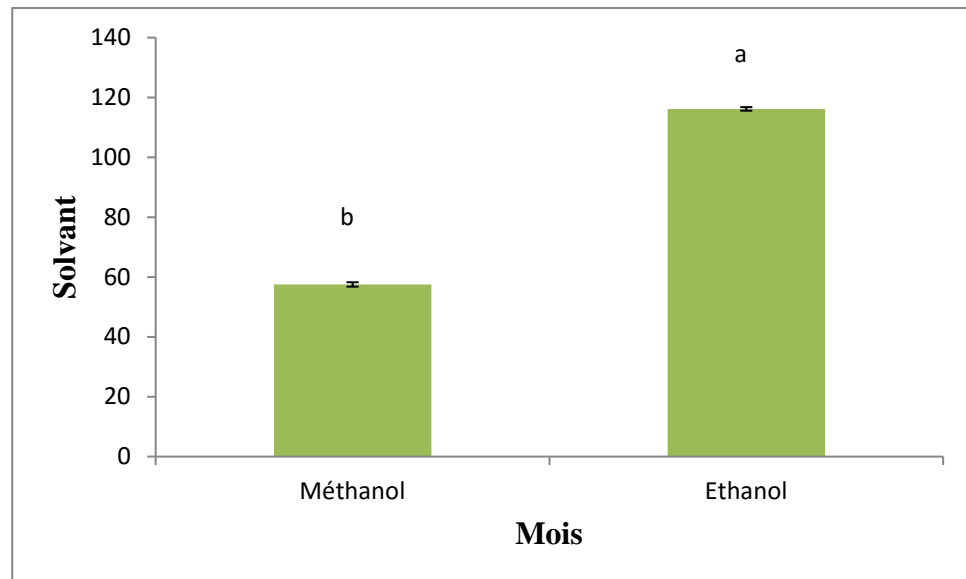


**Figure 19** : Répartition mensuelle des flavonoïdes. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).

Par le mélange de la plante étudiée, l'analyse des données bi factorielles montre une différence significative entre les moyennes des flavonols obtenue dans les différents solvants ( $F_{5,1} = 49139,88$ ;  $P=0$ ), c'est alors le solvant de l'éthanol qui a montré une valeur élevée ( $116,178 \pm 0,83$ ) par rapport au méthanol ( $57,518 \pm 1,18$ ) (Tab.8).

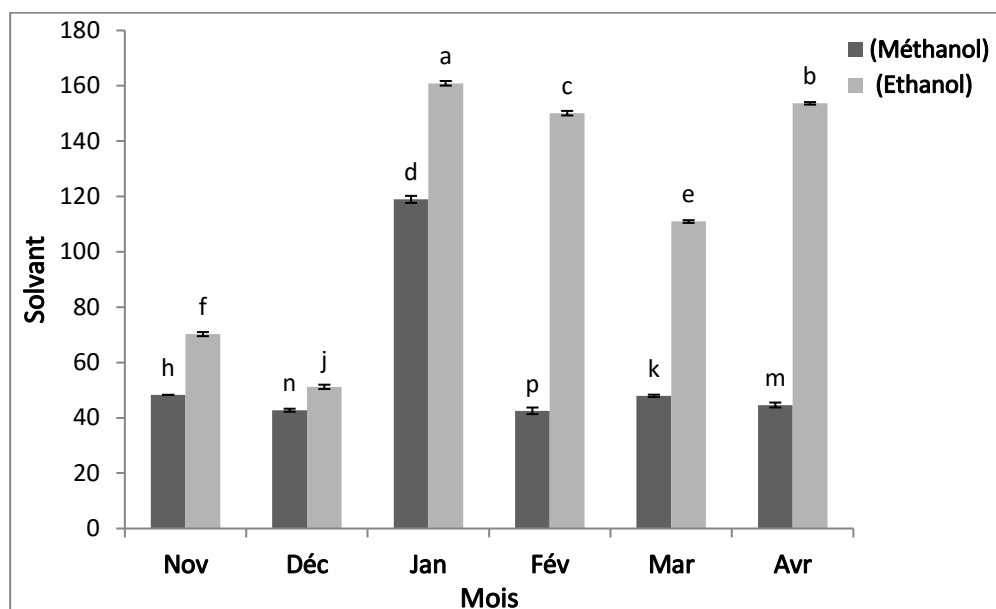
**Tableau 8** : Teneurs des flavonols par solvants de *T.hirsuta*

extraits./mois	Flavonols (mg EC/g Lyo)	
	Méthanol	Ethanol
Mélange (Feu, Fle et Bri)	57,518 <sup>b</sup> ± 0,83	116,178 <sup>a</sup> ± 1,18



