



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Larbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie Appliquée

### Thème

Comparaisons des rendements  
d'extraction et des polyphenols chez  
*Thymelaea hirsuta* (L.)Endl.

### Présenté par

ADJAILIA AYA

DRID ILHEM

### Devant le jury

Zeghib Assia	MCA	Université De Tébessa	Présidente
Hioun Soraya	MAA	Université De Tébessa	Promotrice
Benhadj Mabrouka	MCB	Université De Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 10/06/2020



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Biochimie Appliquée

**Thème**

Comparaisons des rendements  
d'extraction et des polyphenols chez  
*Thymelaea hirsuta* (L.) Endl

**Présenté par**

**ADJAILIA AYA**

**DRID ILHEM**

**Devant le jury**

Zeghib Assia	MCA	Université De Tébessa	Présidente
Hioun Soraya	MAA	Université De Tébessa	Promotrice
Benhadj Mabrouka	MCB	Université De Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 10/06/2020





## Remerciements

*Louanges à Dieu de nous avoir donné tant de patience pour que nous puissions continuer malgré les défis et les difficultés, en particulier la pandémie du Coronavirus qui a frappé le monde et qui nous a empêchés de mener à terme nos expérimentations au laboratoire.*

*Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de biologie végétale de L'Université de Tebessa, El Arbi Tebessi.*

*Nous remercions chaleureusement les membres du Jury Mme Zeghib Assia et Mme Benhadj Mabrouka pour l'immense privilège qu'elles nous accordent en acceptant de présider et examiner ce travail.*

*Nous tenons tout particulièrement à exprimer nos plus sincères remerciements à Mme Hioun Soraya pour ces conseils judicieux et le temps consacré à l'encadrement de ce travail.*

*Un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, qu'ils trouvent ici l'expression notre profonde gratitude.*



## *Dédicace*

Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant de m'avoir donné la force et le courage pour accomplir ce modeste travail que je dédie à

***Mon Père Abd el madjid,***

l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon destin, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu le garde toujours pour moi.

***Ma mère,***

la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur.

***Mon cher oncle Abd el Ouahab***

Paix à son âme, que Dieu le garde dans son vaste paradis, tant est douloureuse son absence, ma joie restera incomplète sans lui...

***Mes très chères sœurs et frère***

Aux personnes qui m'ont énormément encouragé **Asma, Ali, Imene**

***Ma chère binôme Aya***

Je vous remercie, pour votre aide, votre travail acharné et enthousiasme dans notre binôme. Nous étions ensemble main dans la main, que Dieu vous protège...

Un grand merci à Mr **Hamza** et Mr **Aoun** pour leurs aides.

À toutes mes amies et mes collègues de promotion **Safa, Linda, Leila.**

À ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail: ma famille **Drid** ainsi que la famille **Ghozlane**. À tous ceux que j'aime, mes grands parents paternels et maternels, mes oncles et mes tantes.....

*Ilhem*





## Dédicace

Tout d'abord, je remercie **Allah**, Tout-Puissant, de m'avoir donné la force et l'aide pour faire ce travail.

### *A mes parents*

Pour ma chère mère, "**Benarfa Randa**" qui a été une source d'amour, de motivation et de grand soutien dans ma carrière universitaire.

À mon père, Papa **Abdallah**,

Vous êtes et resterez toujours pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que vous êtes. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour votre amour, votre générosité, votre compréhension... votre soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une longue vie et heureuse.

À mes sœurs et frères : **Abd EL Adhim, Chihab, Mohamed, Houda, Achwak** Pour votre soutien moral et encouragements, vous m'avez appris la patience et la concentration sur mon travail. Je vous souhaite un avenir plein d'amour, de bonheur et de réussite.

