

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE DE MASTER

En chimie

Spécialité : chimie des produits naturels

INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'ESPECE *THYMELAEA HIRSUTA L.*

Présenté Par :

BELREKA Madina

TAIR Ikram

Devant le jury composé de :

| | | |
|----------------------|--------------------|--------------|
| Mr MEZREG.A MCB | Université blida 1 | Président |
| Mme ESSAID.CH MCB | Université blida 1 | Examinatrice |
| Mme kennouche .S MCB | Université blida 1 | Promotrice |

Blida ,juillet 2022

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu tout puissant qui nous données la force, le courage, la volonté, la patience et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail. Nous voudrions témoigner de nos remerciements et nos gratitude à nous promotrice **MADAME KENNOUCH SAMIRA**, pour la confiance qu'il nous a accordée, son assistance, sa disponibilité, sa compréhension et ses conseils qui m'ont beaucoup aidé à réaliser ce travail.

Nous remercions sincèrement **MONSIEUR SABOR**, responsable de master des produits naturels pour son aide et ses conseils aussi.

Nous exprimons nos sincères gratitude, à **monsieur A.MEZREG** pour l'honneur qu'elle fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Nous adressons nos remerciements à l'égard de **MADAME CH. ESSAID** qui nous ont fait l'honneur d'examiné ce travail.

Merci aussi à tous nôtres amis.

Nous tenons à remercier de tout cœur notre famille pour leur soutien sans faille et permanent qui a été essentiel tout au long de nos études, et tout particulièrement au cours de ce travail.



Dédicace

À mon Dieu, le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.

À ma chère mère pour son soutien infatigable, sa patience admirable.

À mon cher père pour son affection continuelle, qui m'a beaucoup aidé dans ma vie et durant mes études.

À ma sœur : Nadjla.

À mes frères : Faycal, Riadh et Abdelkader.

À mes belles sœurs : Yasmine, Souna et Selma.

À mon nièce : Racim.

À mes amis et toute ma promotion du master de chimie des produits naturels.

Je vous remercie pour votre soutien moral, ta patience et votre dévouement à ce travail.

Belreka Madina



Dédicace

Avant tout grâce à Dieu que je suis arrivé là.

Je dédie ce mémoire à:

Mes parents

A mon cher père "maamer" 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, "Djamila" toutes mes joies, et ma reconnaissance.

A ma sœur "Asma" et sa fille "iness".

À ma belle sœur "yasmine".

A ma petite fille "M".

A mes chères amis "chaima", "miral", "meriem" et "lina".

A toute ma promotion du master de chimie des produits naturels.

Tair Ikram.

Résumé

Notre pays, par sa position géographique, couvre une biodiversité exceptionnelle occupée par d'importantes plantes médicinales, Comme *Thymelaea hirsuta*, est une plante médicinale utilisée dans la pharmacopée traditionnelle algérienne pour le traitement de diverses maladies. Les résultats phytochimiques démontrent que les différents organes constituant une source privilégiée des métabolites secondaires et des molécules biologiquement actives telles que les tanins, les flavonoïdes et les coumarines. Les résultats du rendement d'extraction obtenus sont constatés qu'ils sont variables selon le solvant d'extraction le plus élevé a été obtenu par le méthanol avec 30,05 %, alors que le chloroforme a donné le plus faible taux également à 5,20% la teneur en polyphénols totaux des extraits Méthanolique, Ethanol 100%, Ethanol/ Eau, Acétate d'éthyle de *Thymelaea hirsuta* sont de l'ordre de 234, 314, 261, 253 mgEAG /mg, tandis que celle de l'extrait chloroformique est 249 mg EAG /mg. L'évaluation du pouvoir antioxydant a montré que les différents extraits possèdent un pouvoir antioxydant très important. Cette étude confirme, scientifiquement l'usage traditionnel de cette plante et révèle son intérêt dans le cadre d'une exploitation pharmaceutique.

Mots clés : *Thymelaea hirsuta*, Phytochimie, Activité antioxydant, plante médicinale, métabolites secondaires.

Abstract

Our country, by its geographical position, covered an exceptional biodiversity occupied by important medicinal plants, such as *Thymelaea hirsuta*, are a medicinal plant used in the traditional Algerian pharmacopoeia for the treatment of various diseases. The phytochemical results demonstrate that the various constituent organs are a privileged source of secondary metabolites and biologically active molecules such as tannins, flavonoids and coumarins. The results of the extraction yield obtained are found to be variable depending on the highest extraction solvent was obtained by methanol with 30.05%, while chloroform extract gave the lowest rate also at 5,20%. The content of total polyphenols of the Methanolic, Ethanol 100%, Ethanol/Water, Ethyl acetate extract of *Thymelaea hirsuta* are of the order of 234, 314, 261, 253 mgEAG /mg, while that of the chloroform extract is 249 mg EAG/mg. The evaluation of the antioxidant power showed that the various extracts have a very high antioxidant power. This study confirms, scientifically the traditional use of this plant and reveals its interest within the framework of a pharmaceutical exploitation.

Keywords: *Thymelaea hirsuta*, phytochemistry, antioxidant activity, medicinal plant,

Secondary metabolites.

ملخص

غطت بلادنا، بموقعها الجغرافي، تنوعاً بيولوجياً استثنائياً تحتله نباتا تطبية مهمة، مثل نبات المثنان، وهو نبات طبي يستخدم في دستور الأدوية الجزائرية التقليدية لعلاج الأمراض المختلفة. توضح النتائج الكيميائية النباتية أن الأعضاء المكونة المختلفة هي مصدر متميز للمستقلبات الثانوية والجزئيات النشطة بيولوجياً مثلا لبوليفينول والتانين وفلافونيدات و الكومارين. اثبتت نتائج الاستخراج التي تم الحصول عليها ان الانتاجية تتغير اعتماداً على المذيب. تم الحصول على أعلى معدل استخلاص للميثانول بنسبة 30.05٪، بينما أعطى الكلوروفورم أقل معدل استخلاص 5.20٪. محتوى البوليفينول الكلي للميثانول، الإيثانول 100٪، الإيثانول / الماء، مستخلص ايثيل اسيتات لنبات المثنان بترتيب 234 ، 314 ، 261 ، 253 مجم / EAG مجم ، بينما مستخلص الكلوروفورم هو 249 مجم / EAG مجم .. أظهر تقييم قوة مضادات الأكسدة أن المقططات المختلفة تحتوي على قوة كبيرة جداً من مضادات الأكسدة. تؤكد هذه الدراسة علمياً الاستخدام التقليدي لهذا النبات وتكشف عن اهتمامه في إطار الاستغلال الصيدلاني.

الكلمات المفتاحية: نبات المثنان، كيمياء النبات، نشاط مضاد للأكسدة، نبات طبي، المستقلبات الثانوية.

Les abréviations et unités :

CCM : Chromatographie sur couche mince.

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

EtOH 100% : Ethanol 100% .

Eau/EtOH : Ethanol/eau.

EtOAc : Acétate d'éthyle.

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur du fer

L : Litre

MeOH : Méthanol

MeOH : extrait méthanolique

Mg : Milligramme

ml : Millilitre

mg EAG/g : milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé.

R_f : Rapport frontal

T.hirsuta : *Themelaea hirtusa*.

T.tinctoria: *Themelaea tinctoria*.

T.virgata : *Themelaea virgata*.

T.tartouira L: *Themelaea tartouira*.

T°: Température

UV : Ultraviolet

µg : Microgramme

v/v : Volume/ Volume

%I : Pourcentage d'inhibition

Liste des figures :

| | |
|--|----|
| Figure I.1: Distribution géographique de Thymelaeaceae dans le monde | 5 |
| Figure I.2 : Quelques espèces des Thymelaeaceae. | 6 |
| Figure I.3 : Quelques Structures des flavonoïdes isolés du genre Thymelaea..... | 12 |
| Figure I.4 : Quelques Structures des coumarines isolés du genre Thymelaea. | 14 |
| Figure I.5 : Quelques Structures des lignanes isolés du genre Thymelaea. | 15 |
| Tableau I.8 : Les acides phénoliques isolés du genre Thymelaea. | 15 |
| Figure I.6 : Quelques Structures des acides phynoliques isolés du genre Thymelaea. | 16 |
| Figure I.7 : Quelques Structures des stéroles isolés du genre Thymelaea. | 17 |
| Figure I.8: thymelaea hirsuta L. | 18 |
| Figure I.9 : Distribution de Thymelaea hirsuta dans le monde | 19 |
| Figure I.10: Tige de T.hirsuta L. | 20 |
| Figure I.11 : Feuille de T.hirsuta L. | 20 |
| Figure I.13: Fleurs femelles..... | 20 |
| Figure I.14: Fruit de t.hirsuta L | 21 |
| Figure I.15: Structures des Flavonoïdes isolés de l'espèce T- hirsuta. | 23 |
| Figure I.16 : Structures des terpénoïdes isolés de l'espèce T- hirsuta..... | 24 |
| Figure I.17 : Structures des stéroles isolés de l'espèce T.hirsuta. | 25 |
| Figure I.18 : Les acides phénoliques isolés de l'espèce T- hirsuta | 26 |
| Figure I.19: Structures de coumarines isolées de l'espèce T- hirsuta..... | 27 |
| Figure I.20 : Structures des lignans isolés de l'espèce T.hirsuta..... | 27 |
| Figure 2.2 : Structure chimique de tannins | 33 |
| Figure 2.3 : Squelette de base des coumarines. | 33 |
| Figure 2.4: Structures de base des terpènes | 34 |
| Figure 2.5 : structure de quelques exemples des alcaloïdes..... | 35 |
| Figure 4.1 : Localisation de la commune Ferdjioua dans la wilaya de Mila..... | 43 |
| Figure 4.2 : plante broyée et récupérée dans des flacons en verre | 44 |
| Figure 4.3 : Méthode d'évaporation du solvant. | 47 |
| Figure 4.4 : Etapes du dosage des polyphénols totaux..... | 54 |
| Figure 5.1: Rendements des extraits de Thymelaea hirsuta..... | 59 |
| Figure 5.2: CCM des extraits : extrait EtOH 100% , Eau /EtOH 7/3 , EtOAC ,chlorforme 100% MeOH 100% sous UV à 366nm | 63 |
| Figure 5.3 : CCM des extraits : extrait EtOH 100% , Eau /EtOH 7/3 , EtOAC ,chlorforme 100% MeOH 100%révélés auFeCl3..... | 64 |
| Figure 5.4: CCM des extraits extrait EtOH 100% , Eau /EtOH 7/3 ,EtOAC ,chlorforme 100% , MeOH 100% révélés auAlCl3 | 65 |

| | |
|---|-----------|
| Figure 5.5 : CCM des extraits : extrait EtOH 100% , Eau /EtOH 7/3 , EtOAC ,chlorforme 100% , MeOH 100%révélés auKOH..... | 66 |
| Figure 5.6: CCM des extraits : extrait EtOH 100% ,Eau /EtOH 7/3 ,EtOAC ,chlorforme 100% , MeOH 100%révélés auSbCl3..... | 66 |
| Figure 5.7 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique..... | 68 |
| Figure 5.8: Teneurs des extraits de T.hirsuta..... | 69 |
| Figure 5.9: courbes représentant le % d'inhibition du DPPH des extraits.et d'acide ascorbique..... | 70 |
| Figure 5.10 : Histogramme des valeurs d'IC50 pour l'activité antioxydant | 71 |

Liste des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau I.1 : Quelques utilisations non-médicinales répertoriées des Thymelaeaceae ... | 7 |
| Tableau I.2 : Quelques utilisations médicinales répertoriées des Thymelaeaceae. | 8 |
| Tableau I.3 : Quelques utilisations traditionnelles de genre Tymelaea..... | 9 |
| Tableau I.4 : Quelques effets et activités biologiques reconnues des espèces du genre Thymelaea..... | 10 |
| Tableau I.5: Les flavonoïdes isolés du genre Thymelaea..... | 11 |
| Tableau I.7: les Lignanes isolés du genre Thymelaea. | 14 |
| Tableau I.8 : Les acides phénoliques isolés du genre Thymelaea. | 15 |
| Tableau I.9: Les stérols isolés du genre Thymelaea..... | 16 |
| Tableau I.10 : Quelques utilisations traditionnelles du T.hirsuta. | 22 |
| Tableau 2.1 : Quelques classes de flavonoïdes..... | 31 |
| Tableau 4.1 : les systèmes de solvant testés..... | 52 |
| Tableau 4.2 : la préparation de la solution mère..... | 55 |
| Tableau 4.3 : préparation de la solutions filles..... | 56 |
| Tableau 5.1 : Rendement (%) des extraits des mélanges (feuilles/fleurs/brindilles) de <i>Thymelaea hirsuta</i> L..... | 58 |
| Tableau 5.2 : les résultats de ces tests..... | 60 |
| Tableau 5.3 : La quantification des polyphénols des extraits de T.hirsuta..... | 68 |
| Tableau 5.4 : pourcentage d'inhibition du DPPH à différentes concentration des extraits et d'acide ascorbique..... | 70 |
| Tableau 5.4 : les valeurs d'IC50 pour l'activité antioxydant. | 72 |

Sommaire

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 3 |
| Chapitre I: Rappels bibliographiques | 3 |
| I. 1- Les plantes médicinales | 4 |
| I.1.1- Définition | 4 |
| I.1.2- L'utilisation des plantes médicinales : | 4 |
| I.2- La famille de <i>Thymelaeaceae</i> : | 4 |
| I.2.1- Généralités : | 4 |
| I.2.2- Distribution géographique de la famille <i>Thymelaeaceae</i> : | 5 |
| I.2.3- Description botanique des <i>Thymelaeaceae</i> : | 5 |
| I.2.4- Propriétés chimiques : | 6 |
| I.2.5- effets thérapeutiques | 6 |
| I.2.6- La Toxicité : | 7 |
| I.2.7- Utilisations traditionnelles des <i>Thymelaeaceae</i> : | 7 |
| I.2.8. Classification systématique de la famille <i>Thymelaeaceae</i> [17]. | 8 |
| I.3- Le genre <i>Tymelaea</i> : | 9 |
| I.3.1- Le genre <i>Thymelaea</i> (les passerines) : | 9 |
| I.3.2- Morphologie : | 9 |
| I.3.3- La Composition chimique de genre <i>Tymelaea</i> : | 9 |
| I.3.4- Propriétés pharmacologiques du genre <i>Thymelaea</i> : | 9 |
| I.3.5- les métabolites secondaires isolés de genre <i>Thymelaea</i> : | 10 |
| I.3.5- Les stérols : | 16 |
| I.3.6- Les espèces algériennes du genre <i>Thymelaea</i> : | 17 |
| I.4- L'espèce <i>Thymelaea hirsuta</i> | 18 |
| I.4.1- dénomination et synonyme | 18 |
| I.4.2- Etymologie: | 18 |
| I.4.3- Habitat : | 18 |
| I.4.4- place dans la Systématique : | 19 |
| I.4.5- Description botanique : | 19 |
| I.4.6- Biologie et Ecologie : | 21 |
| I.4.7- L'utilisation traditionnelle : | 21 |
| I.4.8- Les métabolites secondaires isolés de l'espèce <i>T. hirsuta</i>: | 22 |
| Chapitre II : les métabolites secondaires | 28 |

| | |
|---|-----------|
| II.1. Généralité sur les métabolites secondaires | 29 |
| II.2- Classification des métabolites secondaires | 30 |
| II.2.1- Les composés phénoliques..... | 30 |
| II.2.2- Terpénoïdes (Isoprenoides) :..... | 34 |
| II.2.3- Alcaloïdes..... | 34 |
| II.3- Propriétés pharmacologiques des composés phénoliques | 35 |
| Chapitre III : Activités biologiques | 37 |
| III.1- Activité antioxydant | 38 |
| III.2- Les radicaux libres | 38 |
| III.2.1- Généralité..... | 38 |
| III.2.2- Définition..... | 38 |
| III.3- Les antioxydants..... | 38 |
| III.3.1- Mécanisme d'action | 39 |
| III.3.2- Classification des antioxydants | 39 |
| III.4- Le stress oxydatif..... | 40 |
| III.4.1-Définition..... | 40 |
| III.4.2- Origine du stress..... | 40 |
| III.4.3- Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant | 40 |
| Chapitre IV: Matériels et méthodes | 42 |
| IV.1- Site d'échantillonnage | 43 |
| IV.2- Matériel végétal | 43 |
| IV.3- Méthodes | 44 |
| IV.3.1- Extraction..... | 44 |
| IV.3.2- Evaporation..... | 46 |
| Mode opératoire | 47 |
| IV.4- Analyse phytochimique..... | 47 |
| IV.4.1- analyse qualitative (Screening phytochimique) | 47 |
| IV.4.2- Analyse quantitative..... | 49 |
| IV.5- Chromatographie sur couche mince (CCM) : | 50 |
| IV.6- Dosage des composés phénoliques..... | 53 |
| IV.7- Activité antioxydant : | 54 |
| V.2- Tests phytochimiques | 60 |
| V.3- Chromatographie sur couche mince CCM:..... | 63 |
| V.3.1- Identification des tannins et polyphénols dans les extraits..... | 63 |

| | |
|--|----|
| V.3.2- Identification des flavonoïdes dans les extraits | 64 |
| V.3.3- Identification des coumarines dans les extraits | 65 |
| V.3.4-Identification des diterpènes dans les extraits :..... | 66 |
| V.4- Dosage des composés phénoliques | 67 |
| V.5- Activité antioxydante :..... | 69 |
| <i>Reference</i> | 75 |
| Annexes | 84 |
| Annexe 1 : Réactifs chimique et appareillages utilisé. | 85 |
| Annexe 4:Préparation du DPPH..... | 86 |
| Annexe5:Préparation de Réactif de Dragendorff: | 86 |
| Annexe 5 : Résultats d'activité antioxydant des extraits de <i>Thymelaea hirsuta</i> | 87 |
| Annexe 6 : Résultats de dosage des polyphénols..... | 87 |



INTRODUCTION

AU travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des vertus des plantes pour le traitement des maladies ne date pas d'aujourd'hui il est ancestral [1].

Le développement de la chimie moderne vers la fin du XIXe siècle et la découverte de nouveaux médicaments puissants comme les antibiotiques a fait évincer la phytothérapie de sa place comme remède de premier plan en particulier dans les pays développés, tandis que dans d'autres pays du monde, elle n'a cessé d'être le moyen de guérir de nombreuses maladies. Le temps et la science ont donné raison aux millions d'êtres humains qui se sont soignés avec des plantes médicinales depuis longtemps, en raison de l'absence d'effets secondaires comparés aux médicaments. Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments [2].

Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes [3].

Le progrès scientifique et technique a fait de la phytothérapie un domaine à part dans la recherche et le développement de nouvelles formes thérapeutiques et galéniques encore plus sûres et plus efficaces. Dans un autre domaine celui de l'industrie alimentaire, deux antioxydants de synthèse le butyl hydroxytoluène et le butyl hydroxyanisole sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour prévenir la détérioration des aliments. Bien que ces antioxydants synthétiques montrent une activité antioxydante plus puissante que celle des antioxydants naturels comme l'acide ascorbique et l' α -tocophérol [3], il y a une préoccupation concernant leurs effets néfastes sur la santé, car ils peuvent être impliqués dans les dommages hépatiques et la carcinogénèse [4].

L'Algérie ce pays immense recèle un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un rôle

important dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmacie, et phytothérapie [5].

Afin d'exploiter ces potentialités nationales, beaucoup de chercheurs se sont intéressés au domaine de la phytochimie. Notre travail se propose d'approfondir les connaissances sur une famille botanique méconnue: les *Thymelaeaceae*, l'espèce *Thymelea hirsuta*

Le premier chapitre sera consacré à une présentation botanique de la famille des *Thymelaeaceae* et le genre *Thymelea*. Ce chapitre se poursuit par des résultats de travaux antérieurs relatifs à l'espèce *Thymelea hirsuta*

Le deuxième chapitre contient une étude chimique impliquant la définition, la structure, la classification, et l'activité biologique des métabolites secondaires

Le troisième chapitre décrivant nos travaux personnels, qui consiste à présenter les techniques expérimentales d'extraction des métabolites secondaires, de la mise en évidence de ces métabolites secondaires par la chromatographie sur couche mince , d'estimer les teneurs en composés phénoliques des extraits préparés et d'évaluer leurs pouvoir anti-radicalaire par le DPPH. .Le quatrième chapitre qui renferme la discussion des résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble de résultats obtenus.