**Figure 20 :** Teneurs en flavonoïdes par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes différent significativement (Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

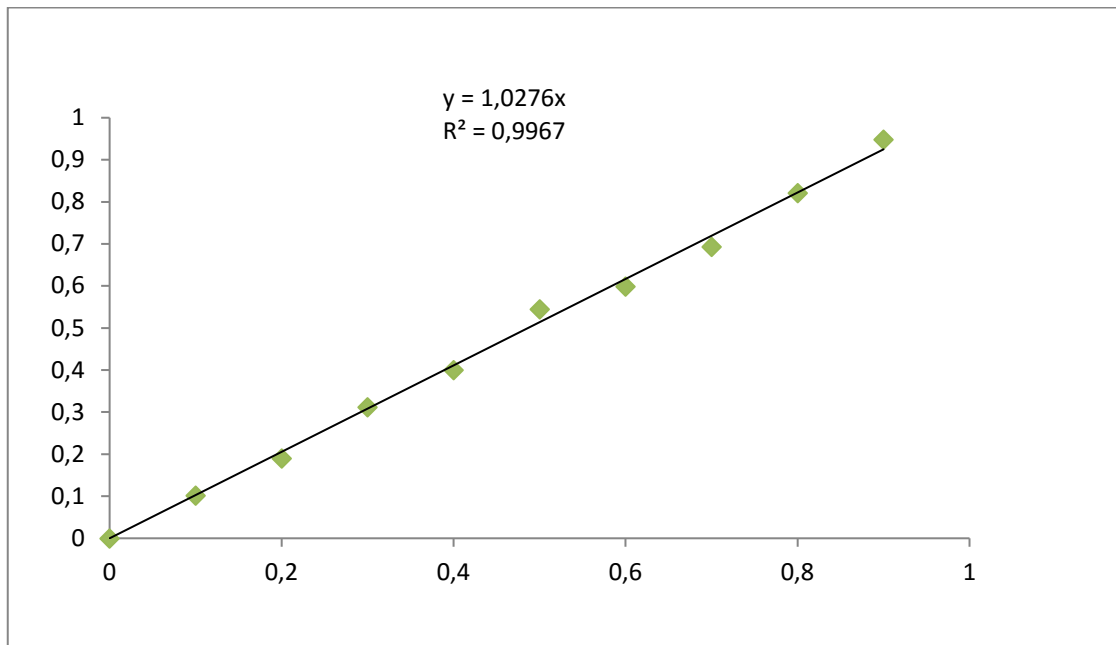
De même pour les flavonols, la comparaison bifactorielle des moyenne (Mois/Solvant) montre également une différence significative ( $F_{5,1}=4329,814; P=0$ ). Les teneurs sont ordonnées dans la figure 20 montrent que les mois Avril/Ethanol et Janvier/Ethanol sont enregistrés des valeurs plus élevés par rapport les autre mois.



**Figure 21 :** Teneurs comparative en flavonols du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes différent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).

#### VI-2-4) Détermination les Tanins

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  $y = 1,027x$  et coefficient de corrélation  $R^2 = 99,6\%$ . (Fig.22).