Je t'apprécie vraiment

À ma chère binôme **Ilhem Drid** Merci pour votre soutien moral, votre patience et votre dévouement à ce travail,

À toute ma famille : **ma grande-mère, Tante Hadda, Faiza, Abla, Houyem, Loubna, Ouarda, lokmane, Zakaria, Noumairi,**

Je dédie le fruit de nos efforts à vous et surtout à tous mes amis :

**khouloud, Najiba, Aya, Amina, Safa, Djihen, Linda,, monsieur Hamza et monsieur Aoun .**

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de la biologie végétale et du laboratoire de biochimie appliquée et surtout madame **Amel et Ouarda**

Merci à tous ceux qui ont participé à ce travail.

*Aya*



## ملخص

تعتمد هذه الدراسة على تحديد المواد النشطة بيولوجياً الموجودة في نبات المثنان.

*Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. ، وهو نبات طبي من منطقة بكارية، والذي يعد ذو أهمية كبيرة في الطب التقليدي.

أظهرت النتائج الكمية التي تم الحصول عليها بواسطة طرق الاستخلاص أن النقع البارد جعل من الممكن الحصول على عائد خام أفضل. كشف النقع الساخن والطررد المركزي عن قيم قريبة تقريباً من مستخلصاتها الخام. أظهرت النتيجة الإجمالية للاختبار أن المحصول الخام للأوراق يمكن تحديده كميّاً بواسطة مذيب إيثانولي ، في حين أن السيقان بواسطة مذيب إيثانولي مائي.

كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية عن العديد من المستقلبات الثانوية في الأجزاء الثلاثة من *T. hirsuta* (الأوراق والسيقان والزهور) ، مثل الفلافونويد والتانينات والمنشطات والقلويات.

تشير النتائج الكمية التي تم الحصول عليها عن طريق النقع البارد إلى أن محتويات البوليفينول الكلي في الأوراق هي الأعلى ولا سيما بواسطة المذيب المائي الإيثانولي. محتوى الفلافونويد الكلي في السيقان هو الأعلى مع استخلاص أفضل بواسطة المذيب الإيثانولي.

**الكلمات المفتاحية:** *Thymelaea hirsuta* ، طرق الاستخراج ، المحصول ، البوليفينول ، الفلافونويد ، الفحص الكيميائي النباتي.

### Résumé

Cette étude est basée sur l'identification et la quantification comparative des substances bioactives contenues dans *Thymelaea hirsuta*(L.)Endl, une plante médicinale de la région de Bekkaria, qui est d'une grande importance en médecine traditionnelle.

Les résultats quantitatifs obtenus par les méthodes d'extraction ont montré que la macération à froid permettait d'avoir un meilleur rendement brut. La macération à chaud et la centrifugation ont dévoilés des valeurs quasiment proches de leurs extraits bruts. Le résultat global du test a montré que le rendement brut des feuilles est plus quantifiable par un solvant éthanolique, alors que les tiges le sont par un solvant hydro-éthanolique.

Les tests phytochimiques ont mis en évidence divers métabolites secondaires dans les trois parties de *T. hirsuta* (feuilles, tiges, fleurs), tels que les flavonoïdes, les tanins, les stéroïdes et les alcaloïdes.

Les résultats quantitatifs obtenus par macération à froid indiquent que les teneurs en polyphénols totaux dans les feuilles sont les plus élevées et notamment par le solvant hydro-éthanolique. La teneur en flavonoïdes totaux dans les tiges est la plus élevée avec une meilleur extraxtion par le solvant éthanolique.

**Mots-clés:** *Thymelaea hirsuta*, méthodes d'extraction, rendement, polyphénols, flavonoïdes, Screening phytochimique.



## Abstract

This study is based on the identification and comparative quantification of the bioactive substances contained in *Thymelaea hirsuta*(L)Endl, a medicinal plant from the Bekkaria region, which is of great importance in traditional medicine.

The quantitative results obtained by the extraction methods showed that cold maceration made it possible to have a better raw yield. Hot maceration and centrifugation revealed values almost close to their crude extracts. The overall test result showed that the raw yield of the leaves is more quantifiable by an ethanolic solvent, while the stems are more by a hydro-ethanolic solvent.