***Chapitre I: Rappels
bibliographiques***

I. 1- Les plantes médicinales

I.1.1- Définition

Les plantes médicinales sont définies par la pharmacopée française, comme des « drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques. En d'autre terme nous pouvant dire qu'une plante médicinale est une plante qui contienne une ou des substances pouvant être utilisés à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogue utiles. Le groupe consultatif de L'OMS qui a formulé cette définition affirme également qu'une telle description permet de distinguer les P.M dont les propriétés thérapeutiques et les composants ont été établis scientifiquement des plantes considérées comme médicinales, mais qui n'ont pas encore fait l'objet d'une étude scientifique consciencieuse [6]. Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains [7].

I.1.2- L'utilisation des plantes médicinales :

Ces plantes sont utilisées principalement dans les zones rurales par les personnes de troisièmes âges. Les grands types d'usages des plantes médicinales et aromatiques par l'homme sont cosmétiques (astringentes, adoucissantes, cicatrisantes, capillaires, pigmentaires, condimentaires [8].

I.2- La famille de *Thymelaeaceae* :

I.2.1- Généralités :

Les Thymelaeaceae sont une petite famille de dicotylédones composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres, bien que certains auteurs n'en répertorient qu'une cinquantaine. Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids [9].

I.2.2- Distribution géographique de la famille *Thymelaeaceae* :

La famille des *Thymelaeaceae* sont répartis dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids [9].

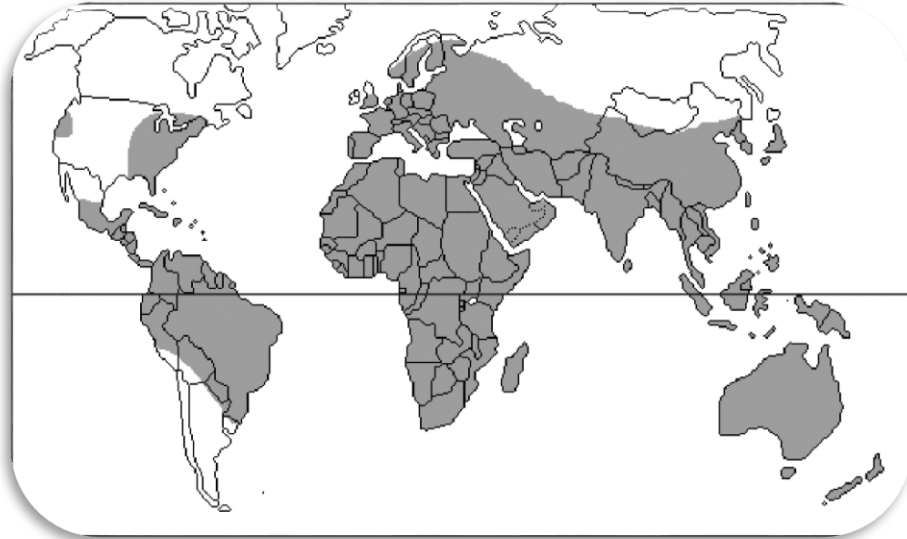


Figure I.1 [10].

I.2.3- Description botanique des *Thymelaeaceae* :

Les *Thymelaeaceae* sont principalement des arbustes et leurs caractères morphologiques principaux sont les suivants [10] :

- feuilles : alternes (rarement opposées).
- fleurs : régulières, géni. Bisexuées, pièces florales normalement par 4 ou 5. regroupées en racèmes, en capitules ou en fascicules. En forme de coupe, le réceptacle creux formant un tube profond dont le bord porte généralement les pièces florales. sépales pétaloïdes, apparaissant comme une continuité du tube, étamines insérées dans le tube et corolle insignifiante ou absente, ovaire supère à style simple, fixé à la base du réceptacle, possédant 1 ou 2 (rarement 3 à 8) carpelles soudés, avec autant de loges renfermant chacune 1 ovule pendant axile ou pariétal.
- fruit : akène, baie, drupe ou parfois capsule, graine possédant peu ou pas d'albumen, embryon droit.
- Les Principaux genres :



T.hirtusa



Dophne cneorum



Dophne loureola



T.tinctoria



T.virgata



T.tartonraira

Figure I.2

I.2.4- Propriétés chimiques :

Plusieurs espèces de la famille des *Thymelaeaceae* contiennent, en diverses proportions, deux principes chimiques : la mézéréine, une substance résineuse d'un jaune brunâtre, de constitution encore inconnue, très vénéneuse, irritante, âcre, amère, drastique, vésicante et sternutatoire. Et la daphnine, un glucoside non vénéneux, à saveur amère, astringente [11].

I.2.5- effets thérapeutiques

Les extraits de cette plante possèdent des effets anti mélanogénèse dus aux daphnanes.

Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés antiseptique, hypoglycémique, anti-hypertension, contre les affections de la peau (dermatoses). C'est aussi une source de fibres à papier [12].

I.2.6- La Toxicité :

La toxicité des *Thymelaeas* est bien établie pour les êtres humains, aussi bien que pour de nombreuses espèces animales. En effet, les diterpènes de type tigliane et daphnane sont des purgatifs violents qui déclenchent, par contact avec la peau ou les muqueuses, une réaction inflammatoire intense.

Le contact externe avec du matériel végétal provenant de certaines *Thymelaeaceae* provoque des dermatites inflammation des lèvres, de la langue et du pharynx, sécheresse buccale suivie de salivation, déglutition difficile, soif, rhinite, inflammatoires avec des rougeurs, des vésicules guérissant lentement et des pustules qui tendent à s'ulcérer. De plus, ces symptômes sont accompagnés de démangeaisons intenses. Ces symptômes sont suivis de convulsions et le pronostic est fatal dans 20-25 % des cas [13].

I.2.7- Utilisations traditionnelles des *Thymelaeaceae* :

I.2.7.1- Utilisations non-médicinales :

Le bois de certains genres de la famille est, quant à lui, utilisé pour la production de matériaux de construction et d'objets ornementaux. De plus, de nombreuses espèces possèdent une écorce fibreuse qui sert à la fabrication de papier et de corde. En Inde, en Chine et en Indonésie, le bois de certaines espèces d'*Aquilaria* infecté par un champignon est vendu comme bois odorant et on en tire également de l'encens.

Tableau I.1 : [9].

| Plante | Partie | Utilisation | Région |
|-----------------------|---------------|--------------------|---------------|
| G. macrophyllus | Bois | Bois odorant | Indonésie |
| Lagetta linearis lam. | Ecorce | Décoration | Antilles |

I.2.7.2. Utilisations médicinales :

Les médecines traditionnelles d'un grand nombre de cultures utilisent des *Thymelaeaceae* pour la préparation de traitements d'une gamme très étendue de troubles. Les emplois comme émétique, purgatif, vésicant et pour le traitement de maladies de la peau, sont des exemples de l'utilisation des effets toxiques de ces remèdes traditionnels. Dans ces

applications, les doses sont cependant faibles, afin de favoriser l'effet bénéfique par rapport aux effets secondaires. Les bases de l'utilisation de ces plantes dans le traitement d'autres maux, tels que morsures de serpents, piqûres de scorpions, malaria et affections ophtalmiques, ne sont pas claires [9].

Tableau I.2 : [9][14][15][16].

| Plante | Partie | Utilisation | Région |
|----------------------------|---------------|---|-----------------------------|
| A.gymnostachys C.A Mey. | Feuille | Fumée contre les maux de tête | Afrique |
| A.polycephalus C.A Meyb | Racine | Asthme Décoction contre le « lamsiekte » (botulisme du bétail) | Afrique Afrique australe |
| Daphne gnidium l | Ecorce | Hépatite | Tunisie |

I.2.8. Classification systématique de la famille *Thymelaeaceae* [17].

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Sous-embranchement : Angiospermae.

Classe : Eudicotyledonae.

Sous-Classe : Rosidae.

Ordre : Malvales.

Famille : Thymelaeaceae.

Sous-Famille : Thymelaeoideae.

Tribu : Gnidiaceae.

Genre : Thymelaea

I.3-Le genre *Tymelaea* :

I.3.1- Le genre *Thymelaea* (les passerines) :

Les passerines sont très voisines des Daphnés, contiennent comme eux des principes toxiques [11]. Ce genre renferme plusieurs espèces intéressantes, mais celles qui figurent parmi les plus communes en Algérie sont : *T. hirsuta* L, *T. microphylla* C. et D. et *T. passerina* (L. (Langue de Moineau) [18].

I.3.2- Morphologie :

Ce sont des herbes ou des arbrisseaux bas à feuilles et fleurs très petites, les premières larges de quelques millimètres, les secondes peu apparentes, jaunâtres ou verdâtres, sans corolle, à 4 sépales et 8 étamines très courtes [11].

I.3.3-La Composition chimique de genre *Tymelaea* :

Le genre *Thymelaea* contient des hétérosides flavoniques, des flavones, terpènes, stigmasterol, daphnoretine, et kaempférol, campestérol et tanins qui donnent des propriétés anti hyperglycemiantes qui pourraient avoir une utilisation dans le traitement du diabète [19].

I.3.4- Propriétés pharmacologiques du genre *Thymelaea* :

I.3.4.1- Utilisation en médecine traditionnelle :

La recherche bibliographique menée sur l'intérêt biologique des espèces du genre *Thymelaea* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer dans le tableau suivant quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique.

Tableau I.3.

| L'espèce | L'utilisation | Pays | Références |
|----------------------|---|-------------|-------------------|
| <i>T. lythroides</i> | très utilisée pour combattre différents maux : mal de la vessie et des reins, douleurs gastriques | Maroc | [20] |

| | | | |
|----------------------|--|---------|------|
| | et intestinales, rhumatismes, migraines. | | |
| <i>T. lythroides</i> | comme antiseptique, anti inflammatoire et pour le traitement de l'hypertension | Tunisie | [21] |

I.3.4.2-Quelques activités biologiques des espèces du genre *Thymelaea* :

L'activité et l'effet biologique de quelques espèces du genre *Thymelaea* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau I.4 .

| Espèces | Effet et activité biologique | Références |
|-----------------------|---|------------|
| <i>T. microphylla</i> | Activités antioxydants | [22] |
| <i>T. lythroides</i> | Activité antifongique | [23] |
| <i>Daphne gnidium</i> | Activité antiseptiques, insecticides, dépuratives, cicatrisantes, sudorifiques et abortives | [24] |

I.3.5- les métabolites secondaires isolés de genre *Thymelaea* :

Les métabolites secondaires des plantes appartenant au genre *Thymelaea*, sont très nombreux, La plupart des substances naturelles appartiennent au grand groupe des composés polyphénoliques et plus précisément aux flavonoïdes et acides phénoliques. On retrouve également quelques composés de la famille des stérols, des lignanes et des coumarines.

I.3.5.1- Les flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux de la famille des polyphénols qui sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils donnent souvent une coloration jaune. Du point de vue chimique, ils possèdent deux cycles benzéniques. Les flavonoïdes ont été découverts par Albert Szent-Györgyi. Ils existent le plus souvent sous forme d'hétérosides dont la génine du 2-phényl chromane ou flavane [26].

Tableau I.5.

| Composés | Espèces | Références |
|-----------------------------------|-----------------------|------------|
| Tiliroside | <i>T.lythroides</i> | [27] |
| Orientine | <i>T.tartonraira</i> | [28] |
| Daphnodorine B | <i>T.microphylla</i> | [29] |
| Isoorientine | <i>T. tartonraira</i> | [28] |
| Vitexine | <i>T. tartonraira</i> | [28] |
| vicénine-2 | <i>T. tartonraira</i> | [28] |
| Kaempférol | <i>T. tartonraira</i> | [28] |
| 5-O-β-D-primeverosyl genkwanin | <i>T. tartonraira</i> | [28] |
| Neochamaejasmin B | <i>T. microphylla</i> | [29] |
| Neochamaejasmin A | <i>T. microphylla</i> | [29] |
| Genkwanol A | <i>T. microphylla</i> | [29] |
| Stelleranol | <i>T. microphylla</i> | [29] |

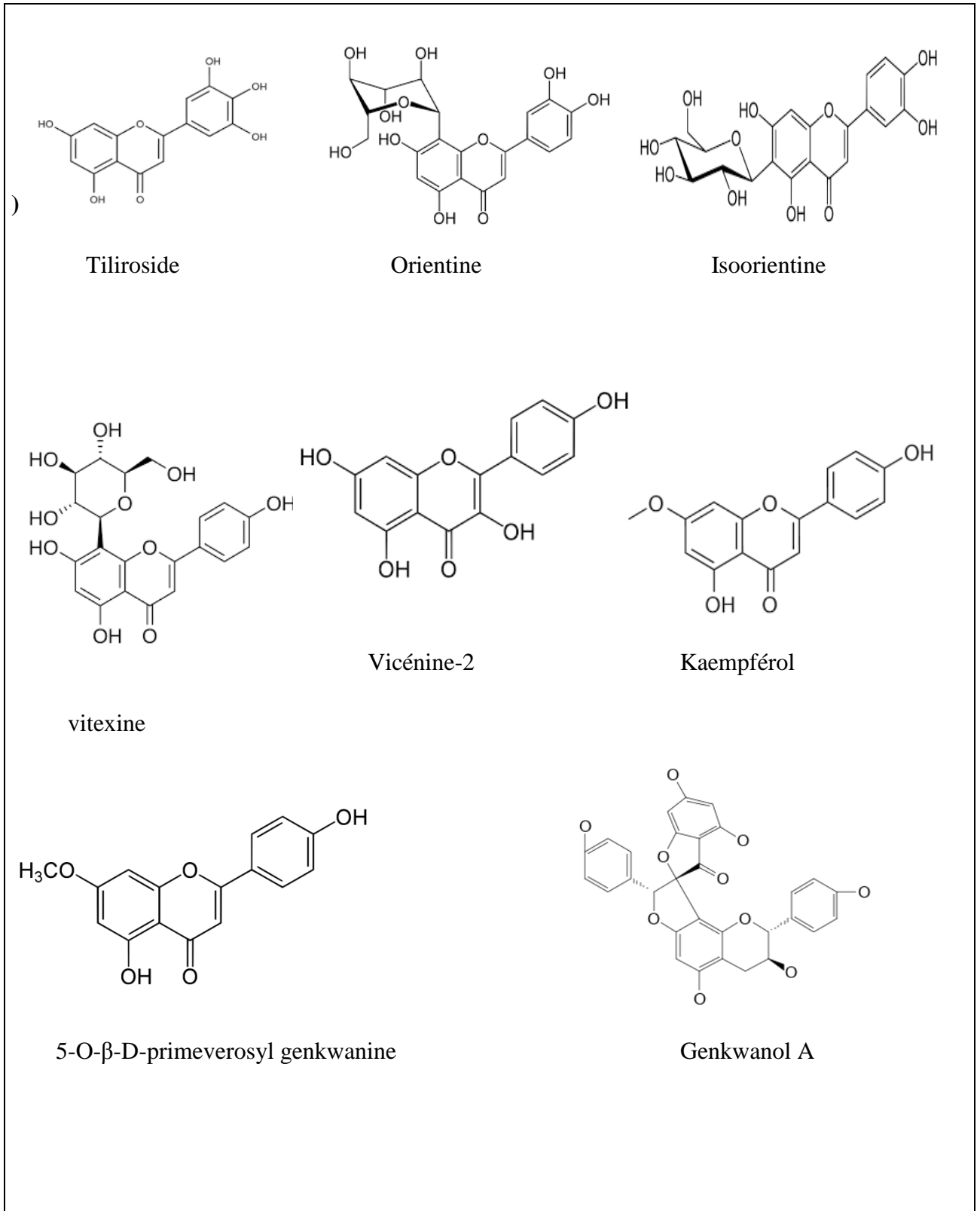


Figure I.3

I.3.5.2- Les coumarines :

La coumarine est un composé chimique organique appartenant à la famille des benzopyrones, dont le nom selon l'IUPAC est 2H-1-benzopyrane-2-one. Dans son état normal (standard), elle est caractérisée par une structure cristalline et incolore. Différents résidus peuvent être ajoutés à ce squelette formant la famille des coumarines. Les coumarines sont considérées comme un groupe de métabolites secondaires des plantes [26].

Tableau I.6

| Composés | Espèces | Références |
|------------------------|-----------------------|------------|
| Coumarine | <i>T.microphylla</i> | [30] |
| Daphnorétine | <i>T.microphylla</i> | [31] |
| Daphnoside | <i>T.microphylla</i> | [32] |
| 6-O-methylesculetine | <i>T. microphylla</i> | [32] |
| 7-Hydroxycoumarine | <i>T. microphylla</i> | [32] |
| Aesculétine | <i>T. microphylla</i> | [32] |
| 7,8-Dihydroxycoumarine | <i>T. microphylla</i> | [32] |

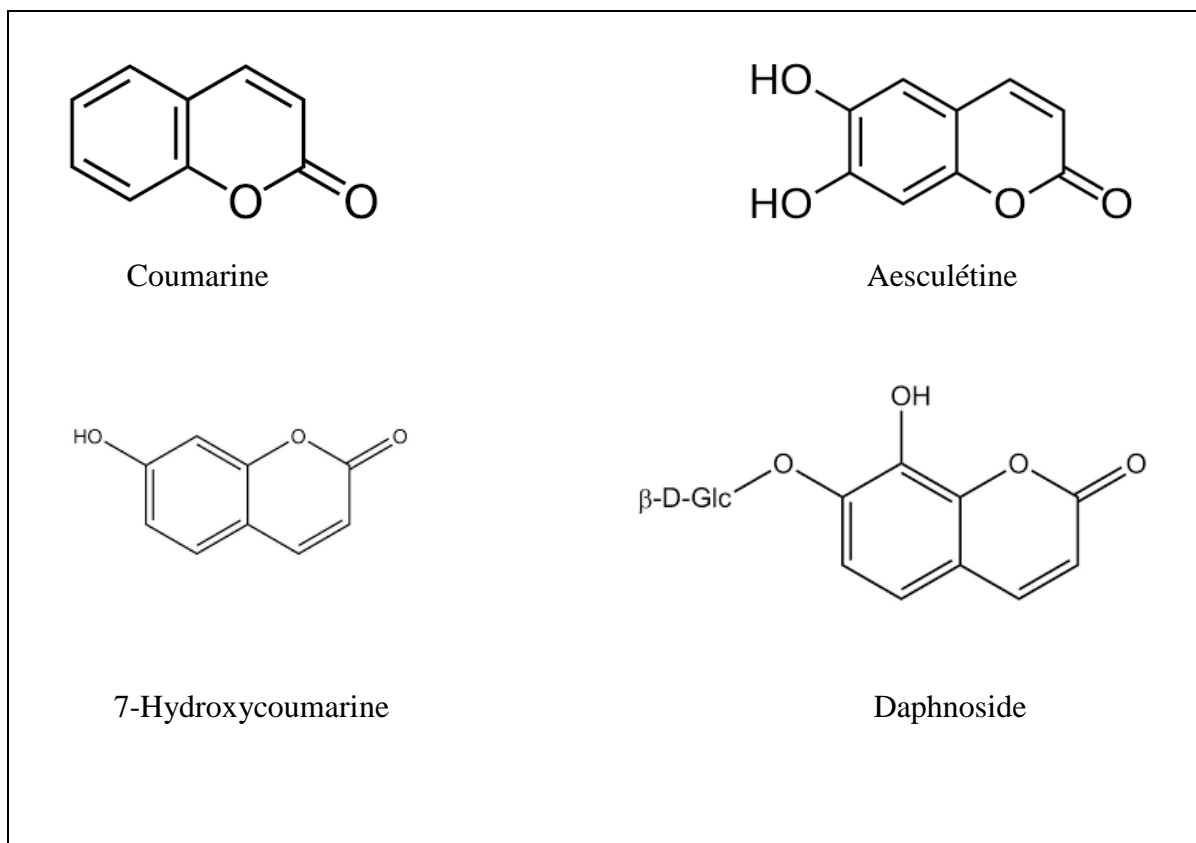


Figure I.4

I.3.5.3- Les lignanes :

les lignanes sont des composés polyphénoliques qui ont des activités anti-oxydantes et anticancéreuses ainsi que de faibles activités ostrogéniques et anti-ostrogéniques [33][34].

Le lin est la céréale la plus riche en lignanes [35].