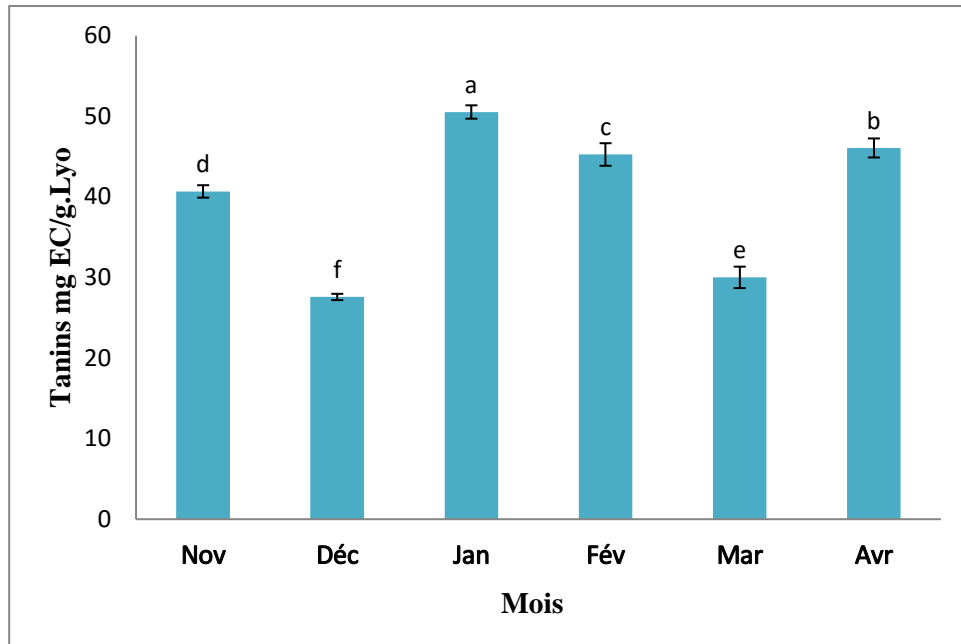


**Figure22:** courbe d'étalonnage de Catéchine

Les moyennes en Tanins de mélange (Feuille, Fleurs et Brindilles) de *Thymelaea hirsuta* montrent une différence significative ( $F_{5,1} = 377,526; P=0$ ). Ce sont les mois Janvier et Avril qui ont enregistré les valeurs la plus élevée. Les teneurs sont donc classées comme suite  $50,52 \pm 1,71$  mois Janvier et  $46,06 \pm 2,45$  Avril. C'est alors le mois Février qui a montré une valeur presque équivalent avec Avril se chiffrant à  $45,25 \pm 3,06$  (Tab.9).

**Tableau 9 :** Répartition mensuelle des tanins. Moyennes suivies de lettres différentes significativement (Newman-Keuls,  $(p < 0,05)$ ).

Extraits./mois	Tanins (mg EC/g Lyo)					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
<b>Mélange (Feu, Fleu et Bri)</b>	40,67d ± 1,73	27,57f ± 0,86	50,52a ±1,71	45,25c ± 3,06	30,5e ± 2,97	46,06b ± 2,45