Phytochemical tests have revealed various secondary metabolites in the three parts of *T. hirsuta* (leaves, stems, flowers), such as flavonoids, tannins, steroids and alkaloids.

The quantitative results obtained by cold maceration indicate that the contents of total polyphenols in the leaves are the highest and in particular by the hydro-ethanolic solvent. The content of total flavonoids in the stems is highest with better extraction by the ethanolic solvent.

**Keywords:** *Thymelaea hirsuta*, extraction methods, yield, polyphenols, flavonoids, Phytochemical screening.



# *Table des matières*

Remerciements .....	<b>i</b>
Résumés.....	<b>ii</b>
Table des matières.....	<b>iii</b>
Liste des figures.....	<b>iv</b>
Liste des tableaux .....	<b>v</b>
Liste des abréviations.....	<b>vi</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>02</b>
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : <i>Thymelaea hirsuta</i>(L.)Endl.....</b>	<b>04</b>
I.1. Généralités .....	05
I.2. Taxonomie .....	05
I.3. Description Botanique .....	06
I.4. Biologie et Ecologie.....	07
I.5. Utilisations traditionnelles.....	08
I.6. Les principes actifs de <i>T.hirsuta</i> .....	08
I.7. Composés phénoliques.....	10
I.7.1. Flavonoïdes .....	11
I.7.2. Acides phénoliques .....	11
I.7.3. Tannins .....	12
I.7.4. Coumarines.....	13
I.7.5. Alcaloïdes .....	13
I.7.6. Terpenoides.....	14

**Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1. Situation géographique de la zone d'étude.....	16
II.2. Matériel végétal.....	16
II.3.Préparation des extraits .....	17
II.3.1. Extraction par macération à chaud .....	17
II.3.2. Extraction par macération à froid .....	18
II.3.3. Extraction par centrifugation .....	18
II.4. Détermination du rendement brut .....	19
II.5. Compositions chimiques .....	19
II.5.1. Screening photochimique.....	21
II.5.1.1. Flavonoïdes et leucoanthocyanes .....	21
II.5.1.2. Quinones .....	21
II.5.1.3. Saponines .....	22
II.5.1.4. Tanins .....	22
II.5.1.5. Recherches stéroïdes et terpenoïdes.....	22
II.5.1.6. Alcaloïdes .....	23
II.5.1.7.Coumarines .....	23
II.5.2. Estimation quantitative .....	24
II.5.2.1.Dosage des polyphénols totaux .....	24
II.5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	24
II.6. Analyse statistique.....	25

**Chapitre III : Résultats et discussion générale**

III.1. Résultats .....	27
------------------------	----

## *Table des matières*

---

III.1.1 Analyse qualitative .....	27
III.1.1.1 Screening phytochimique .....	27
III.1.2. Analyse quantitative .....	28
III.1.2.1. Rendements d'extraction .....	28
III.1.2.2. Quantification des composées phénoliques.....	30
III.1.2.3. Dosage des Polyphénols totaux .....	30
III.1.2.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	31
III. 2. Discussion générale.....	33
III.2.1. Screening phytochimique .....	33
III.2.2. Rendements d'extraction .....	33
III.2.3. Dosage des polyphénols totaux .....	35
III.2.4. Dosage des flavonoïdes totaux .....	36
Conclusion .....	38
Références bibliographiques	
Annexes	

**Chapitre I : *Thymelaea hirsuta*(L.)Endl.**

**Figure 01** : *Thymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher A- vue générale ; B -feuilles cotonneuses ; C- fleurs mâles. D- fleurs femelles.....08

**Figure 02** : .Classification des polyphénols .....10

**Figure 03** : Squelette des flavonoïdes.....11

**Figure 04** : Structure basique des acides phénoliques .....12

**Figure 05.** Acide tannique .....13

**Chapitre II : Matériel et Méthodes**

**Figure 06** . Séchage du matériel végétal (photo originale).....16

**Figure 07.** Broyage des parties végétales de *T.hirsuta* .....17

**Figure 08.** Extraction éthanolique par centrifugation .....18

**Figure09.** Méthodes d'extraction .A : par macération à chaud ; B : par macération à froid ; C : Par centrifugation.....20