Tableau I.7

| Composés | Espèces | Références |
|---|-----------------------|------------|
| Phyllyrine | <i>T. microphylla</i> | [22] |
| Syringaresinol-4-O- β -Dglucopyranoside | <i>T. microphylla</i> | [22] |
| lariciresinol-4'' -O- β - D - glucopyranoside | <i>T. microphylla</i> | [22] |

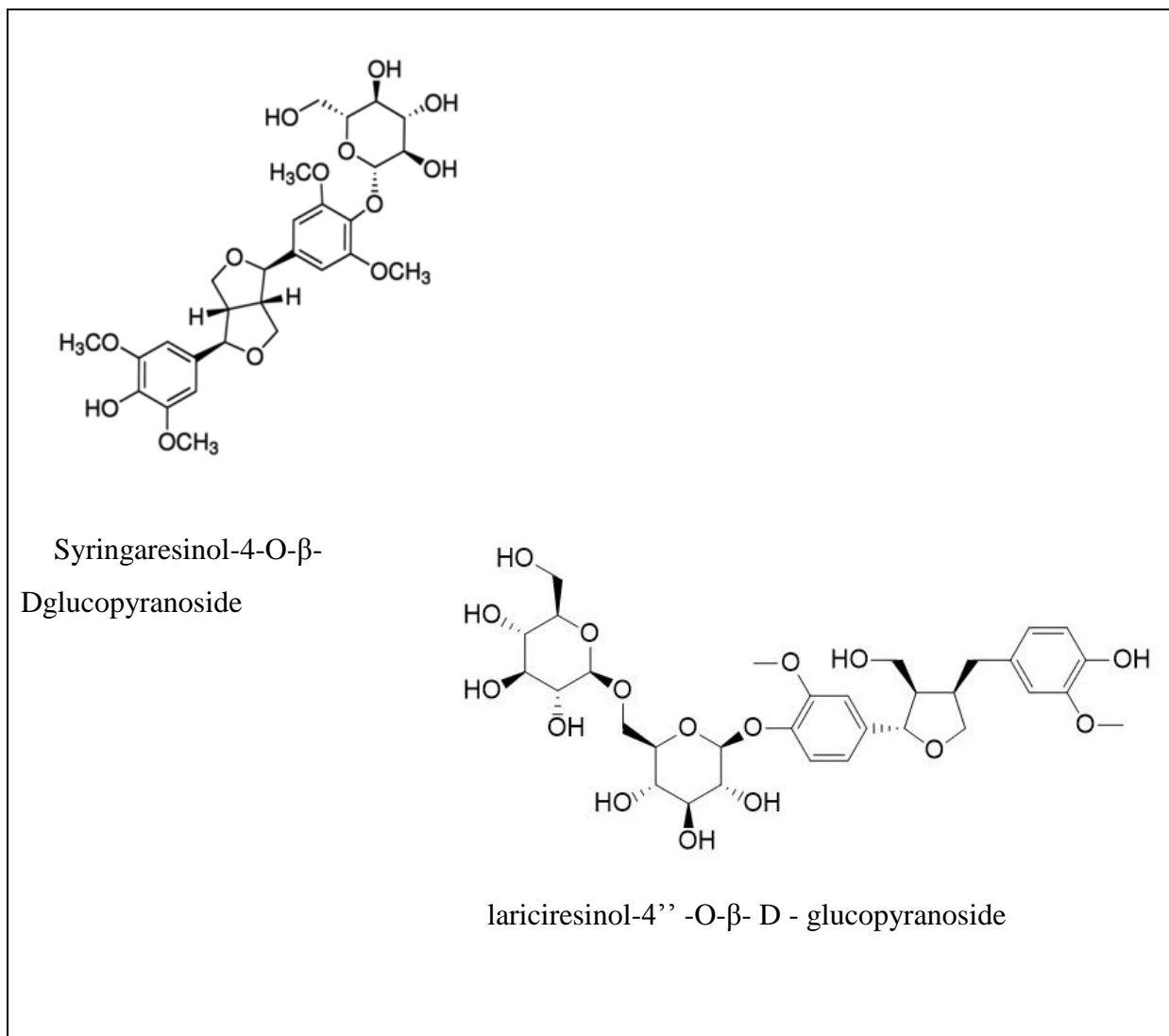


Figure I.5

I.3.5.4- Les acides phénoliques :

Un acide phénolique ou acide-phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique [26].

Tableau I.8

| Composés | Espèces | Références |
|------------------------------|-----------------------|------------|
| Acide 3,4-dihydroxybenzoïque | <i>T. microphylla</i> | [22] |
| Acide oleanolique | <i>T. microphylla</i> | [33] |

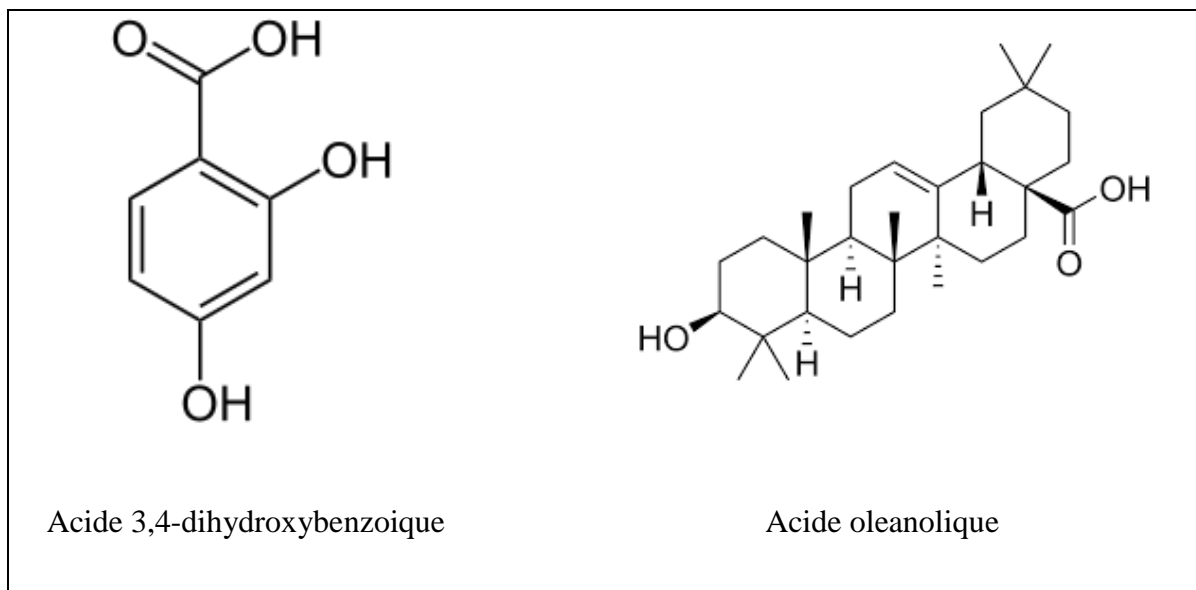


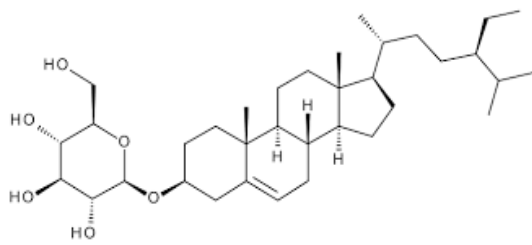
Figure I.6

I.3.5-Les stérols :

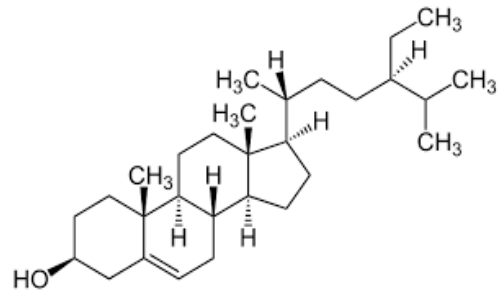
Un stérol est un lipide possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Les stérols sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes. Les stérols est présente chez les animaux et les végétaux. Ils sont des constituants essentiels des membranes des cellules [26].

Tableau I.9: Les stérols isolés du genre *Thymelaea*.16

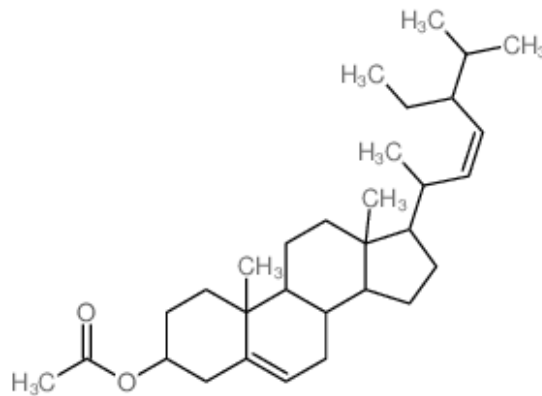
| Composés | Espèces | Références |
|---|-----------------------|------------|
| β -Sitosterol-3-O-glucoside | <i>T. microphylla</i> | [33] |
| β -sitosterol | <i>T. microphylla</i> | [33] |
| Stigmasta-5,22-dien-3-ol, (3 β ,22E) | <i>T. passerina</i> | [33] |



β -Sitosterol-3-O-glucoside



β -sitosterol



Stigmasta-5,22-dien-3-ol, (3 β ,22E)

Figure I.7

1.3.6- Les espèces algériennes du genre *Thymelaea* :

Ce genre renferme plusieurs espèces intéressantes, mais celles qui figurent parmi les plus communes en Algérie sont : *T.hirsuta* L., *T.microphylla* C.et D. et *T.passerina* (L.) Langué [18]. *T.hirsuta* (La passerine cotonneuse) est une espèce méditerranéenne, commune dans toute l'Algérie septentrionale, notamment sur le littoral. Elle est utilisée en médecine populaire comme purgatif et comme résolutif. En outre, elle est considérée comme abortive. Cette plante est signalée comme très toxique [18]. *T.passerina* (Langue de Moineau) est une plante annuelle effilée, à feuilles et fleurs espacées au long d'une tige de 20 à 50cm, qui se rencontre dans les moissons des terrains arides. Si grêle qu'elle soit, elle est assez rigide pour servir à former des Balais. Elle est assez commune en général, mais surtout en terrain calcaire. Cette plante est vénéneuse, mais il semble bien que rien n'est connu sur son principe toxique [11].

I.4- L'espèce *Thymelaea hirsuta*

I.4.1- dénomination et synonyme

T.hirsuta : nommée par les anglophones 'spur flax' ou 'gnidium', en arabe 'mathnan' en égyptien 'mithnan', en Espagne connue sous le nom de 'aulaga', 'boja marina' ou encore 'boalaga'.



Figure I.8

I.4.2- Etymologie:

Thymelaea : ce nom de genre vient directement du grec [θυμ·ελαία] = thyméléa. Une plante de la famille des Thyméléacées était déjà connue des anciens qui l'utilisaient pour les vertus laxatives de ses baies.

Hirsuta : du latin [hirsutus] = hérissé, avec des piquants. Adjectif souvent attribué aux espèces velues.

I.4.3-Habitat :

Sous-arbrisseau de 40 cm à 1 mètre, très-rameux, à rameaux étalés ou pendants, blancs-tomenteux, feuilles dans toute leur longueur ; feuilles imbriquées, petites (4-6 mm sur 2), ovales, obtuses, non atténuées à la base, épaisses, concaves et blanches tomenteuses en dessous, sans nervures ; fleurs polygames-dioïques, jaunâtres, sans bractées, réunies 2-5 au sommet des rameaux ; périanthe à la fin caduc, soyeux en dehors, long de 4-5 mm, à lobes ovales-obtus, égalant presque le tube ; fruit ovoïde, glabre, à la fin nu.

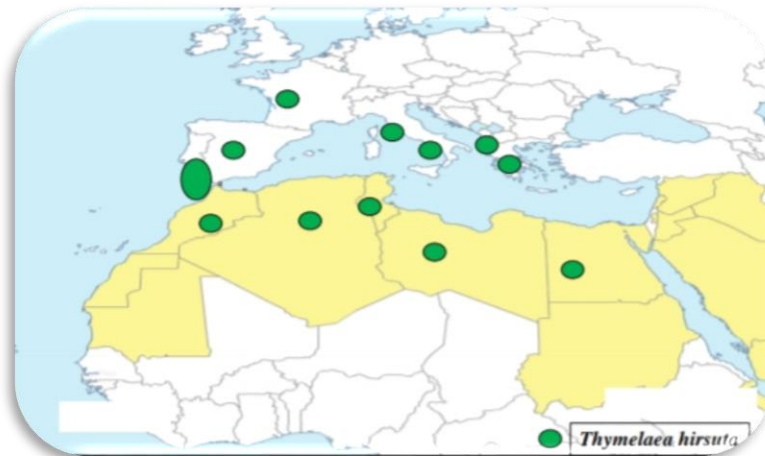


Figure I.9

I.4.4- place dans la Systématique :

La plante *T.hirsuta* est classée comme suit :

Règne : Végétale

Sous règne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida ou Dicotylédones

Sous classe : Rosidae

Ordre : Malvales

Famille : Thymelaeaceae

Genre : Thymelaea

Espèce : *T. hirsuta* (L.)[34].

I.4.5- Description botanique :

I.4.5-a)-Tige :

Tiges très ramifiées et pendantes Jeunes rameaux recouverts d'un duvet épais



Figure I.10 [35]

I.4.5-b)- Feuille:

C'est un arbrisseau aux rameaux garnis de petites feuilles imbriquées, de $3-8 \times 1,5-4$ mm, ovales à lancéolées, charnues ou coriaces, brillantes dont la face inférieure est blanchetomentueuse.



Figure I.11 [35]

I.4.5-c)-Fleur :

La plante porte sur des pieds différents soit des fleurs unisexuées soit des fleurs hermaphrodites. Ces fleurs sont rassemblées par 2 à 5 en glomérules. La floraison va d'octobre à avril



Figure I.13 [35].



Figure I.12 [35].

I.4.5-d)-Fruit : Le fruit est glabre, de forme ovale.



Figure I.14 [35].

I.4.6-Biologie et Ecologie :

T.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, *T.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 répartition, les éléments nutritifs de *T.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 *T.hirsuta*[32].

I.4.7- L'utilisation traditionnelle :

-*T.hirsuta*, plante utilisée en médecine traditionnelle arabe pour traiter : les ascaris et les oxyures.

- les feuilles séchées broyées ont été utilisés pour traiter les infections de la peau et de l'écorce de contribuer à la guérison des plaies [32], car les extraits de *T.hirsuta* possèdent

des effets anti mélanogénèse dus aux daphnanes pour ses propriétés antiseptique hypoglycémique, anti-hypertension, elle est utilisée en médecine traditionnelle [36].

- la suppression des dents pourries où bouillir les feuilles dans l'eau et le rinçage de la bouche sont ensuite lui crachait avec des dents pourries.

- prévenir les avortements chez les chameaux.

- les chercheurs disent qu'ils ont été en mesure de séparer le matériau de *T.hirsuta* et le stigmasterol est un stéroïde utilisé pour la fabrication de la progestérone, une hormone utilisée dans le traitement des fausses couches à répétition chez la femme [32].

- C'est aussi une source de fibres à papier [36].

Tableau I.10

| L'espèce | L'utilisation | Pays | Références |
|------------------|--|---------|------------|
| <i>T.hirsuta</i> | la partie aérienne est utilisée comme décoction dans le traitement du diabète | Maroc | [37] |
| <i>T.hirsuta</i> | Il est recommandé par les herboristes dans le traitement de maladies humaines (Leishmanicide, vermifuge, eczéma) dans la région de M'Silla | Algérie | [38] |

I.4.8- Les métabolites secondaires isolés de l'espèce *T. hirsuta*:

Des travaux effectués sur l'espèce *T.hirsuta* permis d'isolés des composés polyphénoliques et plus précisément des flavonoïdes et acides phénoliques. On retrouve également quelques composés de la famille des stérols, des lignanes et des coumarines.

1.4.8.1. Flavonoïdes :

Une étude phytochimiques menée sur les parties aériennes de l'espèce *T.hirsuta* a permis d'isoler et d'identifier les flavonoïdes suivantes : des mono- et bi-flavonoïdes comme genkwanin, genkwanine 5-O- β -D-glucopyranoside, genkwanine 5-O- β -D-primeveroside, trans-tiliroside et néochamaejasmine B de *T.hirsuta*[39].

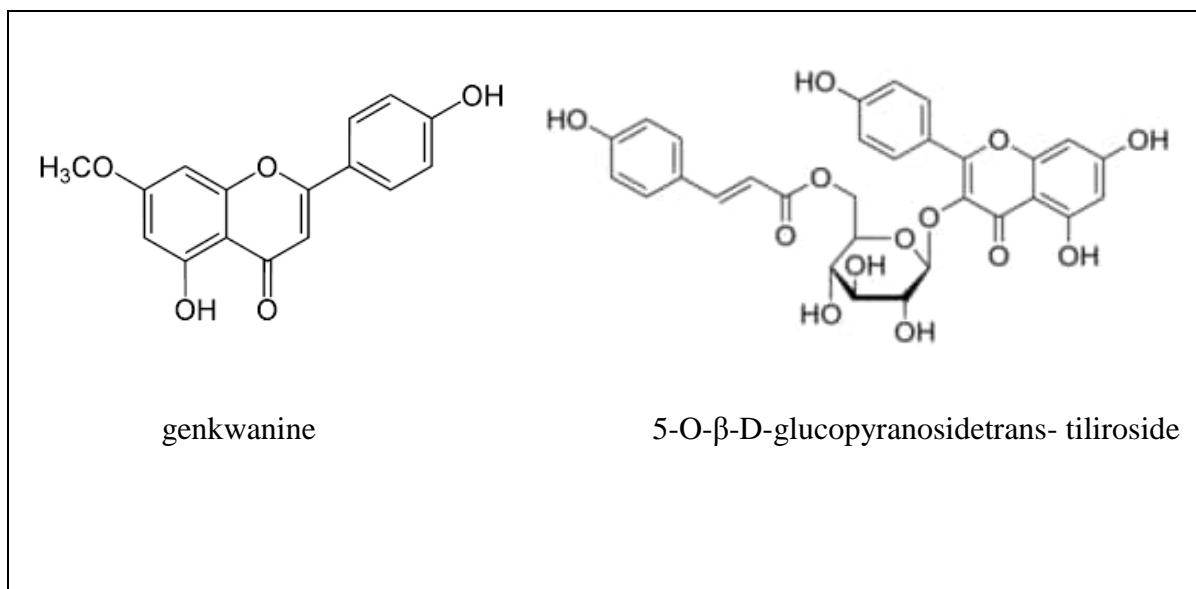


Figure I.15

1.4.8.2. Composés terpénoïdes :

Des travaux réalisés sur l'extrait de parties aériennes de *T.hirsuta* ont permis d'isoler deux nouveaux diterpénoïdes de daphnane, hirsein A, et hirsein B. [40].