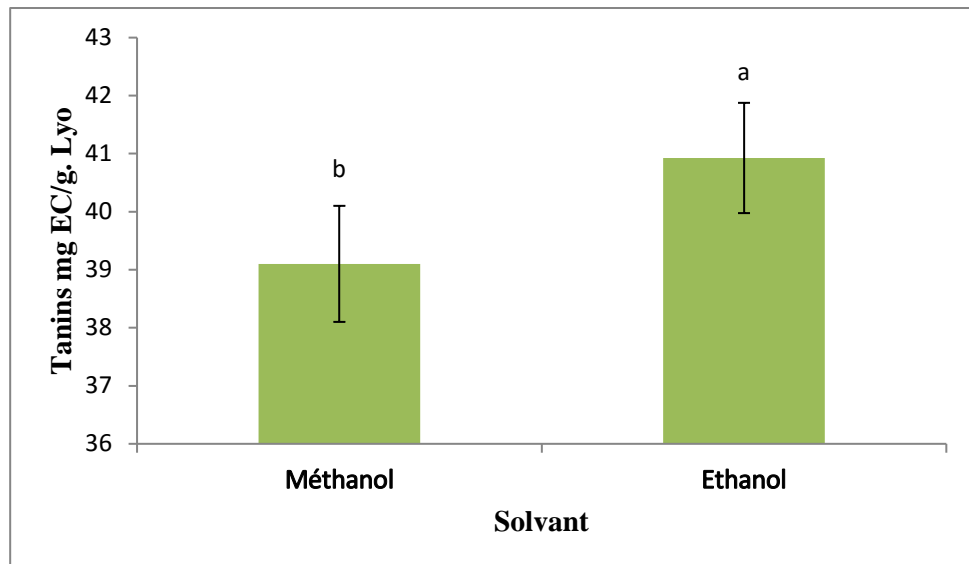


**Figure 23 :** Répartition mensuelle des tanins. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ )).

En suit, l'analyse des données bi factorielles montre une différence significative entre les moyennes des tanins obtenue dans les différentes solvants ( $F_{5,1} = 21,932$ ;  $P=0$ ), c'est alors le solvant du éthanol qui a montré une valeur élevée ( $40,93 \pm 1,02$ ) par rapport l'éthanol ( $39,10 \pm 1,11$ ). (Tab.10).

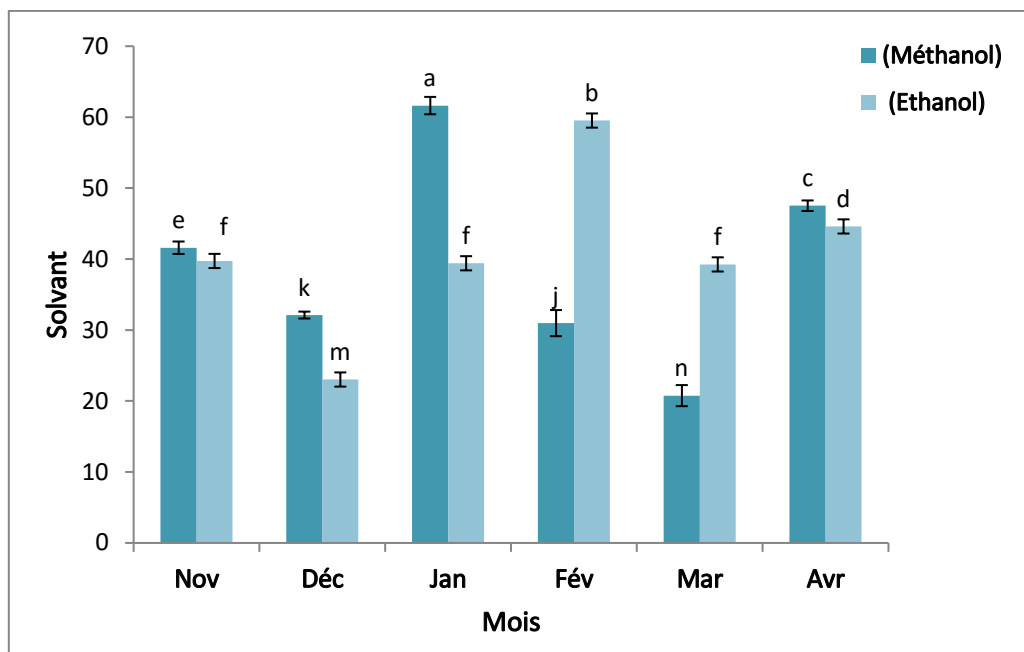
**Tableau 10:** Teneurs des tanins par solvants de *T.hirsuta*

extraits./mois	Tanins (mg EC/g Lyo)	
	Méthanol	Ethanol
Mélange (Feu, Fleu et Bri)	39,10 b ± 1,11	40,93a ± 1,02



**Figure 24** : Teneurs en tanins par solvant. Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ).

De même pour les tanins, la comparaison bi factorielle des moyennes (Mois/Solvant) montre également une différence significative ( $F_{5,1} = 378,766; P=0$ ). Les teneurs sont ordonnées (Fig.24) sont indiqués que les mois suivants Janvier/Méthanol et Février/Ethanol sont validés les valeurs augmentées.



**Figure 25** : Teneurs comparative en tanins du mélange (Fleurs, Feuilles et Brindilles). Moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement (Newman-Keuls, ( $p < 0,05$ ))

D'une manière générale, il ressort de ces résultats comparatives que ces différences dans la teneur composés phénoliques totaux, des flavonoïdes, flavonols et les tanins, aussi bien chez *Thymelaea hirsuta* (mélange) ou dans d'autres plantes peuvent être expliquées par les conditions environnementales (climatiques et période de collecte), le choix d'espèce végétale dans l'extraction, ainsi que par les conditions expérimentales portant sur la méthode de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction et sa polarité.