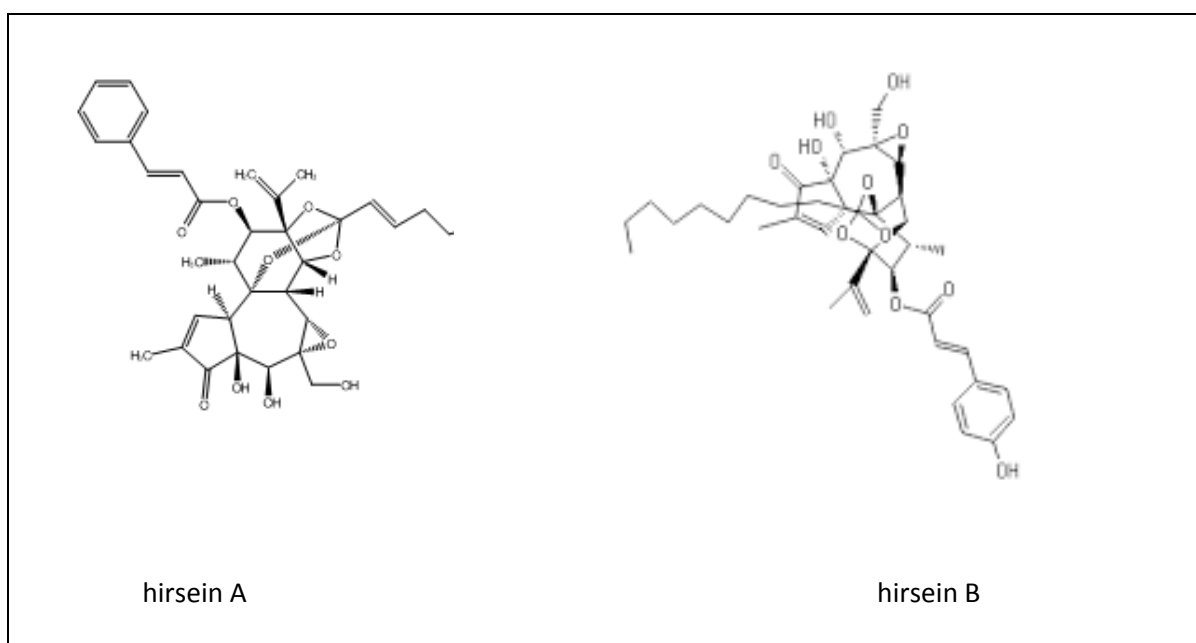
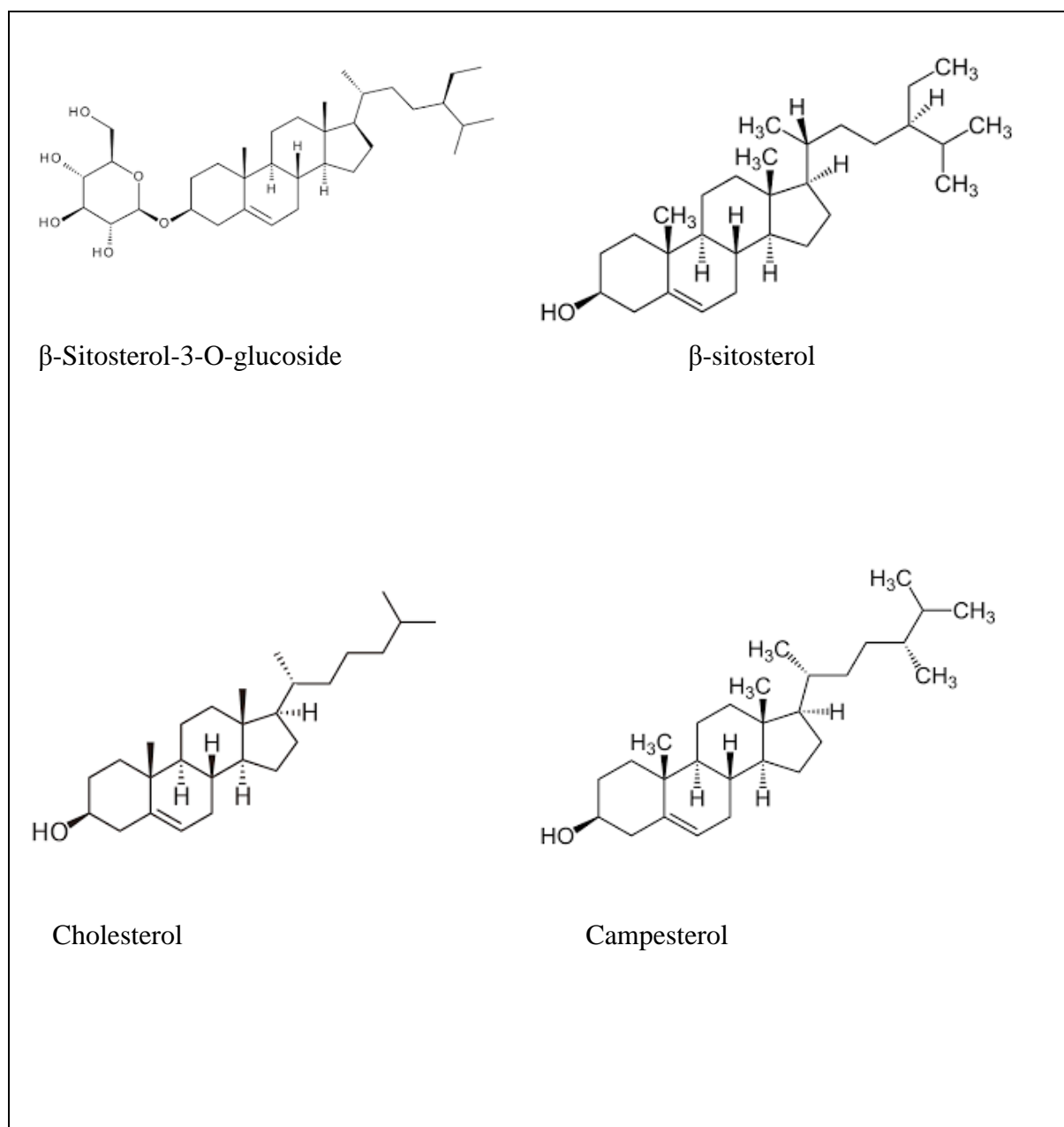


Figure I.16

I.4.8.3. Les stérols :

D'autres études effectuées sur les feuilles et les fleurs de cette espèce ont permis d'obtenir sept composés stéroïdes à savoir : β -Sitosterol-3-O-glucoside ,[31], β -sitosterol [41], Stigmasta-5,22-dien-3-ol,(3 β ,22E) [41], Campesterol [32], Cholesterol [42], Lanosterol [42], Nimbosterol [42].



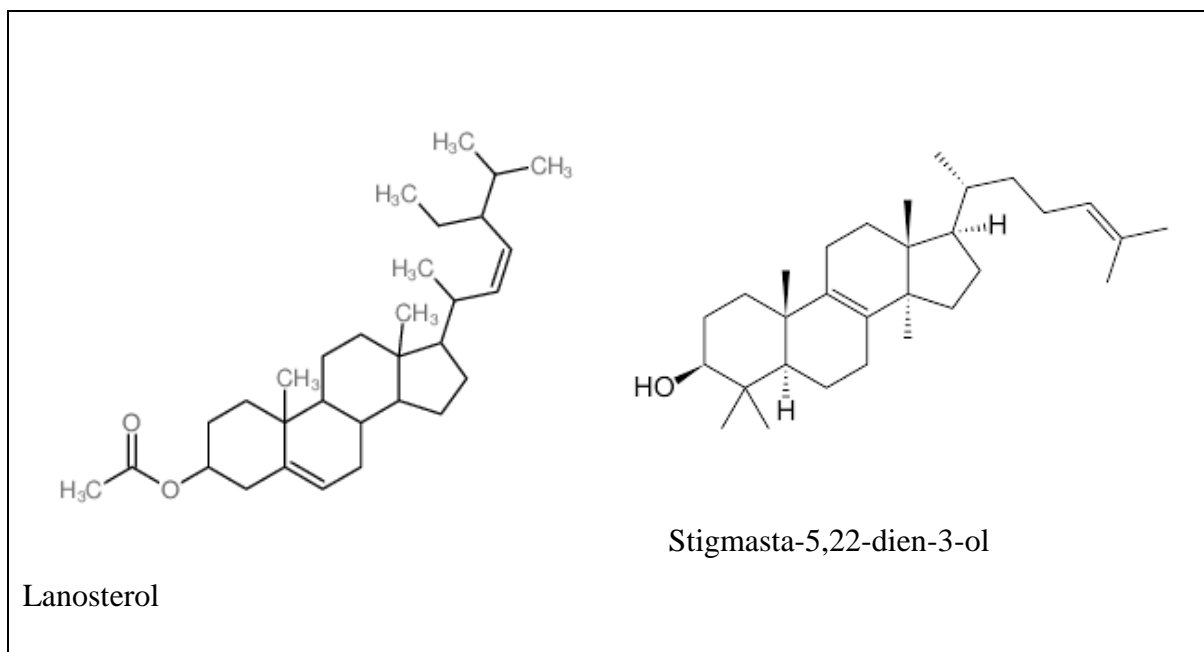
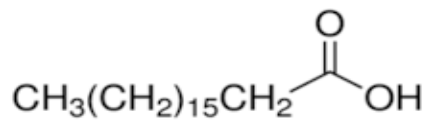


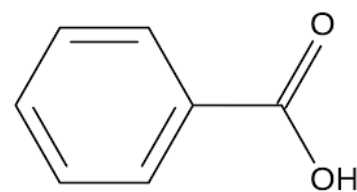
Figure I.17

I.4.8.4. Acide phénolique :

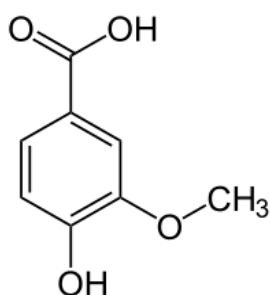
Des études réalisées sur les parties aériennes de l'espèce *T.hirsuta*. Ont permis d'isoler et d'identifier de nombreux composés d'acides phénoliques [43].



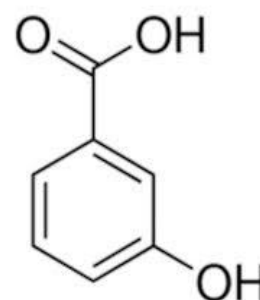
Acide 9,12- octadecadienoïque



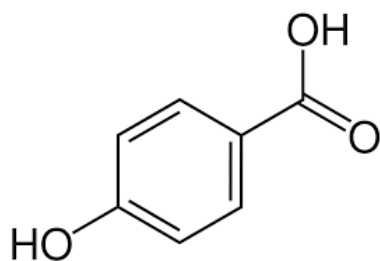
Acide benzoïque



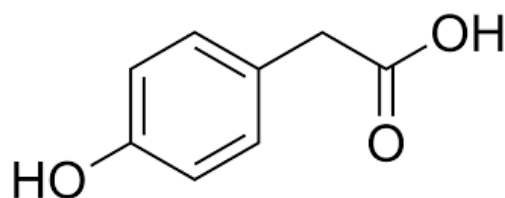
Acide vanillique



Acide m-hydroxybenzoïque



Acide phydroxybenzoïque



Acides phydroxyphenylacétique

Figure I.18 [43]

I.4.8.5. Coumarines :

Les travaux antérieurs effectués sur cette espèce ont permis d'isoler les coumarines : le daphnorétine et le triumbelletin.[40]

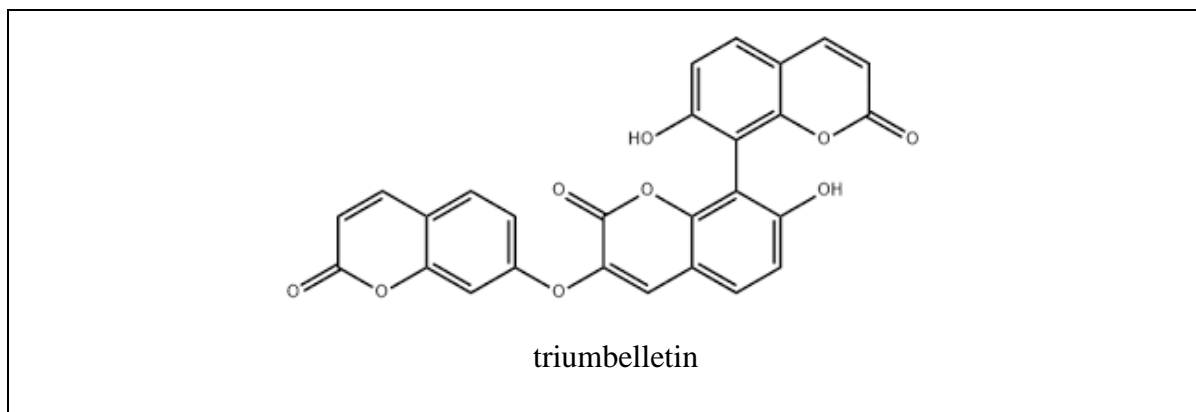


Figure I.19

I.4.8.6. lignans :

Une investigation de celle poussant en Egypte a permis la description de deux lignans : le pinorésinol, et le syringaresinol[40].

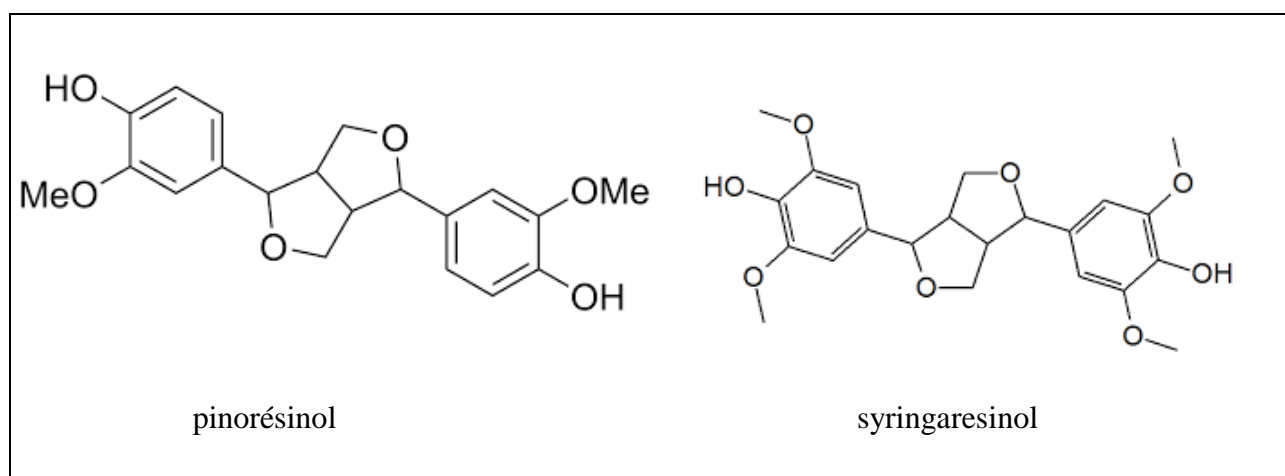


Figure I.20



***Chapitre II : les métabolites
secondaires***

II.1. Généralité sur les métabolites secondaires

Le terme "métabolite secondaire", probablement introduit par Albrecht Kossel en 1891. Ils sont des composés phytochimiques non directement impliqués dans les processus vitaux de bases (croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse, reproduction), contrairement aux métabolites primaires. Les métabolites secondaires vont avoir des fonctions spécifiques en réponse à une adaptation à un environnement. [44], Certains des principaux rôles pour la plante sont : La protection des plantes contre ravageurs et pathogènes, L'allélopathie (compétition plante-plante), La symbiose plante-microbe au niveau des nodules racinaire, La couleur, l'odeur et le goût. Ils peuvent donc servir d'attractifs pour les pollinisateurs. Cependant ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.[45]

Les métabolites secondaires présents dans les plantes ont une forte utilisation en médecine pour des problèmes d'anxiétés et de stress, mais aussi pour atténuer des symptômes de maladies chroniques ou encore, prévenir diverses maladies qui vont de la migraine au cancer [45]

Les métabolites secondaires sont divisés principalement en 3 grandes familles : les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (ou composés azotés).[46]

Plus de 200 000 métabolites secondaires sont déjà connus, Ils présentent une énorme valeur économique et produisent des intérêts importants sur les plans pharmaceutique, Cosmétique et nutritionnel) (L'intérêt des métabolites secondaires a considérablement augmenté en raison de la diversité de leurs effets comme antioxydants, antiviraux, antibactériens, et anticancéreux.[47]

Les métabolites secondaires exercent la plupart de leurs Effets par action à travers interactions avec les enzymes ou les protéines. Tandis que certains de ces composés agissent en tant que substrats au niveau des récepteurs et imitent les substances endogènes dans l'organisme cible, d'autres perturbent les interactions protéine-protéine nécessaires pour la fonction normale de cellules. Par conséquent, on peut conclure que cette capacité des MS d'agir sur la physiologie des autres espèces les rend comme source potentielle impressionnante de médicaments. [48]

II.2- Classification des métabolites secondaires

II.2.1- Les composés phénoliques

Est une classe vaste et très diversifiée de matière organique cyclique, sources secondaires Il est dérivé du phénol C₆H₅OH, qui est un mono hydroxybenzène. Les composés phénoliques ou polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très importante largement répandu dans le règne végétal. [48] Les métabolites secondaires sont Plante, de la racine au fruit. Cela signifie qu'ils ne fonctionnent pas directement au niveau d'activité de base de l'organisme végétal, comme la croissance, ou Reproduction. La couleur et l'arôme ou l'astringence de la plante dépendent de la force et de la concentration. Conversion des phénoliques. Ces composés représentent 2 à 3 % de la matière organique végétale dans certains cas jusqu'à 10% ou plus. Dans la nature, ces composés sont L'état conjugué est généralement sous la forme d'un ester ou plus généralement sous la forme d'un glycoside. . Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins). [50]

II.2.1.a- Les phénols :

Ce sont des métabolites secondaires présents dans toutes les plantes vasculaires. ils font partie du groupe La substance la plus abondante et la plus largement distribuée du règne végétal Plus de 8000 structures phénoliques sont présentes dans tous les organes des plantes Elles provoquent L'hérédité biologique provient de deux voies de synthèse principales : les voies du shikimate et de l'acétate. L'élément structurel de base est le noyau d'acide benzoïque, directement attaché à un ou Plusieurs groupements hydroxyles, libres ou impliqués dans une autre fonction chimique (éther, méthyle, ester, sucre...), qui peuvent avoir plusieurs substituant différents.[49] Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices, anti-inflammatoires et anti oxydantes (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols), antimicrobiennes (acides-phénoliques) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant[49].



Figure 2.1 [53]

Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc.). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence. Ils ont beaucoup des fonctions différentes dans les différentes espèces: - Défense contre les pathogènes - Attraction des pollinisateurs- Protections des rayonnements UV -Molécules de dissuasion alimentaire - Rôle structural (ex. lignine, constituant du bois) - Ils constituent les 40% du charbon organique dans la biosphère.[49]

II.2.1.b- Flavonoïdes

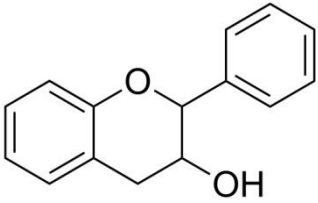
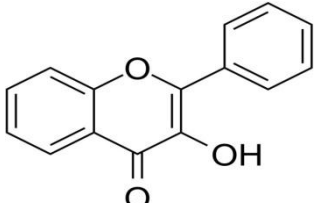
Sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Tous les flavonoïdes - plus de 4 000 - ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement 2-phénylchromane.

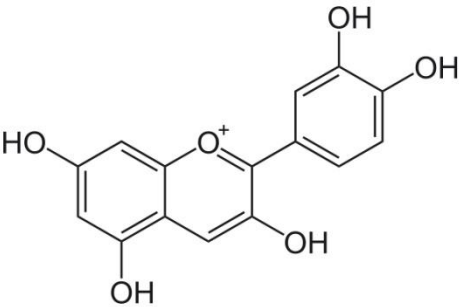
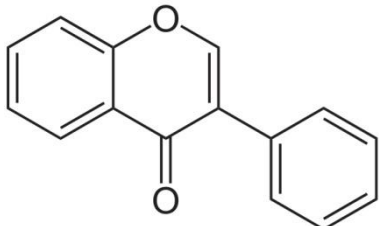
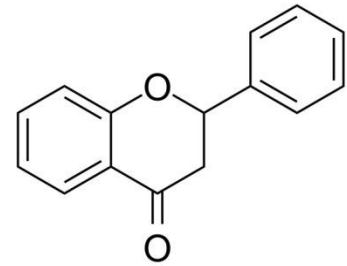
La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être « veino actifs »

C'est-à-dire d'être capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.[50]

Ils pourraient exercer autre multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés anti oxydantes, anti hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même anti tumorales significatives.

Tableau 2.1 [51]

| Classes | Formules | Sources | Propriétés |
|-----------|---|---|---|
| flavanols |  | Thé, Cacao, Raisins | -anticancéreuses -Anti oxydants naturels |
| flavonols |  | Pomme, Brocoli, Oignon, Fruits rouges | antihistaminique, anti inflammatoire et anti oxydante. – anti histaminique, anti inflammatoire et anti oxydante. |

| | | | |
|-------------|--|---|--|
| Anthocyanes |  | Raisin noir, Aubergine, Prune, Myrtille, Mûre | <ul style="list-style-type: none"> - Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes. - antiseptiques urinaires. |
| Isoflavones |  | soga | <ul style="list-style-type: none"> - phytoestrogéniques. -Source de phytoestrogènes. |
| Flavanones |  | Agrumes : orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère | <ul style="list-style-type: none"> -amélioration de l'absorption de la vitamine C. -la prévention des cancers de la peau. |

II.2.1.C- Tanins

Les tanins sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir. De poids moléculaires relativement élevés. Les tanins sont très répandus dans le règne végétal et sont particulièrement abondants dans certaines familles : Falciceae, Rosaceae, Myrtaceae, Rubiaceae. Les tanins se trouvent dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation, y compris les céréales, les légumineuses et les fruits (sorgho, millet, orge, haricots secs, pois, caroube, pommes, mûres, canneberges, dattes, raisins, aubépine, pots et fraises). On les trouve dans divers organes : racines ou rhizomes, écorce et fruit (Chêne) et bois (AC) Acacia [47]

Tanins hydrolysés : Composés de sucres et d'acides phénoliques. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique, libérant une fraction phénolique, soit de l'acide gallique (tanin gallique), soit de l'acide ellagique et une fraction non phénolique, généralement du glucose ou de l'acide qu'inique. [45]

• Tanins condensés : Ce sont des polymères de flavonols (catéchols). Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse, ne peuvent être dégradés que par une forte attaque chimique et ne contiennent pas de sucres dans la molécule. Ils sont abondants dans certains organes végétaux que l'homme consomme ou utilise. Ils sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits pré-mûrs et de certaines boissons, ainsi que de l'amertume du chocolat. [44]

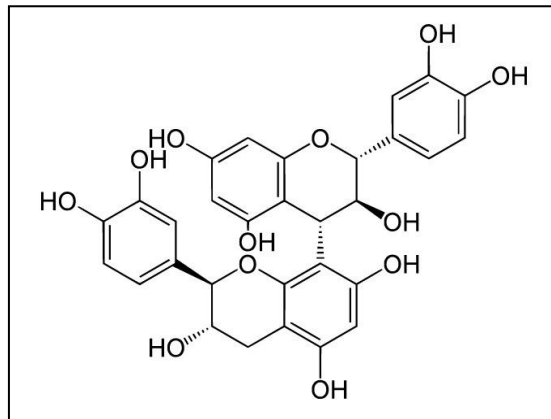


Figure 2.2 [51]

II.2.1.d- Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorat*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes.

La coumarine et ses dérivés. Dont plus de 300 structures sont connues, se répartissent dans 9 familles de Monocotylédones et plus 70 familles Dicotylédones. Ils participent dans les racines des plantes symbiotiques hébergeant *Rhizobium*, à la formation des nodules. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de l'aspérulle odorante et du mélilot desséché. [52]

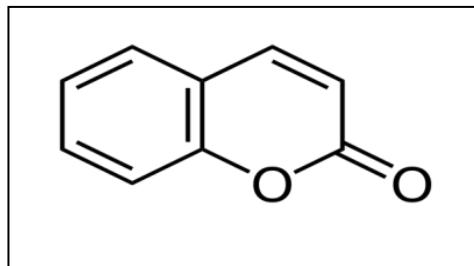


Figure 2.3 [52]

II.2.2- Terpénoïdes (Isoprenoïdes) :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). [44]

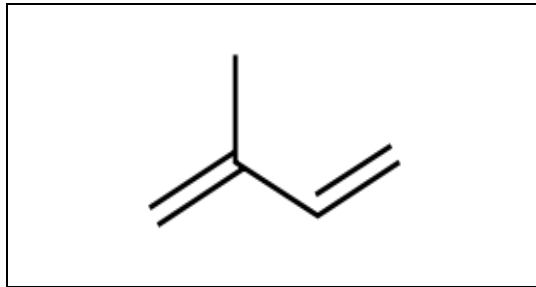


Figure 2.4 [52]

II.2.3- Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés hétérocycliques, d'origine naturelle, à caractère basique, présentant généralement une intense activité pharmacologique. Ce sont pour la plupart, des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine les emploie le plus souvent à l'état pur. La morphine a été le premier alcaloïde isolé de l'opium (en 1805). Puis on découvrit la strychnine (1818), la caféine (1819). [53]

On trouve des alcaloïdes, en tant que métabolites secondaires, principalement chez les végétaux, les champignons et quelques groupes animaux (comme les fourmis, les grenouilles et les coccinelles) peu nombreux. [52]

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans toutes les parties de la plante, mais selon l'espèce de la plante, ils s'accumulent uniquement dans les écorces, dans les racines, dans les feuilles ou dans les fruits. [53]

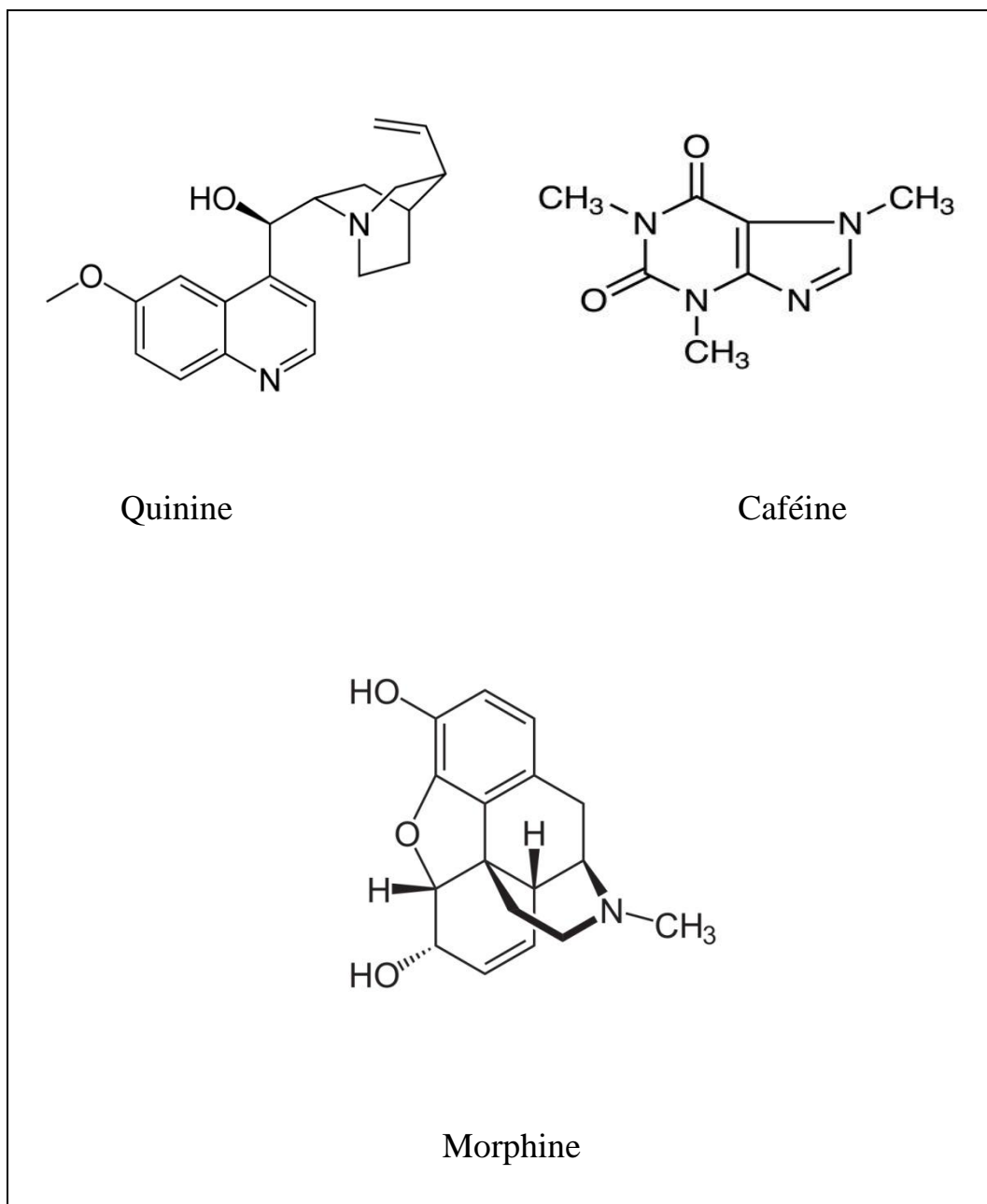


Figure 2.5 [54]

II.3- Propriétés pharmacologiques des composés phénoliques

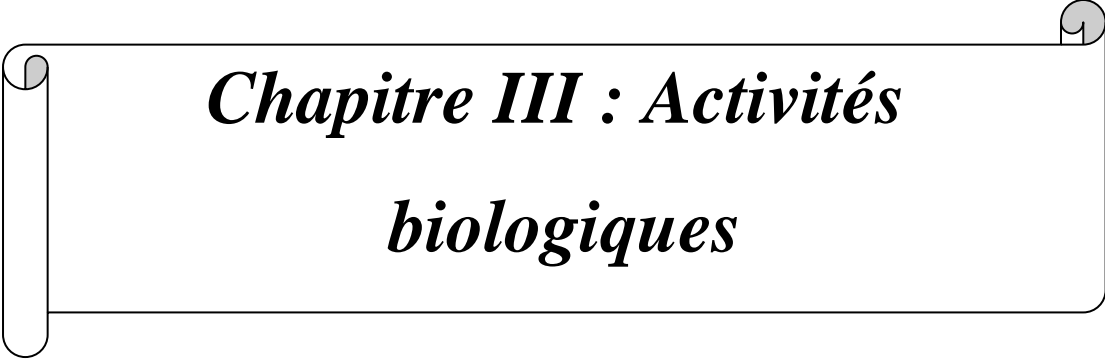
les métabolites secondaires sont reconnus par leurs divers activités biologiques tell que une activité anticancéreuse, antibactérienne, antalgique, antifongique, anti-inflammatoire, diurétique gastro-intestinale, antioxydant. [55]

Parmi les principaux composés phénoliques, les flavonoïdes sont Possède de fortes propriétés antioxydants. Considéré comme Antimicrobiens efficaces contre les microorganismes in vitro. [56]

Les tanins aident la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides. [56]

Les acides phénoliques sont anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires, anti-radicalaires, Hépatoprotecteur et immunostimulant. [57]

Les coumarines connues pour ses propriétés anti- inflammatoires, analgésiques et anti-œdémateuses. L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques, antivirale et antimicrobienne. [55]

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curving upwards. The text is centered within the scroll.

***Chapitre III : Activités
biologiques***

III.1- Activité antioxydant

Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire. [58]

III.2- Les radicaux libres

III.2.1- Généralité

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires car 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) [59].

III.2.2- Définition

Les radicaux libres sont des entités chimiques (Espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se rapparier, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules. [59]

III.3- Les antioxydants

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. [60]

III.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 [59]. La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique [61].

III.3.2- Classification des antioxydants

Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques et non enzymatiques [61].

III.3.2.a- Systèmes enzymatiques

Sont des systèmes de défense très efficaces. cette ligne de défense est constituée de Super oxyde dismutase (Catalyse la dismutation de l'anion su peroxyde), Catalase (Métabolise H₂O₂), Glutathion peroxydase (Action réductrice sur H₂O₂ et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH).[62]

III.3.2.b- Systèmes non enzymatiques

Cette classe regroupe des composés endogènes de faibles poids moléculaires, comme les vitamines E (α -tocophérol) et vitamines C (Acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,...etc.). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.[62]

➤ **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. [62]

➤ **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 .[62].

III.4- Le stress oxydatif

III.4.1-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 oxydatif. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [75]

III.4.2- 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 » [76]

III.4.3- Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant

Il existe différentes méthodes pour mesurer le pouvoir antioxydant d'un aliment ou d'un fluide biologique (tableau III.1)

Tableau III.1

| Tests en système modèle Tests du pouvoirantiradicalaire | | | |
|---|----------------------------|---|------------|
| tests | avantages | limites | Références |
| FRAP 37 ⁰ | Sensible, simple et rapide | Peu spécifique Ne mesure que le pouvoir réducteur | [77] |
| DPPH 20 ⁰ | Rapide,peu sensible | Ne mesure que le pouvoir antiradicalaire | [77] |

III.4.3.1- Le DPPH

Le 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle est un radical libre. Le composé est utilisé pour mesurer l'activité antioxydante d'une substance par sa capacité à piéger les radicaux libres du DPPH.[78]

III.4.3.1.a- Principe

(1,1 DiPhenyl-2-Picryl Hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquées par la présence de l'extrait. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsqu'on lui associe avec un proton. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés à piéger ces radicaux libres indépendamment de toutes activités enzymatiques [79]. Dans ce test, le substrat d'oxydation est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule d'antioxydant, se transforme en DPPH-H [79], (1,1-diphényl-2-(2,4,6- trinitrophenyl) hydrazine (DPPH2). Cette réduction peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Le système est très utilisé car il est rapide, facile et non coûteux [79]. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances de notre extrait [79]

III.4.3.2- Pouvoir antioxydant réducteur du fer

III.4.3.2.1- Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant, cette technique est développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet, le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance de milieu réactionnel est déterminé à 700nm [80]

A decorative horizontal border with rounded ends, resembling a scroll or a ribbon, containing the chapter title.

Chapitre IV: Matériels et méthodes

Après plusieurs recherches bibliographiques, cette plante a été choisie en raison de la rareté des études sur elle.

IV.1- Site d'échantillonnage

Les échantillons du matériel végétal utilisé ont été récoltés au mois d'avril 2022 dans la région de la wilaya Ferdjioua, wilaya de Mila (Figure 4.1)



*

Figure 4.1

IV.2- Matériel végétal

La partie aérienne de la plante étudiée a été prélevée en Avril 2022 d'une manière aléatoire, puis transportée dans un sac en plastique, Les feuilles, fleurs et brindilles ont été nettoyées, lavées avec de l'eau du robinet et séchées à l'ombre. Elles ont été ensuite, broyées grossièrement et récupérées dans des flacons en verre propres.



Figure 4.2

IV.3- Méthodes

IV.3.1- Extraction

Le mode de préparation d'une plante médicinale est la méthode d'extraction des principes actifs responsables d'action guérisatrice. Il peut avoir un effet sur la quantité de ces produits chimiques présents.

IV.3.1.1- Préparation des extraits bruts

Différents extraits ont été préparés à partir de poudre végétale de *T.hirsuta*. Quatre extraits ont été obtenus par macération et un extrait alcoolique a été préparé par décoction.

IV.3.1.1.a- La macération

La macération est connue et exploitée au moins depuis l'antiquité et tout comme la décoction ou l'infusion il s'agit d'une technique d'extraction solide-liquide destinée à retirer d'une substance solide les espèces chimiques qu'elle contient en les dissolvant dans un liquide[63]. Les solvants alcooliques sont capables d'augmenter la perméabilité de la paroi cellulaire en facilitant l'extraction de molécules plus polaires, moyennement et faiblement polaires. De plus, une immersion prolongée (24 h) avec agitation et température ambiante respectivement épuise le solvant dans les composés extraits et évite qu'ils ne soient altérés ou modifiés par des températures élevée tourner la matière végétale dans le éthanol aqueux pour extraire les principes actifs

Des extractions par différents solvants, du moins polaires au plus polaires : Chloroforme, puis, L'acétate d'éthyle, Méthanol et enfin le Méthanol eau ont été réalisées à la

température d'ébullition de chaque solvant. Afin de comparer la composition chimique de quatre extraits obtenus.

L'extrait au Chloroforme contient des composés apolaires, tandis que le L'acétate d'éthyle extrait les composés moyennement polaires et que le méthanol permet d'obtenir un extrait riche en composés polaires. Le Méthanol/eau, solvant le plus polaire, extrait, quant à lui les composés les plus polaires.

- **Mode opératoire**

- **Macération en chloroforme**

L'extrait Chloroformique de *T.hirsuta* a été préparé à partir de 20 g de broyat des tiges, feuilles et fleurs, qui ont été mis à macérer dans 200 ml de Chloroforme à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Ensuite le mélange est filtré à l'aide de papier filtre. Le filtrat obtenu est additionné et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 35°C.

- **Macération en acétate d'éthyle**

Cet extrait a été préparé à partir de 20 g de broyat des tiges, feuilles et fleurs, qui ont été mis à macérer dans 200ml d'acétate d'éthyle à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 24 heures. Ensuite le mélange est filtré sur a l'aide de papier filtre. Le filtrat obtenu est additionné et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 35-40°C.

- **Macération en éthanol**

20 g de plante sec a été macéré dans 200 ml d'éthanol température ambiante pendant 24 heures. Ensuite le mélange est filtré sur a l'aide de papier filtre. Le filtrat obtenu est additionné et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 35-40 °C.

➤ **Macération en éthanol / eau (7:3 V/V) (hydro-alcoolique)**

20 g de plante sec a été macéré dans 170 ml d'éthanol + 30 ml d'eau avec agitation a température ambiante pendant 24 heures. Ensuite le mélange est filtré sur a l'aide de papier filtre. Le filtrat obtenu est additionné et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40 - 45°C.

IV.3.1.1.b- La décoction

Au même titre que la macération , la décoction fait partie des techniques d'extraction solide-liquide qui permettent d'extraire des espèces chimiques présentes dans des substances solides.[63]

La décoction se fait ordinairement à feu nu, quelque fois au bain marie, ce dernier mode est indispensable lorsque la substance, plus ou moins pâteuse, garnissant les parois du vase, risque de se torréfier par l'action direct du feu

• **Mode opératoire**

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée selon la Méthode générale [64]qui consiste à Prendre 20g de la plante broyée est versée dans 200ml de méthanol, et portée dans un bain marie a 60 ° pendant 10 min, Ensuite le mélange est filtré a l'aide de papier filtre. Le filtrat obtenu est additionné et évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 40 - 50 °C.

IV.3.2- Evaporation

L'évaporation est un processus physique qui consiste en un passage lent et progressif d'un état liquide à un état gazeux, après avoir acquis suffisamment d'énergie pour surmonter la tension superficielle. Contrairement à l'ébullition, l'évaporation peut exister à n'importe quelle température, plus elle est rapide. Elle produit de la vapeur d'eau et de la vapeur atmosphérique.[63]

Les solvants ont été évaporés sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif (Rotavapeur HeidolphLaborota 4002) à une température de 35°-50 C (concentration de chaque extrait), qui permet de distiller rapidement des solvants, dans le but de concentrer partiellement une solution ou pour concentrer à sec (on enlève tout le solvant) une solution ou une suspension.

Le principe d'un évaporateur rotatif est basé sur la distillation sous vide (partiel). La solution est mise en rotation pour augmenter la surface d'évaporation puis la pression est diminuée grâce généralement à une pompe à eau. La vitesse de rotation et le vide créés permettent l'évaporation à des températures inférieures aux températures d'évaporation des solutions à évaporer.



Figure 4.3

Mode opératoire

La solution a été placée dans le ballon d'évaporation et procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant à température $T_0 = 35-45C^\circ$ et vitesse de rotation = 90, ensuite le ballon a été pesé afin de calculer le rendement d'extraction.

IV.4- Analyse phytochimique

IV.4.1- analyse qualitative (Screening phytochimique)

L'identification chimique a été réalisée par le screening phytochimique.

Le screening phytochimique est une technique qui permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes des métabolites secondaires contenus dans un organe végétal par des réactions physico chimiques [65]

IV.4.1.1- Tests préliminaires

L'analyse phytochimique a été réalisée sur l'extrait obtenu par la macération des feuilles et les fleurs, en utilisant des procédures chimiques pour identifier les différents constituants

La révélation de certaines familles chimiques de la plante a été réalisée grâce aux tests

De détection chimique telle que : les alcaloïdes, les composés phénoliques et les tanins

(Réaction au chlorure ferrique), les flavonoïdes, les saponines (Indice de mousse), les Stérols et Triterpènes, coumarines (test de confirmation). [66]

IV.4.1.1.a- Flavonoïdes

Test de bate-smith (test de flavana, 4diols)

On met dans deux tubes 2 ml de l'extrait hydro alcoolique. On additionne dans l'un des tubes HCl concentré (0,5ml) et l'autre reste comme témoin. On Porte aubain marie pendant 30 minutes.

L'apparition d'une coloration rouge dénote la présence de eucoanthocyanes qui sont des dérivés des flavan-3,4-diols [66]

IV.4.1.1.b- Alcaloïdes

Ce test est réalisé par la réaction de précipitation avec le réactif de Dragendorff.

Introduire 10 g de poudre végétale sèche dans un erlenmeyer, à laquelle 50ml de H₂SO₄ dilué au 1/10 avec de l'eau distillée est ajouté. Ce mélange a été agité et macéré pendant 24 h. Ensuite, dans 1ml du filtrat, 5 gouttes de réactif de Dragendorff sont ajoutées.

L'apparition d'un précipité orange, révèle la présence d'alcaloïdes. [66]

IV.4.1.1.C- Coumarines

Dans un tube, 5 ml d'extrait éthérique est évaporé, puis 2 ml d'eau chaude est ajoutée au résidu. La solution est partagée entre 2 tubes à essais. Au contenu de l'un des tubes, 0,5 ml est ajouté de NH₄OH à 25%. La fluorescence est observée sous U.V à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence de coumarines. [66]

IV.4.1.1.D- Tanins

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait, 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl₃, diluée à 1% [66]

L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue verte indique la présence des tanins.
L'apparition d'une coloration verte foncée indique la présence des tanins catéchiques.
L'apparition d'une coloration bleue-verte indique la présence des tanins galliques [66]

IV.4.1.1.E- Mucilages

Un mucilage est une substance que la plante utilise pour garder l'eau dans ses tissus. Cette molécule qui a une grande affinité pour l'eau agit comme une petite éponge.

Introduire 1 ml de décocté dans un tube à essai, puis 5 ml d'alcool absolu est ajouté.

L'obtention d'un précipité floconneux après agitation indique la présence de mucilages. [66]

IV.4.1.1.F- Huiles essentielles

1 g de matériel végétale a été introduit dans 10 ml de Dichlorométhane puis a été évaporé à sec. Le résidu a été ensuite dissous dans 3 ml d'éthanol. Puis, la solution a été évaporée à sec de nouveau.