### **VI-3) Activité antioxydant par le test DPPH et ABTS.**

L'activité anti radicalaire est réalisée par les méthodes du DPPH et ABTS qui sont des méthodes fréquemment utilisées pour leurs simplicités. Ces méthodes sont basées sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH ou ABTS.

L'activité antioxydant des extraits vis-à-vis du radical DPPH ou ABTS ont été appréciés selon le procédé spectrophotométrique en suivant la réduction de ces derniers celle-ci se traduit par un changement de leurs couleurs.

L'analyse qualitative et quantitative phytochimique des extraits de mélange de *Thymelaea hirsuta* présentait une activité antioxydante dépendante de la concentration sur le radical ABTS, les résultats obtenus montrent que le taux d'inhibition de l'activité antioxydante par test ABTS à différentes concentrations (0,2 à 2 mg/ml) des extraits méthanolique et éthanolique de *Thymelaea hirsuta* ont été enregistrés en mesurant la réduction du cation radical généré par ABTS à 734 nm que les mois Avril/méthanol et Janvier /éthanol ont enregistré les valeurs minimales par rapport aux autres mois (Tab.11 et 12).

**Tableau 11** : les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par le test ABTS à différentes concentrations des extraits méthanoliques

Concentration (µg/ml)	Méthanol					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
<b>200</b>	4,29±0,95	7,51±0,66	4,94±0,85	12,16±0,74	9,19±0,73	6,22±0,76
<b>600</b>	10,73±0,70	15,13±0,60	14,99±0,17	18,64±0,61	13,10±0,76	13,64±0,68
<b>1000</b>	13,44±0,95	28,68±0,54	27,99±0,46	28,59±0,95	27,80±0,35	21,26±0,26
<b>1400</b>	31,55±0,68	38,13±0,43	32,85±0,84	36,31±0,90	32,98±0,55	32,84±0,34
<b>1800</b>	47,38±0,41	46,29±0,39	47,53±0,32	47,18±0,84	47,72±0,26	38,57±0,42
<b>2000</b>	48,07±0,65	48,86±0,38	48,77±0,47	49,46±0,67	49,08±0,49	44,69±0,87

**Tableau 12**: les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par le test ABTS à différentes concentrations des extraits éthanoliques

Concentration (µg/ml)	Ethanol					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
<b>200</b>	6,48 ±0,54	9,94±0,63	7,51±0,67	10,13±0,79	4,74±0,77	8,01±0,74
<b>600</b>	17,89±0,46	15,62±0,65	16,46±0,65	15,03±0,17	16,96±0,72	13,35±0,68
<b>1000</b>	29,05±0,49	33,03±0,56	22,46±0,97	26,45±0,62	29,72±0,59	26,55±0,55
<b>1400</b>	42,20±0,34	39,76±0,42	32,40±0,39	43,08±0,49	35,46±0,45	31,70±0,42
<b>1800</b>	45,84±0,37	47,72±0,45	42,83±0,31	48,61±0,25	45,69±0,35	44,46±0,29
<b>2000</b>	48,53±0,44	48,86±0,48	43,86±0,29	50,42±0,49	49,33±0,20	45,84±0,79

Parallèlement par test DPPH les résultats obtenus sont indiqués que le taux de inhibition calculé par différents extraits méthanolique et éthanolique de *Thymelaea hirsuta* que les mois Décembre /Méthanol et Novembre/Ethanol qui sont enregistrés des valeurs élevées. (Tab.13 et 14).