La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles. [66]

IV.4.2- Analyse quantitative

IV.4.2.a- Rendements des extraits

Que se soit pour les feuilles, les fleurs ou les brindilles, les rendements des extraits (chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol, éthanol /eau, méthanol), ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (m1 - m2) / m3$$

m1 : la masse de l'extrait dans le ballon

m2 : la masse de ballon vide

m3 : la masse de la matière végétale de départ

IV.5- Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique chromatographique en lit ouvert qui est généralement réalisée sur une fine couche de phase stationnaire enduite sur une plaque de verre. Il est couramment utilisé dans de nombreux laboratoires de l'industrie chimique / pharmaceutique et des industries connexes, à la fois pour des travaux qualitatifs et semi-quantitatifs. Des analyses quantitatives, bien entendu, peuvent également être effectuées. Certains laboratoires trouvent cette technique extrêmement utile et affirment qu'une très bonne précision peut être obtenue, même à des niveaux d'analyse très bas. Cependant, des mesures élaborées doivent être prises pour assurer la précision [43].

IV.5.1- Principe :

Le mélange est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Il est entraîné par un solvant approprié (phase mobile ou éluant) qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.

Après migration les taches doivent être révélées ; c'est la détection qui peut se faire soit : Pulvérisation d'un réactif caractéristique

IV.5.2- Mode opératoire :

IV.5.2.a- préparation de la cuve :

La cuve doit être en verre.

Le niveau d'éluant au fond de la cellule doit être de 5 à 8 mm.

IV.5.2.b- Les Plaques de CCM :

La couche d'adsorbant est fragile, éviter de mettre les doigts sur les plaques. Repérer à l'avance l'emplacement où seront effectués les dépôts. Pour cela, tracer un léger trait de crayon parallèle au bord inférieur de la plaque à une distance de 1cm.

Les dépôts seront effectués sur cette ligne, à 1cm du bord de la plaque.

IV.5.2.c- Dépôt du mélange:

Les solutions avec lesquelles on va réaliser les dépôts doivent être des solutions diluées.

Pour effectuer les dépôts, on utilise généralement des tubes capillaires en verre ou des « piques à apéritif » dont le bout a été écrasé.

Il faut déposer la solution pendant une durée très brève afin d'éviter l'étalement du dépôt. Ne pas trop appuyer, pour ne pas détériorer la couche d'adsorbant.

IV.5.d- Elution :

Disposer la plaque dans la cuve, le dépôt doit être au-dessus du niveau de l'éluant. Eviter de déplacer la cuve ou de la faire vibrer pendant l'élution. Quand le front de l'éluant arrive à 1 cm du bord supérieur, retirer doucement la plaque, marquer au crayon le niveau atteint par le front de l'éluant (hauteur H).

Sécher la plaque à l'air ou éventuellement au sèche-cheveux pour évaporer entièrement l'éluant.

Phase mobile : éluant ou système solvant.

Echantillons: Les cinq extraits (Ethanol eau, Ethanol 100%, Acétate d'éthyle, Chloroforme et Extrait Méthanolique).

IV.5.2.e- Révélation :

Si les constituants sont colorés, ils sont directement visibles sur la plaque. La révélation aux UV permet de mettre en évidence sous forme de taches sombres des substances qui absorbent les UV, elle nécessite l'emploi de plaques particulières comportant un révélateur UV.

➤ Cette méthode a été utilisée dans cette étude non seulement pour identifier les différentes familles moléculaires présentes dans nos extraits mais aussi pour vérifier la répétabilité du profil chimique des extraits. Pour cela, des plaques de Silice gel 60 F₂₅₄, support- aluminium, 20×20 (Merck) ont été utilisées. Nous avons déposé de façon symétrique et identique 20 µl de chaque extrait sur les plaques à l'aide d'un tube micropillaire, Les plaques ont été introduites dans la cuve chromatographique saturée et contenant l'éluant approprié en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt de

l'échantillon et le mélange de solvant. Dans notre cas les systèmes de solvant testés sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4.1

| Les systèmes | Systèmes solvant | Proportions v/v |
|------------------|---------------------------|-----------------|
| Solvants. | Chloroforme. | 100% |
| Essayés | Chloroforme/éthanol | 6/4 |
| | Chloroforme/ éthanol/ eau | 4/2/1 |
| | | 5/3/1 |

Ces plusieurs systèmes d'élution ont été testés afin de choisir le système le plus adéquat pour la Séparation de composés des extraits de l'espèce *T.hirsutat*.

Après développement, les plaques ont été séchées par un sèche-cheveux avant d'être observées et photographiées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 366 nm.

Nous avons ensuite procédé à la détection des constituants à l'aide des révélateurs spécifiques :

✓ Réactif trichlorure d'aluminium (FeCl_3) à 2% (Révélateur pour les tanins et les polyphenols). Après pulvérisation, la plaque observée à la lumière visible. L'apparition des taches grises et brune indique la présence de tanins, L'apparition des taches jaunes et vertes indique la présence des polyphenols [67]

✓ Potassium hydroxyde en solution dans le méthanol (KOH à 5%) Révélateur spécifique des coumarines, Après pulvérisation, la plaque observée à la lumière visible [68] Les spots de colorations jaunes, indiquent la présence des coumarines.

✓ Chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 1 % Révélateur spécifique des flavonoïdes. Après pulvérisation, la plaque observée à la lumière visible les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches jaunâtres dans le visible. [69]

✓ Trichlorure d'antimoine (SbCl_3) Révélateur spécifique des diterpènes. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100 °C pendant 5mn, puis observée à la lumière visible. [70] L'apparition de taches de diverses couleurs (bleues, vertes, violettes), a montré la présence de diterpènes.

IV.6- Dosage des composés phénoliques

IV.6.1- Dosage des composés phénoliques totaux

L'estimation des polyphénols se fait généralement par des méthodes spectrophotométriques. Ces méthodes sont couramment utilisées, principalement pour leur simplicité et leur sensibilité élevée. La teneur en polyphénols totaux sera déterminée par le test de Folin-Ciocalteu, la coloration produite est proportionnelle à la

Quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Une courbe d'étalonnage est établie avec l'acide gallique et les résultats sont exprimés en équivalence d'acide gallique. Suivant le protocole décrit par [71]

- **Mode opératoire**

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu de couleur jaune. une prise de 200µl de chaque extrait (dilués avec l'éthanol 3/7) a été mélangé avec un volume de 1000µl de Folin-Ciocalteu (2M dilué 9 fois dans l'eau distillée), après agitation vigoureuse et repose de mélange pendant 4min, 800µl d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 a été ajouté. les tubes sont placés dans l'obscurité pendant 2h à une température ambiante, l'absorbance du mélange a été lue avec un blanc fait à partir d'éthanol à une longueur d'onde de 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg E d'acide gallique / mg d'extrait), a été déterminée en se basant sur une courbe d'étalon obtenue à partir d'une série de dilution d'acide gallique, allant de 10 à 100µg/ml.

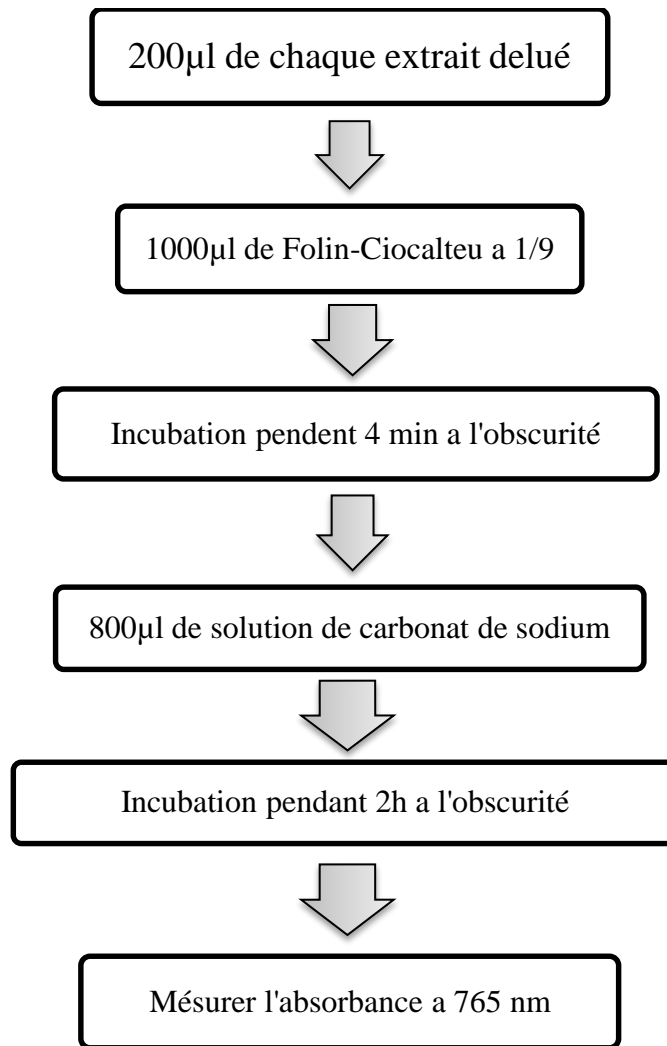


Figure 4.4

IV.7- Activité antioxydant :

IV.7.1-Test de DPPH :

L'activité antioxydant in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl), selon le protocole décrit par Blois [72], qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde λ de 517 nm.

La technique consiste à mettre le radical libre DPPH (de couleur violette), en présence de

L'antioxydant (les extraits bruts) va être réduit vire vers le jaune. Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance. La réaction de DPPH est représentée dans la figure suivante :

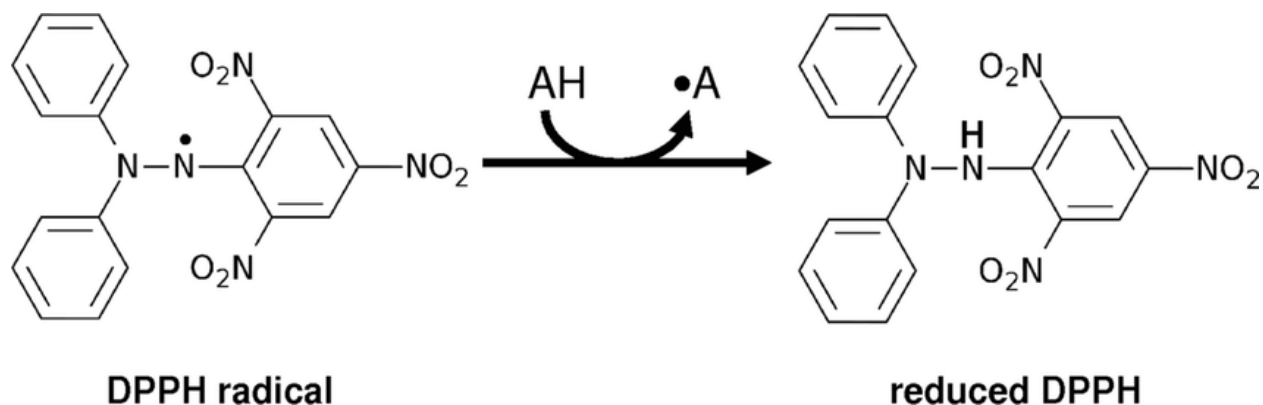


Figure 4.5

IV.7.2- Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC50

L'IC50 (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC50 (Efficient concentration 50), Est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes Concentrations des extraits testés.

Préparation de solution- mère :

Tableau 4.2

| Extraits | La quantité des extraits | Ethanol | Concentration de la solution-mère mg/ml |
|----------------------|--------------------------|---------|---|
| Ethanol/eau | 20mg | 4ml | 5 |
| Ethanol 100% | 40mg | 4ml | 10 |
| Extraits méthanoïque | 55mg | 3ml | 18 |
| Acétate d'éthyle | 4mg | 4ml | 1 |
| Chloroforme | / | / | / |

Préparation une gamme de solutions- filles :

Nous avons préparé une gamme de solutions –filles à partir de la solution mère de chaque extrait.

Tableau 4.3

| Les solutions | S0 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 |
|-----------------------|---------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Première étape | 2ml d'extrait | 1ml extrait+1ml éthanol | 1ml extrait (S1) +1ml éthanol | 1ml extrait (S2) +1ml éthanol | 1ml extrait (S3) +1ml éthanol | 1ml extrait (S4) +1ml éthanol | 1ml extrait (S5) +1ml éthanol | 1ml extrait (S6) +1ml éthanol |

La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol absolu. 400µl de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1600µl de DPPH. Des solutions de référence de l'acide ascorbique sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ de l'activité antiradicalaire } [(A1 - A2)/A1] * 100$$

A1 : Absorbance du témoin négatif sans extrait

A2 : Absorbance de l'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur de la CI50, sachant que l'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

Chapitre V: résultats et discussion

V.1- Calcul du rendement d'extraction :

Pour l'obtention des différents extraits à partir de mélange de la partie aérienne de la plante *T.hirsuta*, nous avons réalisé une extraction par macération et décoction. L'utilisation des solvants à polarité différentes permet de séparer les composés de la plante selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc permet de séparer ses groupements chimiques. Après le séchage, les cinq extraits obtenus, l'extrait brut Méthanolique, les deux extraits Ethanoliques, l'extrait d'Acétate d'éthyle et l'extrait Chloroformique sont tous sous forme poudre, chaque extrait a été caractérisé par son rendement dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1

| Solvants | Rendements (%) |
|------------------|----------------|
| Méthanol | 30,05 |
| Ethanol 100 % | 20,44 |
| Ethanol/ Eau V\V | 15,04 |
| chloroforme | 5,2 |
| Acétate d'éthyle | 13,45 |

L'histogramme de la figure 5.1 illustre le rendement des différents extraits du parti aérienne sèche de *Thymelaea hirsuta* L.

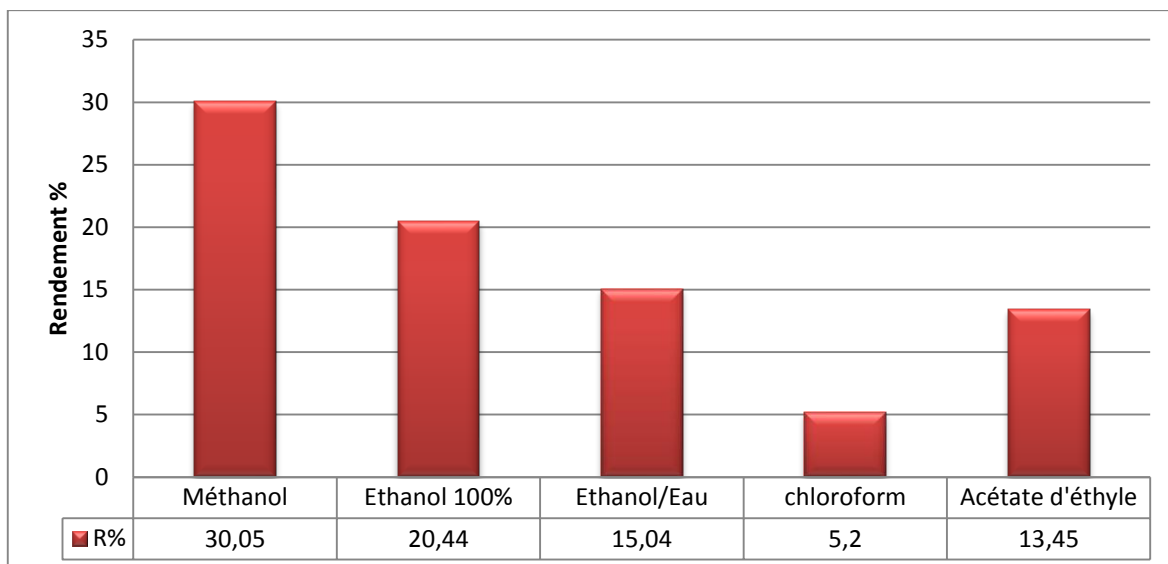





Figure 5.1

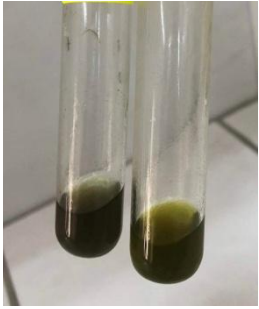
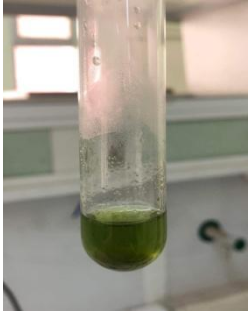

D'après les résultats obtenus qui sont résumés dans le tableau 5.1 et l'histogramme (fig. 5.1) Nous constatons que les rendements obtenus ont été sous la dépendance du solvant d'extraction utilisé. Nous avons remarqué que le rendement le plus élevé de l'espèce *T. hirsuta* est de l'extrait Méthanolique (30.05 %), suivi par l'extrait Ethanolique (20.44%) et Ethanol/eau (15.04%), ensuite l'extrait d'Acétate d'éthyle (13.45%), enfin l'extrait Chloroformique (5.20%).

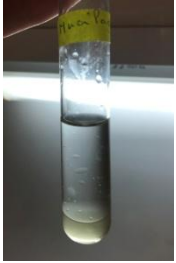

V.2- Tests phytochimiques

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de *T.hirsuta*. La détection de ces composés chimiques été vérifiés par des tests préliminaire, soit sur la formation des complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration. Les résultats de ces tests sont représentés dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2

| composés | Quantité relative | Couleur | Résultats |
|--------------------|-------------------|----------------------|---|
| Les flavonoïdes | +++ | Rouge foncée |  |
| Tanins catéchiques | +++ | Verte foncée |  |
| Coumarines | + | Fluorescence intense |  |

| | | | |
|-------------------|-----|------------------------------|---|
| | | | |
| Quinons libre | - | Pas de changement de couleur |  |
| Huiles essentiels | +++ | Vert avec odeur parfumée |  |
| Alcaloïdes | +++ | Orange |  |

| | | | |
|-----------|-----|----------------------------------|---|
| Mucilages | +++ | Précipité floconneux transparent |  |
| Saponines | + | apparition de mousse |  |

+++ : Présence en forte quantité

+ : Présence en faible quantité

- : Absence

Les résultats expérimentaux des tests effectués indiquent clairement la présence des flavonoïdes, des tanins catéchiques, des alcaloïdes, des huiles essentiels et des mucilages en abondance, avec la présence des coumarines et des saponines en faible quantité, et l'absence des quinones libres.

La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer leurs utilisations traditionnelles

V.3- Chromatographie sur couche mince CCM:

Plusieurs systèmes de solvants ont été essayés sur les extraits bruts de la plante en utilisant des plaques analytiques CCM. La meilleure séparation a été obtenue avec le système: CHCl_3 100%.

La chromatographie (CCM) a permis tout d'abord de montrer à travers la révélation

Par l'UV à 366 nm que les profils des extraits ne sont pas identiques. Cela montre que la méthode d'extraction est réussie.

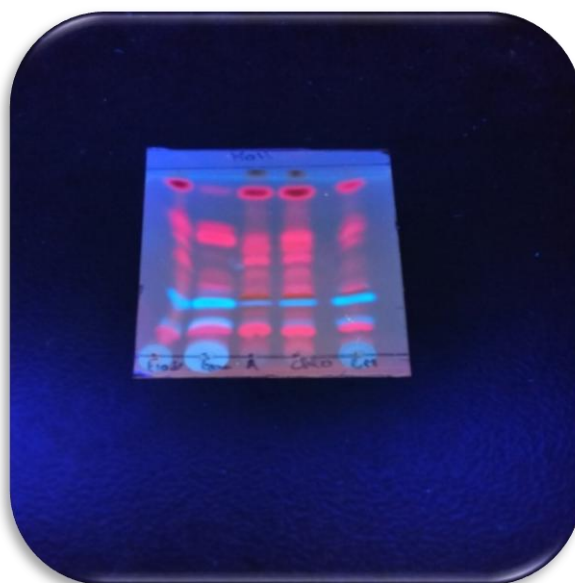


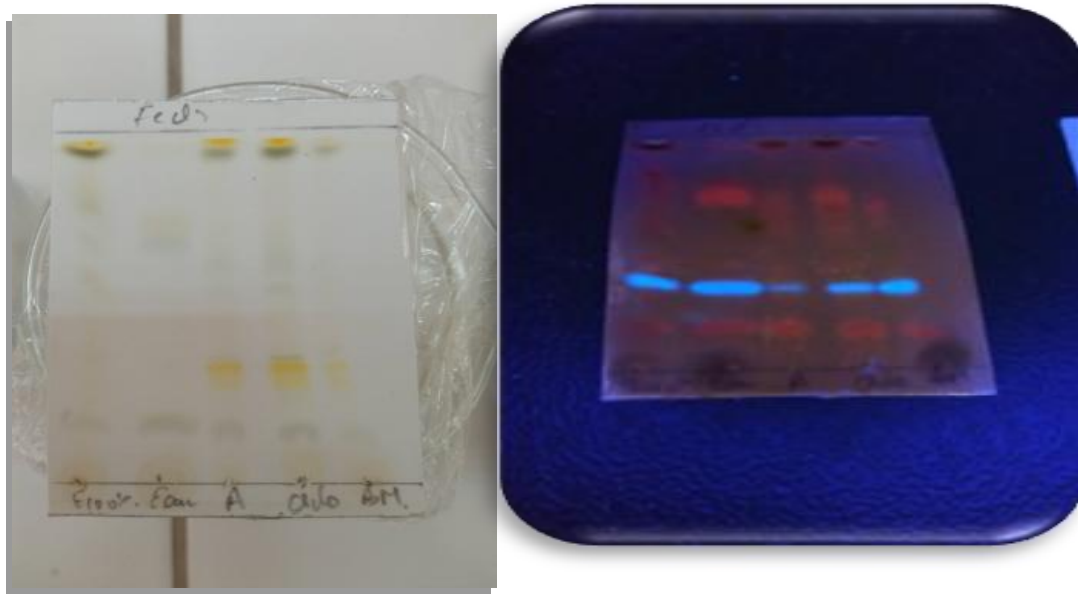
Figure 5.2

V.3.1- Identification des tannins et polyphénols dans les extraits

Les plaques CCM sont pulvérisées avec le réactif de FeCl_3 après la migration des extraits, nous avons observé deux couleurs distinctes il s'agit du jaune et du verte qui indiquent la présence des polyphénols dans tous les extraits sauf l'extrait de Eau /EtOH, la comparaison des colorations des différentes tâches a mis l'accent sur le type de composés phénoliques détecté.