**Tableau 13 :** les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par test DPPH à différentes concentrations des extraits méthanoliques

Concentration (µg/ml)	Méthanol					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
200	1,76±0,48	2,97±0,70	5,46±0,64	1,63±0,41	1,60±0,95	1,66±0,35
600	2,88±0,34	9,08±0,29	14,48±0,20	9,68±0,62	4,26±0,72	4,10±0,70
1000	7,24±0,89	18,09±0,97	19,38±0,36	15,21±0,30	7,26±0,63	7,39±0,86
1400	17,40±0,47	22,63±0,38	21,36±0,66	21,81±0,50	8,33±0,35	10,20±0,21
1800	21,10±0,70	27,92±0,38	22,77±0,48	25,47±0,78	10,92±0,87	13,52±0,84
2000	26,56±0,63	36,96±0,67	24,90±0,59	31,58±0,41	11,80±0,59	15,15±0,68

**Tableau 14 :** les moyennes des taux d'inhibition d'activité antioxydante par test DPPH à différentes concentrations des extraits éthanoliques

Concentration (µg/ml)	Ethanol					
	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mar.	Avr.
200	14,79±0,32	4,19±0,20	5,52±0,69	0,78±0,29	1,08±0,64	4,87±0,90
600	22,72±0,83	6,44±0,82	8,15±0,76	4,30±0,30	6,14±0,77	12,98±0,20
1000	31,85±0,67	13,49±0,64	15,18±0,48	9,10±0,50	12,50±0,67	22,60±0,24
1400	41,27±0,84	15,94±0,76	17,83±0,20	14,02±0,60	17,51±0,16	28,35±0,28
1800	45,85±0,64	16,59±0,96	19,31±0,32	17,63±0,71	25,62±0,59	33,75±0,66
2000	48,76±0,74	21,76±0,91	21,02±0,81	22,83±0,46	28,73±0,85	35,49±0,21

### VI-3-1) Corrélation entre l'activité antioxydants et les composés phénoliques

Les résultats des activités antioxydantes obtenues sont indiqués que une grande variabilité à l'intérieur et entre le mélange (feuilles, fleurs et brindilles) de *Thymelaea hirsuta* a été observée pour chaque extrait, une relation dose-dépendante a été observée entre la concentration de l'extrait et l'activité de balayage du DPPH et ABTS. La corrélation du Pearson parmi les résultats de différents tests antioxydants de mélange de *Thymelaea hirsuta* résumée dans les tableaux 15 et 16, il y avait une bonne corrélation parmi les activités antioxydantes basées sur l'ABTS et DPPH avec le dosage.

**Tableau 15:** Coefficient de corrélation Pearson (r) entre les composés phénoliques et l'activité antioxydant par test DPPH

Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Méthanol					
	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril
r	0,973	0,991	0,948	0,996	0,994	0,999
	Ethanol					
	0,976	0,978	0,973	0,991	0,995	0,992

**Tableau 16:** Coefficient de corrélation Pearson (r) entre les composés phénoliques et l'activité antioxydant par test ABTS

extrait/solvant ( $\mu\text{g/mL}$ )	Méthanol					
	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril
r	0,975	0,996	0,995	0,992	0,992	0,998
	Ethanol					
	0,989	0,986	0,996	0,989	0,995	0,994

### VI-3-2) Corrélation entre l'activité antioxydants dans les extraits méthanoliques et éthanoliques de mélange (Feuilles, Fleurs et Brindilles) de *Thymelaea hirsuta*

Les corrélations entre les antioxydants par des tests DPPH et ABTS entre les extraits méthanoliques et éthanoliques des mois étudiés de mélange de *Thymelaeahirsuta*, Les résultats sont représentés dans les tableaux 17 et 18 justifier que le mois d'Avril le plus riche.

**Tableau 17:** Corrélation entre les activités antioxydants (DPPH et ABTS) des extraits éthanoliques de mélange *Thyméleae hirsuta*

	Nov DPPH	Déc DPPH	Jan DPPH	Fév DPPH	Mar DPPH	Avr DPPH
<b>Nov ABTS</b>	0,988	-	-	-	-	-
<b>Déc ABTS</b>	-	0,985	-	-	-	-
<b>Jan ABTS</b>	-	-	0,972	-	-	-
<b>Fév ABTS</b>	-	-	-	0,973	-	-
<b>Mar ABTS</b>	-	-	-	-	0,986	-
<b>Avr ABTS</b>	-	-	-	-	-	0,991

**Tableau 18:** Corrélation entre les activités antioxydants (DPPH et ABTS) des extraits méthanoliques de mélange *Thyméleae hirsuta*

	Nov DPPH	Déc DPPH	Jan DPPH	Fév DPPH	Mar DPPH	Avr DPPH
<b>Nov ABTS</b>	0,984	-	-	-	-	-
<b>Déc ABTS</b>	-	0,983	-	-	-	-
<b>Jan ABTS</b>	-	-	0,949	-	-	-
<b>Fév ABTS</b>	-	-	-	0,981	-	-
<b>Mar ABTS</b>	-	-	-	-	0,991	-
<b>Avr ABTS</b>	-	-	-	-	-	0,997

## Conclusion et perspectives

Les travaux, *in vitro*, réalisés aussi bien pour la quantification des composés phénoliques que pour l'évaluation du potentiel antioxydant des extraits méthanoliques et éthanoliques, du mélange feuilles, Fleurs et Brindilles de *Thymélaea hirsuta* et récoltés pendant six mois (novembre-avril) montrent que le mois d'avril est le plus favorable pour la récolte.

La nature du solvant d'extraction a affecté les paramètres phytochimiques étudiés. Les composés phénoliques totaux et flavonoïdes et flavonols et les tanins sont très retenus par l'éthanol par rapport le méthanol. Ainsi, l'étude de l'activité antioxydante évaluée par le test DPPH et ABTS et testées surtout les extraits exhibent une activité intéressante. Le mois d'avril montre un potentiel antioxydant intéressant. De même, une bonne corrélation a été obtenue entre ces propriétés et l'évolution des composés phénoliques ; effet dose-dépendance.

Ces travaux préliminaires, réalisés pour la première fois sur le mélange feuilles/leurs et Brindilles de *Thymélaea hirsuta*, peuvent être poursuivis afin de d'apporter des informations supplémentaires sur sa composition phytochimique et l'importance biologique de ses molécules bioactives.

Des essais complémentaires sont nécessaires pour cerner ces travaux. Il serait donc souhaitable de compléter et approfondir ce travail par :

- Une étude phytochimique plus détaillée par la quantification des différentes classes de composés phénoliques (dosage des anthocyanes,.....)
- L'étude des activités antioxydants en utilisant d'autres méthodes telles que celle de FRAP, ORAC, TBARS.....
- Compléter ces travaux par des études portant sur les activités biologiques, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (activité antidiabétique, anti inflammatoire, anticancer.....), après avoir évalué son pouvoir cytotoxique.

Références bibliographiques

- Abdel-Hameed, E.S.S., 2009** . total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.* 114,1271-1277.
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T. 1996** .Advances in development of pharmaceutical antioxidant, *Adv. Drug. Res.*, 28:65-180.
- 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.
- Azza, Z, Marnissi F, Naya A, Benjelloun N, Zamiyati S, Amrani M, et al. 2012** . Toxicological evaluation of *Thymelaea hirsuta* and protective effect against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury in rats. *Int J Biol Chem Sci*, 6: 379–93.
- Amadou, D. 2005** . Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (Myrtaceae). Thèse, Pharmacie, Université de Bamako (Mali).
- Anderson, C.M., Hallberg, A., Hogberg, T., 1996.** Advances in the developpement of pharmaceutical antioxidant drug. *Food Chem*, 28: 65-180.
- Al-Tawaha, G Al-Karaki, A Massadeh.2014.** Variation of chemical composition, antioxidant and total phenols of essential from thyme (*Origanum syriacum* L.) grown under open field conditions and protected soilless condition. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 8 (12):20-26
- Bratt, K., 2000.**Secondary plant metabolites as defense against herbivores and oxydative stress. Synthesis, isolation and biological evaluation. *Acta Univ. Upp:sa*. 55.
- Bakkali et al., 2008.**Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Borri, R.P., Blasko, G.A., 1988.** Enthoppharmacologic and phytochemical studies of the *Thymelaeaceae*. *J. Enthoparmacol.* 24,41-91.
- Baba, K., Tabata, Y., Taniguti, M., Kozawa, M. 1989.**Coumarins from *Edgeworthia chrysantha*. *Phytochemistry*, 28 : 221-225.
- Bruneton, J., Danielle, R., Odile, C., 2007.** Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème Édition botanique. *Pharmacognosie phytothérapie*. Groupe liaisons. Collection porphyre4-4507.