Nous n'avons pas obtenu une observation visible dans l'extrait hydroalcoolique, qui est expliquée probablement par la faible concentration de poly-phénols dans l'extrait.

Les spots en gris observés sur les quatre extraits CHCl_3 , EtOH, Eau /EtOH, EtOA ce MeOH indiquer la présence des tannins, Les résultats de cette manipulation sont représentés sur la Figure (5.3).



CCM après la révélation

sous UV 365nm

Figure 5.3

V.3.2- Identification des flavonoïdes dans les extraits

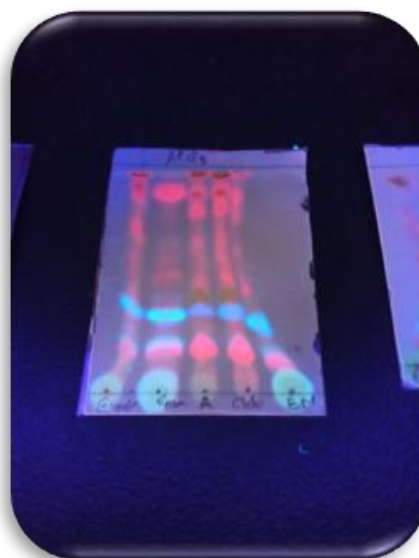
Après la pulvérisation avec le réactif de AlCl_3 , la CCM des extraits, EtOH, EtOAc .MeOH montrent deux tâches de couleur jaune à l'œil nu, avec une distance de migrations différente, cela indique la présence de plusieurs types de flavonoïdes.

Un seul spot en jaune observé sur l'extrait de CHCl_3 indique la présence probablement d'un seul type de flavonoïde.

Pour l'extrait hydro alcoolique l'examen des CCM, indique du résultat négatif. Qui est expliqué Probablement par la faible concentration de flavonoïdes dans l'extrait hydro alcoolique



Après la révélation



révélation sous UV a 365nm

Figure 5.4

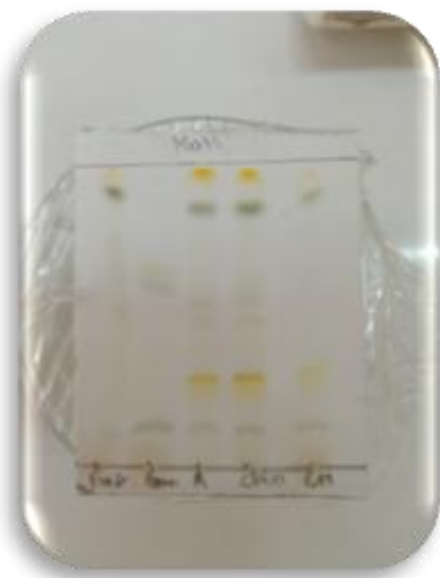
V.3.3- Identification des coumarines dans les extraits

Par le Réactif KOH :

D'après la figure (5.4), on observe la présence de deux taches, sont bien distinctes pour l'extrait de CHCl_3 et EtOAC et elles sont moins distinctes pour l'extrait de MeOH, qui signifie la présence probablement de deux types ou plus des coumarines.

La différence de la distance de migrations est due à la polarité des composés vis-à-vis du système de solvants d'éluion et la phase stationnaire.

On n'a pas obtenu une observation visible dans l'extrait hydro alcoolique.



Après la révélation



sous UV 365nm

Figure 5.5

V.3.4-Identification des diterpènes dans les extraits :

La présence des diterpènes dans tous les extraits étudiés a été détectée par le réactif de $SbCl_3$. En paraissant, dans le visible, sous forme de tâches jaune.

On n'a pas obtenu une observation visible dans l'extrait hydro alcoolique.

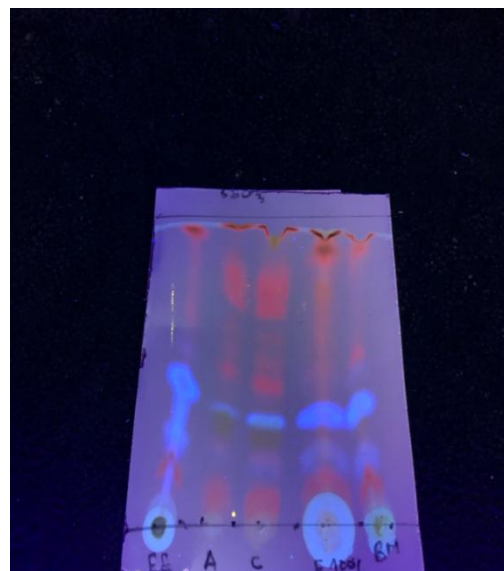
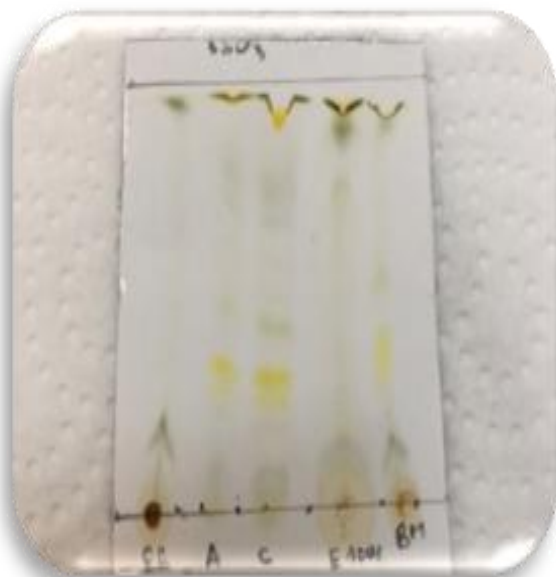


Figure 5.6

Suite à la révélation des chromatogrammes par les différents réactifs, nous avons mis en évidence deux classes de molécules dans les extraits à savoir polyphénols (tannins, flavonoïdes, coumarines) et di terpènes. Cette espèce contient aussi d'autres composés non déterminés.

Du point de vue quantitatif, chaque extrait renferme des polyphenols et terpènes avec des teneurs plus importantes dans les extraits apolaire et moyennement polaire (extrait chloroforme et acétate d'éthyle).

En comparant les extraits polaires entre eux, on se rend compte que l'extrait éthanoïque est moins riches en polyhénol par rapport au l'extrait méthanoïque.

V.4- Dosage des composés phénoliques

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été déterminée par la méthode de [71] utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

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 [73].

La courbe d'étalonnage a été tracé en utilisant l'acide gallique comme standard (0,1 à 1,2 mg/ml), et leurs absorbances ont été enregistrés à 765 nm.

Le taux de phénols totaux est déterminé à partir de l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage d'acide gallique : $y =$ sachant que le coefficient de détermination est $R^2 = 0,983$ (fig.5.6).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait sec)

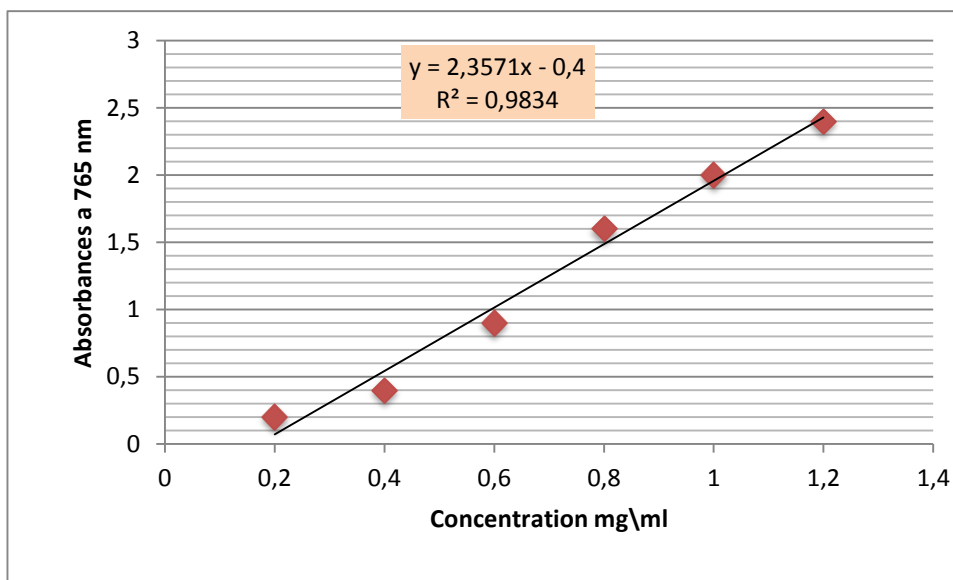


Figure 5.7

La quantification des polyphénols des extraits a été représentée dans le tableau (5.3) et sous forme d'histogramme dans la figure (5.8).

Tableau 5.3

| Extraits | La teneur des Polyphénols mg EAG/g d'extrait |
|-------------------------|--|
| Méthanol | 234 |
| Ethanol 100 % | 314 |
| Ethanol/ Eau | 249 |
| chloroforme | 261 |
| Acétate d'éthyle | 253 |

$$T = C \cdot V / M$$

T : la teneur des polyohénoles en mg EAG/g

C : la concentration de l'extrait équivalent de l'acide gallique établie à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

V : Volume de l'extrait (ml)

m : le poids sec de l'extrait (g)

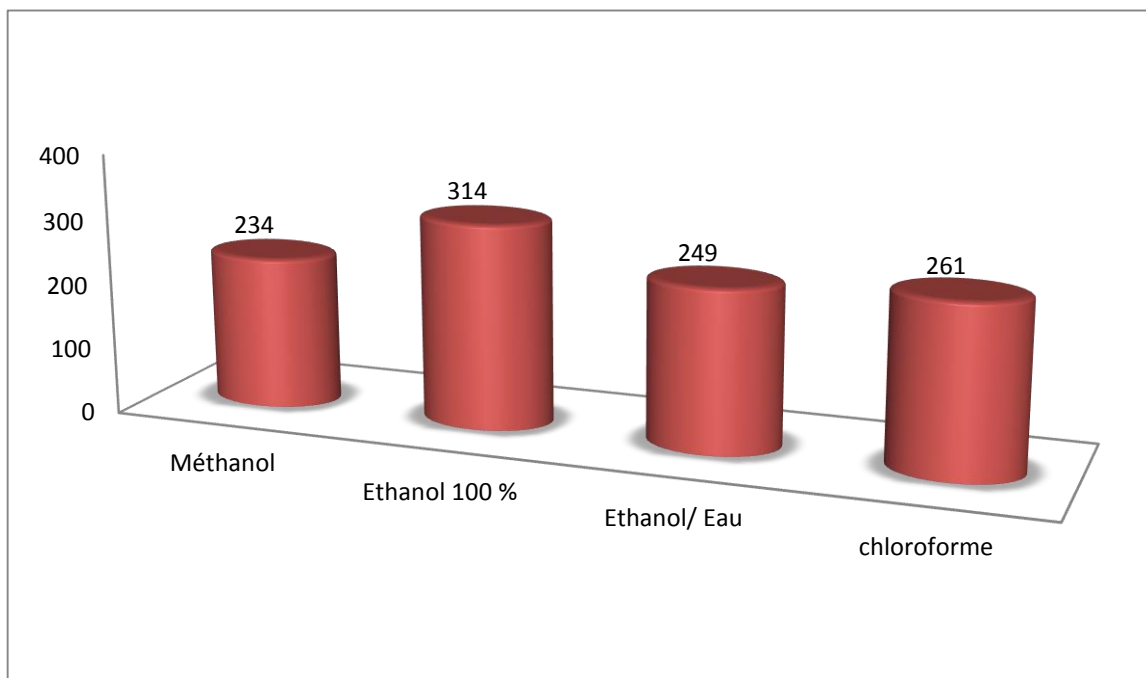


Figure 5.8

Les résultats du dosage des composés phénoliques totaux, représentés dans la figure 5.8

Montre que la quantité des composés phénoliques des différents extraits varie entre 234 et 314 mg EAG/g. La teneur en composés phénoliques la plus élevée a été mesurée dans l'extrait éthanoïque avec une teneur de 314 mg EAG/g, suivi par l'extrait chloroformique, avec 261 mg EAG/g, l'extrait acétate d'éthyle 253 mg EAG/g, l'extrait ethanol/eau avec 249 mg EAG/g, la plus faible teneur a été enregistrée dans l'extrait méthanoïque avec une concentration de 234 mg EAG/g. L'analyse statistique montre une différence significative entre les différents résultats des dosages. Cette variation est probablement due à la nature des composés extraits de chaque extrait et leurs propriétés.

V.5- Activité antioxydante :

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en valeurs IC₅₀ (est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande). Le pourcentage d'inhibition du DPPH à différentes concentrations des extraits est présenté dans le tableau suivant (tableau 5.4).

Tableau (5.4)

| Extraits | C (mg/ml) | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 |
|------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| EtOH/eau 7/3 | % inhibition | 91,56 | 57,14 | 25,17 | 17 | 10,20 | 6,12 | 4,76 | 3,40 | 0,6 |
| EtOH 100% | | 90,4 | 83,4 | 81,4 | 53,4 | 27,4 | 16,4 | 1 | 0 | / |
| Méthanolique | | 84,84 | 83,63 | 42,02 | 35,35 | 18,87 | 15,15 | 6,26 | 2,42 | / |
| Acide ascorbique | | 86,93 | 78,23 | 71,34 | 23,45 | 12,5 | 12 | 10 | 7,58 | 5,05 |

Les résultats obtenus par le test du DPPH permettent de tracer les courbes de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits (figure 5.9)

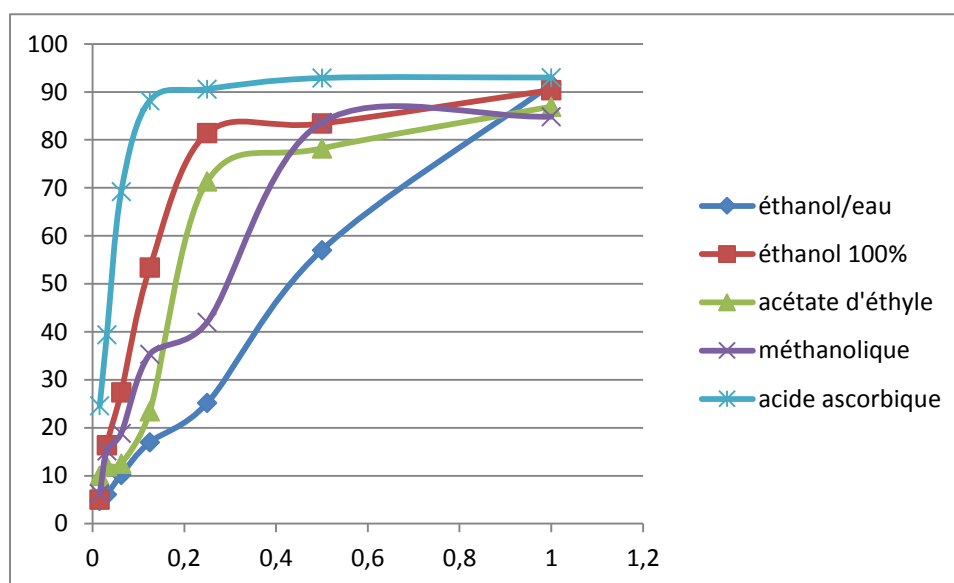


Figure 5.9

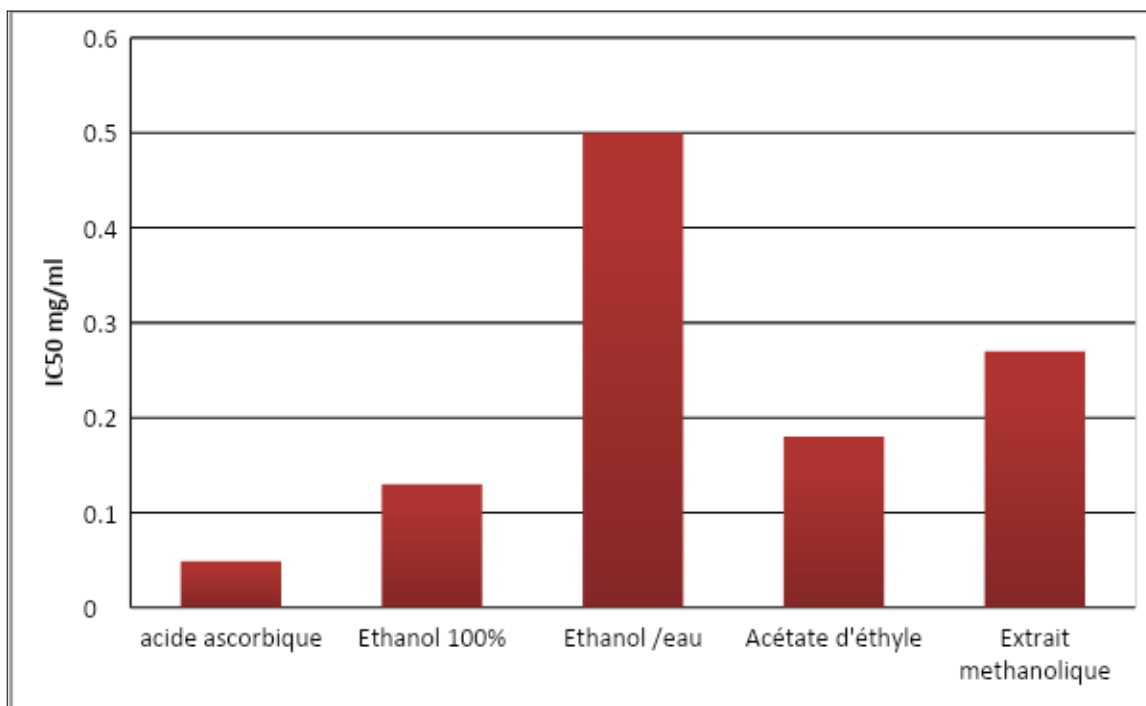


Figure 5.10

Les résultats obtenus dans la figure 5.9 montrent que la capacité de réduction est Proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons. Tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydants nettement inférieures à celles du produit de référence (acide ascorbique). Cette différence est due au degré de pureté de standard de synthèse, contrairement aux échantillons qui sont des extraits non purifiés.

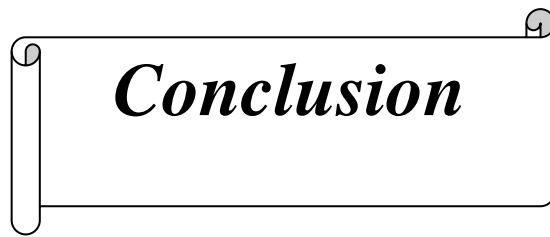
Les extraits de *T.hirsutat* présentent un pourcentage d'inhibition important qui varie entre 0.13% et 0.27% dans une gamme de concentration de 0 à 1.2 mg/ml. Les extraits éthanoïque et acétate d'éthyle possèdent des pourcentages d'inhibition le plus important avec 0.13% et 0.18% respectivement qui sont largement supérieur à celle de l'extrait méthanoïque et l'extrait hydro alcoolique avec un pourcentage d'inhibition de 0.27% et 0.50 % respectivement.

Globalement, les résultats obtenus par piégeage du radical libre DPPH dans le présent travail révèlent que les extraits bruts Ethanoliques et acétate d'Ethyle sont plus actifs que les extraits Méthanolique et hydro alcoolique cela est probablement lié à la complexité des extraits bruts en substances polyphénoliques y compris les tanins et les flavonoïdes et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydant [74].

Dans le tableau suivant nous avons indiqué les valeurs d'IC50 de quatre extraits et la valeur IC50 d'acide ascorbique, à partir de l'équation exponentielle de la courbe tracée.

Tableau 5.4

| Extraits | Acide ascorbique | Ethanol 100% | Ethanol /eau | Acétate d'éthyle | Extrait Méthanolique |
|--------------|------------------|--------------|--------------|------------------|----------------------|
| IC50 (mg/ml) | 0.049 | 0.13 | 0.50 | 0.18 | 0.27 |



Conclusion

Conclusion générale

Dans la présente étude, nous avons récolté les tiges et les feuilles de l'espèce *T.hirsuta*, les quelles ont été séchées à l'ombre. Par la suite, l'extrait méthanolique a été préparé par la décoction, et les extraits (éthanoïque 100%, Ethanol/eau, Chloroformique et extrait d'acétate d'éthyle) ont été préparée par la macération à froid. ces extraits ont fait l'objet d'une étude phytochimique et biologique.

A la lumière des résultats obtenus, on peut tirer les conclusions suivantes :

Le criblage phytochimique caractérisé par des réactions colorées a montré la présence de : flavonoïdes, saponines, alcaloïdes, huiles essentiels, coumarines et des tannins (cathéchique).

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols totaux montrent que l'extrait Ethanoïque représente la teneur la plus élevé de l'ordre de 314mgEAG /mg, ensuit l'extrait Chloroformique avec 261mgEAG /mg et l'extrait éthanol / eau avec 249 mgEAG /mg et l'Extrait d'acétate d'éthyle avec 253 mgEAG/mg, tandis que la teneur la plus basse a été obtenue c'est d'extrait méthanoïque d'ordre 234 mgEAG /mg.

l'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le test du DPPH, les résultats révèlent que l'extrait brut éthanoïque présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH avec un CI50 de 0,13 mg/ml, cette activité est meilleure que celle provoquée par les l'autre extraits ; les deux extraits acétate d'éthyle et extrait méthanoïque à présenter une activité inhibition modérée (CI50= 0.18 et 0.27) ; l'extrait éthanol/eau représente l'activité anti radicalaire la plus basse avec (CI50=0.50). Ces activités restent relativement faibles par rapport à l'antioxydant standard.

Notre étude a montré que la plante médicinale *T.hirsutat*, est très riche en différents composés métaboliques et présente une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisé dans le domaine pharmaceutique.



Reference

- [1]: Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 27: 193. (2006).
- [2] : Maurice N. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14. (1997).
- [3] : Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smoothhound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114 : 1198-1205 (2009).
- [4] : Gulcin I., Alici H.A., Cesur M. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(3) : 281-285. (2005)
- [5] : Duraffourd C., Lapraz J.C., Chemli R. La plante médicinale de la tradition à la science. 1^{er} congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222. (1997).
- [6] : - Sofowora, A. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique, éd Karthala, Paris, pp22-23. ; (2010).
- [7]: Elqaj, M., Ahami, A., Belghyti, D. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc. ; (2007).
- [8]: Benhouhou S, Boucheneb N, Adamou I. Floristic and ecological characterisation of the Tassili Cypress. *Science et changements planétaires Sécheresse*, 16(1) :61-66. (2005).
- [9]: Borris, R.P., Blasko, G., Cordelle, G.A. Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae, *Journal of Ethnopharmacology*, vol(24), pp41- 91 ; (1988).
- [10]: Heywood, V.H. *Les Plantes à Fleurs*, éd Nathan, Paris, pp159-160. ;(1996).
- [11] : Fournier, P. *Les plantes médicinales et vénéneuses de France*, Tome III, éd. Connaissance et mémoires Européennes, pp176-177 ; (1999).
- [12] : Mohammedi. Z. *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie*. Thèse de Doctorat en Biologies. Université de Tlemcen., (2012).

- [13]: Ferrari J. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. Thèse de doctorat. Université de Lausanne. (2002).
- [14]: Tubery, P. Alcohol extract of *Lasiosiphon kraussianus* plant having lymphocytic activity, for use against leprosy. Brevet, Fr. M. 6366 (CA 74, 91170x) ; (1968).
- [15]: Ren, C.P. Long-acting analgesic antidyne in anal operations. *Nat. Med. J. China* 4, pp158-159. ; (1978).
- [16]: Kupchan, S.M., Baxter, R.L. Mezerein : anti-leukemic principle isolated from *Daphnemezereum* L. *Science*, vol(187), pp652-653; (1975).
- [17]: Amari, N. O., Bouzouina, M., Berkani, A., & Lotmani, B. Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pacific journal of tropical disease*, 4(2), 104-109. (2014).
- [18]: Baba Aissa, F. Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, éd. Librairie moderne, Rouiba, pp203. ; (1999).
- [19]: Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A., Gmira, N. *Bull. Soc. Pharm, Bordeaux*, vol(142), pp61-78. ;(2003).
- [20]: Han, J.T., Bang, M.H., Chun, O.K., Kim, D.O., Lee, C.Y., Baek, N.I. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities, *Arch Pharm Res*, vol(27), pp390–5. ; (2004).
- [21]: Wu, L. C., Hsu, H. W., Chen, Y. C., Chiu, C. C., Lin, Y. I., Ho, J. A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya, *Food Chemistry*; vol(95), pp319– 327. ; (2006).
- [22]: Kerbab, K., Mekhelfi, T., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, F., Aquino, R., Rastrelli L. *Natural product research*, Vol(29), pp671-675. ; (2015).
- [23]: Dohou, N., Yamni, K., Badoc, A., Douira, A. Activité antifongique d'extraits de *Thymelaea lythroides* sur trois champignons pathogènes du Riz, *Bull. Soc. Pharm, Bordeaux*, vol(143), pp31-38. ; (2004).

- [24] : Mohammadi, Z. Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie (Doctoral dissertation), pp27. . ; (2013).
- [25] : Iserin, P., Masson, M., Restellini, J-P., Ybert, E., Moulard, F., Zha, ELarousse encyclopédie des plantes médicinales, les éléments actifs des plantes, 2éd, pp14. . ; (1996).
- [26] : Mekhelfi, T. Séparation et Détermination Structurale de Métabolites Secondaires de deux Plantes Algériennes - Activités Biologiques, these doctorat, discipline : Analyses physicochimiques, contrôle de la qualité et synthèse de substances bioactives, Université des Freres Montouri Constantine, pp8. ; (2016).
- [27]: Kabbaj, F. Z., Lai, D., Meddah, B., Altenbach, H.J., Cherrah, Y., Proksch, P., El Abbes F. M., Debbab, A. From Biochemical Systematics and Ecology, vol(51), pp153-155. ;(2013).
- [28] : Garcia-Granados, A., Saenz de Buruaga, J. M. From Anales de Quimica, Serie C: Quimica Organica y Bioquimica, vol(76), pp96-7. ;(1980).
- [29]: Ghanem, H., Haba, H., Marcourt, L., Benkhaled, M., Wolfender, J.L. From Natural Product Research, vol(28), pp1732-1738. ; (2014).
- [30]: Amari, N., Bouzouina, M., Berkani, A., Lotmani, B. From Asian Pacific Journal of Tropical Disease, vol(4), pp104-109. ; (2014).
- [31]: Rizk, A.M., Rimpler, H. Isolation of daphnoretin and. <-sitosterol-<- Dglucoside from Thymelaea hirsuta, Phytochemistry, vol(11), pp473-475. ; (1972).
- [32]: Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. Phytochemical investigation of Thymelaea hirsuta, III, coumarins. Acta chimica Academiae scientiarum Hungaricae, vol(85), pp107-115. ; (1975).
- [33]: Cheriti, A., Sekkoum, K. From Acta Chimica Slovenica, vol(42), pp373-74. ; (1995).
- [34] : Rebbas, K., Bounar, R., Gharzouli, R., Ramdani, M., Djellouli, Y., & Alatou, D. Plantes d'intérêt médicinale et écologique dans la région d'Ouanougha (M'sila, Algérie). Phytothérapie, 10(2), 131-142. (2012).

- [35] : Hyères - Var - Alt. 1 - NIKON D700 - Obj.60 - 1/125eme - F32.0 - Iso 400 (28/02/2010).
- [36] : Mohammedi.Z.,Etude du pouvoir antioxydant de quelques plantes de la region de Tlemcen,Thèse de magistère,l'université-Abou Bakr Belkaid-Telemcen. (2005).
- [37] : Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions as determined by FRAP assay, Nutrition Research, vol (23), pp1719-1726. ; (2003).
- [38]: Andayi, A.W., Yenesew , A., Derese, S., Midiwo, J.O., Gitu, P.M., Jondiko, O.J. Antiplasmodial flavonoids from *Erythrina saculeuxii*, Planta Med, vol(72), pp187–9. ; (2006).
- [39]:Yang, M.H., Ali, Z., Khan, S.I., Khan, I.A. Characterization of chemical constituents from *Thymelaea hirsuta* with PPAR α/γ modulation activity. ; (2014).
- [40]: Miyamae, Y., Villareal, M.O., Abdrabbah, M.B., Isoda, H., Shigemori, H. Hirseins A and B, daphnane diterpenoids from *Thymelaea hirsuta* that inhibit melanogenesis in B16 melanoma cells, Journal of natural products, vol (72), pp938-941. ; (2009).
- [41]:Spichiger., Rodolphe., Clément, C., Bastian, B. Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Paraná Basin." Journal of Biogeography, vol(31), pp1489-1501. (2004).
- [42]:Gharbo, S.A., Khafagy, S.M., Sarg, T.MPhytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*, U, Arab Rep, Journal Pharm. Sci, vol (11), pp101-106. (1970).
- [43]: Trigui, M., Hsouna, A., Tounsi, S. J. Industrial Crops and Products, vol(41), pp 150-157; (2013).
- [44]: Makkar H. P. S., Siddhuraju P. et Becker K. "Plant Secondary Metabolites".Humana Press Inc., p.130, (2007).
- [45]: Abderrazak M Joël R. "La botanique de A à Z.Ed. Dunod. Paris. pp. (2007).
- [46]: Lutge U., Kluge M., Bauer G.."Botanique 3ème Ed : Technique et documentation, (2002).

- [47] : Marouf, A., Reynaud, J. La botanique de A à Z. DUNOD, Paris, p : 9-20-176-177..(2007).
- [48] : Mailbi, F., Mansour, R. Caractérisation chimique et évaluation in vitro des activités antibactérienne et antioxydante des huiles essentielles de quelques plantes du genre *Thymus*. Mémoire de Master. Univ. Ziane Achoune – Djelfa. (2018)
- [49] : Dr. Boutella Saber, substances d'origine végétal, centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila (2020).
- [50] : Harbone J.B. & Williams C. A. Advances in flavonoid research since 199; Photochemistry, 55:481-504.(2000).
- [51] : Bruneton J & Pharmacognosie, Photochimie -Plantes médicinales. 3^{ème} édité, Tec et Doc. Lavoisier, Paris. . pp 484-540, 555-558.(1999)-
- [52] : Jutiviboonsuk A., Zhang H., Tan T.G., Ma C., Van Hung N., Cuong N.M., Jiri Triterpènes pentacycliques biologiquement actives et leur médecine actuelle; Université de Bohême du Sud, République Tchèque. (2003)
- [53] : Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. (2005), pp 121-216.
- [54] : Ghestman C., Culea M., Cozar O. Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS- Talanta; vol.53; (2001), pp. 253-262.
- [55] : Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole 554-558.(2005)
- [56] : Catier O et Roux D. Cahier du préparateur en pharmacie Botanique pharmacognosie et phytothérapie, pp 74.(2008)-
- [57] : MEBARKI NOUDJOUB. Mémoire de Magister en génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, Université Hamed Bougara Boumerdes, (2010).

- [58] :HARRAR Abd El Nacer, Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Biochimie et physiologie expérimentale, Université ferhat abbes setif, 2021.
- [59] : Bendif H.. Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques lamiaceae: *ajuga iva* (l.) schreb., *teucrium polium* l., *thymus munbyanus* subsp. *Coloratus* (boiss. & reut.) greuter & burdet et *rosmarinus eriocalyx* jord & fourr. Thèse de doctorat, Ecole normale supérieure de kouba-Alger, 154 p (2017)
- [60] :Favier A. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 2003; 108-117
- [61] : Amadou, D. . Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (Myrtaceae). Thèse, Pharmacie, Université de Bamako (Mali), 2005.
- [62] :Bensikaddour Hafidha Bachkat Samia, Etude phytochimique et activité biologique de mélange (feuilles, fleurs et brindilles) de *Thymelaea hirsuta*, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, 2016.
- [63] : Belmokhtar. Identification et caractérisation des molécules du métabolisme secondaire de *Retama monosperma*. L Boiss, intérêt pharmaceutique. Thèse de doctorat, Université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, 97p. 2015.
- [64]:atlas. Wagner, S. *Bladt, Plant drug analysis: a thin layer chromatography* Published Chemistry, Biology second edition, 1996.
- [65]:Amani BOULEGROUN et Roumila ARDJOUN, Evaluation de l'effet antioxydant de deux plantes endémiques en Algérie : *Thymus algeriensis* de Ain-Defla et *Lavandula antineae* de Biskra, (2018 – 2019)
- [66]:Hamid EL-Haoud, Moncef Boufellous, Assia Berrani, HindTazougart et Rachid Bengueddour, SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: *Mentha Spicata* L., Université Ibn Tofaïl, (2018).
- [67] : Ekoumou C. Phytochimie et pharmacologie de *Maerenacrassifolia* forsk.

(Caparidacée). Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Bamako (Mali), 168 pp.(2003).

[68] : Georgirskii B. P., Komissarenko N. F. & Dmitrou C. E. Les composés bioactifs des plantes médicinales, édition Naouka, 336 pp (traduit du Russe). . (1990).

[69]: Ladigina E.Y., Safronich L.N., Otriacheva V.E., Balandina I.A., Grinkevich N.I., Sorokina A.A., Glizin V.I., Molodojnikova L.M., Mitin Y.S., Samilina I.A. & Ermakova V.A. Analyse chimique des plantes médicinales, édition Moskvavischayachkola: 172 pp (traduit du russe). (1983).

[70]: H.P. Kaufmann, A.K. sen Gupta, Chem. Ber. 97, 2652 (1964).

[71]:Loche,J. 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. (1966).

[72] :M.S. Blois, Antioxydant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181, 1199-1200. (1958).

[73] : Echchengadda Gh et al. Etude phytochimique et activité antibactérienne de deux espèces de Lavandula autochtones au Maroc : «Lavandula stoechas L. et Lavandula dentata L». European scientific Journal 12(30) :(1857-7881)

[74]: vermerris w, nicholsonR .phenolic compound chemistry. Ed: SPRINGER P:1-70 (2006).

[75]: AMARI Nesrine Ouda, Etude Phytochimique, Potentiel Antioxydant et Activité antifongique de Thymelaea hirsuta (Cas des dermatophytes). Université abdelhamid ibn badiss Mostaganem.2015.

[76]: ABCHICHE Hamida,GHEMAM Zohra. Etude biologique d'extrait éthanolique de la propolis de la wilaya de "Bouira".Université A. M. OULHADJ - Bouira Faculté des Sciences et des Sciences Appliquées Département de Génie des Procédés.2016.

[77] : Noussaiba ZAGHEZ et Rebiha HENANOU. Étude de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits de la partie aérienne de Pituranthos Scoparius « Guezzah ». Université Mohamed Khider de Biskra Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie Département des sciences de la nature et de la vie. juillet 2019

[78] : MEDJOUJDA ouafa. Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales. Université d'Agadir - Licence 2012.

[79] : Abir fella KELOULI et Zohra BOUCHENTOUF. Polyphénols et Activité antioxydante de l'aloé vera. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.2018.

[80] : Amani BOULEGROUN et Roumila ARDJOUN. Evaluation de l'effet antioxydant de deux plantes endémiques en Algérie : *Thymus algeriensis* de Ain-Defla et *Lavandula antineae* de Biskra. Université Mohamed Khider de Biskra Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie Département des sciences de la nature et de la vie.2019.



Annexes

Annexe 1 : Réactifs chimique et appareillages utilisé.

| Réactifs chimiques | Appareillage |
|--|--|
| 2,2-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH). | Agitateur. |
| Acide ascorbique. | Balance de précision. |
| Acide gallique. | Évaporateur rotatif .Spectrophotomètre . |
| Acide sulfurique (H ₂ SO ₄). Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃). Chlorure ferrique (FeCl ₃) Hydroxyde de sodium (NaOH). Méthanol. | Vortex. |
| Réactif de Folin-Ciocalteu. Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃). | |

Annexe 2 : préparation des réactifs utilisées :

Réactif de FeCl₃ :

FeCl₃.....2mg.
MeOH.....100ml.

Réactif d'AlCl₃ :

AlCl₃.....1mg.
EtOH.....100ml.

Réactif de KOH :

KOH.....1mg.
MeOH.....100ml.

Réactif de SbCl₃ :

SbCl₃.....0,5g.
CHCl₃.....5ml.

Réactif de SbCl₃ :

SbCl₃20mg.

Acide acétique glacial.....20ml.

CH₃Cl₃.....20ml.

Vanilline:

Vanilline.....0,2g.

Acide sulfurique.....5ml.

Annexe 3 : Préparation des solutions pour le dosage de polyphénols

- Solution de l'acide gallique :

Dissoudre 1 mg d'acide gallique dans un volume de 1ml méthanol/eau (V/V : 80/20).

- Solution de Carbonate de sodium à 20%

Dissoudre 20g de Na₂CO₃ dans 100 ml de l'eau distillée.

- Solution de Folin-Ciocalteu

Diluée au (1/10), puis préparé dans l'eau distillée

Annexe 4:Préparation du DPPH

Solution de DPPH : dissoudre 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol

Annexe5:Préparation de 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

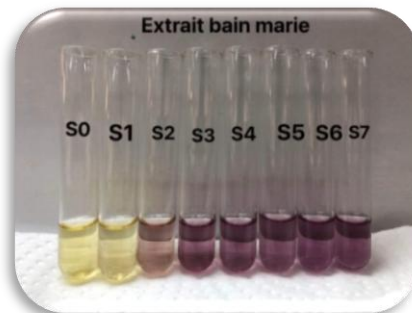
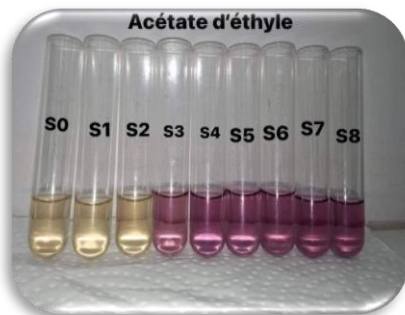
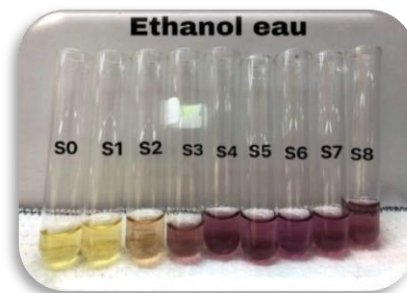
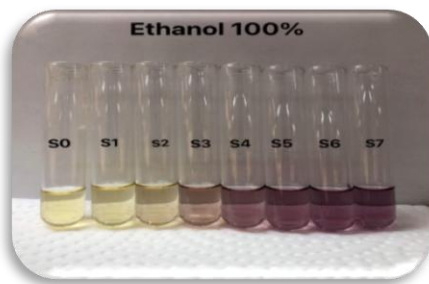
- Solution B

Iodure de potassium 10 g

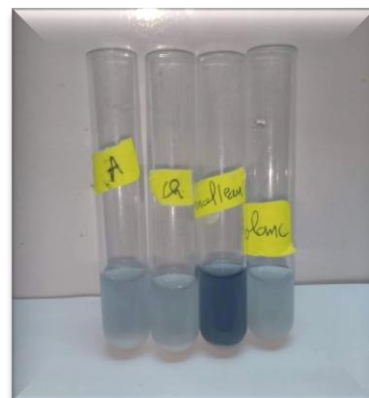
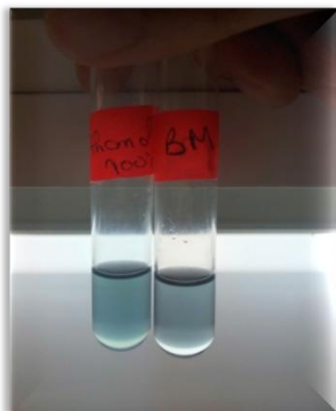
Eau distillée 100 ml

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.



Annexe 5 : Résultats d'activité antioxydant des extraits de *Thymelaea hirsuta*



Annexe 6 : Résultats de dosage des polyphénols.