**Bruneton.,1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2ème édition. Lavoisier Technique & Documentation. Paris, 278-279 pp.

**Cowan, M.M.; 1999.** plant products as Antimicrobial Agents.Clin.Microbiol Re, 12 (4):564-582.

**Cavin, 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2ème édition. Lavoisier Technique & Documentation. Paris, 278-279 pp.

**Danelle, N, Puech ,S.,1985.**Taxon,Vol.34,No,4.international association for plant taxonomy (IAPT),pp.611-616.

**Dixon R.A.Paiva N.L., 1995.** Stress induced phenylpropanoid metabolism. Plant cell.7, 2801-2802.

**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.

**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.

**Favier, A., 2003.** Le stress oxydant.Intérêt conceptuel et experimental dans la comprehension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique.*108-115.

**Fouché,J.Maquet ,A et Hambuchés, K . 2000.** les plantes médicinales, de la plante au médicament, Observation du Monde des plantes Sart-Tilman.

**Farnsworth et al., 1986.** variation and the evolution of dioecy in *Thymelaea hirsute*

**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.

**Felix Nwosu,Jennifer Morris, Victoria A.Lund,Derek Stewart,Heather A.Ross,Gordon J,MC Dougall \*,2011.**Food chemistry contents lists available at Science Direct.

**Formica .J.V, et Regelson. W., 1995 .**Reviewof the Biology of quercétin and related Bioflavonoids.*Fd Chem.Toxic.*(33): 1061-1080.

**Hammiche V., 1988.** Systématique et morphologie botanique. Algérie : office des publications.

**Huang et al., 2005.** *Thymelaea hirsuta* (L.) end. Thymelaeaceae. A guide to medecinal plant in northafrica .publié par *ilucn international malaga, spain*

**Harbone, J.B., 1993.** Introduction to Ecological Biochemistry,4<sup>th</sup> Ed. Academic Press: London.

**Iserin P.M., 2001.** Encyclopedia of medecinal plants (2<sup>nd</sup> Edition ed). (T.D.F. Edith ybert, Ed.,&P, Vican,Trans) Larousee – Bordas (1997). ISBN: 2-03-560252-1.P.6-16, 18-53,335p

**Krief S., 2003 .** Métabolites secondaires de plantes et comportement animal :surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de Chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en ougand,activité biologiques et étude chimique de plantes consommées.Thèse de doctorat.PP 346.Muséum national d'histoire naturelle. France.

**Loche,J. 1966 .** Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita,ed). Ann de la direction des études et de l'équipement, France, 3 :15.

**Mohammedi.Z.,2005 .**Etude du pouvir antioxydant de quelques plantes de la region de Tlemcen,Thèse de magistère,l'université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen.

**Nabil, M.A.,1991.** Diversité floristique en Tunisie .In conservation des ressources végétales. Publication de Actes Editions 51-52.

**Reched, w.2009.** Evaluation de potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique . Mémoire de Magister., Univ .Es-Sénia Oran.

**Rizk A.F.M ;Hammouda F.M. et Ismail S.I ., 1974 .** Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*.III.Coumarins.acta chim. Acad .Sci .Hang.85(1),p 107-115.

**Saleh (M.R.I), Haddad (D.Y.), Sarg (T; M).** Isolation of the crystalline principale,thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsute*.-U.Arab Rep.J.Pharm.Sci., 1965,4,49-56.

**Small, E., Catling, P.M.,2000.** Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada.281.

**Sanchez-Moreno C. ,2002.** Review methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems .Food Science and Technology International, 8(3):121-137.

**Zakaria, Z., Aziz ,R., Lachimanan, Y.L., Sreenivason, S., Rathinam ,X.,2008.** Antioxidant activity of *coleus blunei*, *Orthosiphon stamineuse*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from lamiaceae family. Int .J Nat Eng Sci, 2: 93-95.