**Chapitre III : Résultats et Discussion**

**Figure 10.** Rendement brut des composés phénoliques obtenus à partir de *T. hirsuta* par trois Méthodes d'extraction (macération à chaud, centrifugation, macération à froid) à partir de trois extrait (alcoolique, hydro-alcoolique et hydrique) au niveau des feuilles et des tiges.....29

**Figure 11.** Teneurs en polyphénols totaux en fonction de concentration des solvants et des parties végétales.....31

**Figure 12.** Teneurs en flavonoïdes totaux en fonction de concentration des solvants et des parties végétales.....32

**Chapitre I : *Thymelaea hirsuta*(L.)Endl**

**Tableau 01** : Principaux types de coumarines .....13

**Chapitre II : Matériel et Méthodes**

**Tableau 02** .Mise en évidence des principaux principes actifs chez *T. hirsuta*.....28

**Chapitre III : Résultats et Discussion**

**Tableau 03.** ANOVA des rendements bruts entre l'extraction et l'interaction extraction partie végétale de *T.hirsuta* .....30

**Tableau 04.** ANOVA des polyphénols totaux de *T.hirsuta*. .....31

**Tableau 05.** ANOVA des flavonoïdes totaux de *T.hirsuta*.....32





# *Introduction*

## **Introduction générale**

Une grande génération de radicaux libres, en particulier les espèces réactives de l'oxygène, et leur activité élevée jouent un rôle important dans le développement d'un grand nombre de troubles pathologiques. En conséquence, un grand intérêt a récemment été porté sur les aliments naturels, les plantes médicinales et les phytoconstituants en raison de leur capacité bien connue à éliminer les radicaux libre (Atoui et *al.*, 2015).

L'inventaire réalisé par l'OMS à la fin des années 1970 estime qu'il existe environ 21 000 espèces possédant des propriétés médicinales dans le monde (Schippman et *al.*, 2002). En fait, en raison de la pauvreté et du manque de médecine moderne, environ 65% à 80% de la population mondiale utilise des médicaments traditionnels pour répondre à leurs besoins de santé de base (Palomo, 2011; OMS, 2013).

La richesse et la diversité de la flore algérienne constituent un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4 000 espèces et sous-espèces vasculaires (Dobignard et Chatelain, 2013). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, la flore médicinale d'Algérie est encore inconnue, car il y a des milliers de plantes, et Seulement 146 sont comptés médicinales (Baba Aissa, 1999).

Le choix des Thymelaeaceae comme sujet du présent travail a été guidé par des nombreuses applications traditionnelles, mais aussi du fait qu'il s'agit d'une famille relativement méconnue. *Thymelaea hirsuta*, communément appelé "Methnane" en Algérie, est un arbuste à feuilles persistantes appartenant à la famille des fleurs Thymelaeaceae, originaire de la région méditerranéenne, au nord de l'Europe centrale et orientale de l'Asie centrale. Cette plante est traditionnellement utilisée en Tunisie comme antiseptique, anti-inflammatoire et pour le traitement de l'hypertension (Amari et *al.*, 2014). L'utilisation médicinale de cette plante est basée sur la recherche de sa composition phytochimique, en particulier les polyphénols (tels que les flavonoïdes, les phénylpropanoïdes, les acides phénoliques, les tanins,...etc.) sont connus pour être responsables de l'élimination des radicaux libres et des activités antioxydantes, ainsi que leur efficacité antimicrobienne (Kerboub, 2018).

Les travaux antérieurs sur les rendements en polyphénols de *T. hirsuta* sont peu nombreux. Par conséquent, l'objectif de cette étude était de comparer et d'évaluer in vitro le rendement de trois échantillons de trois extraits : aqueux, alcoolique et hydro-alcoolique des

feuilles et des tiges de *T. hirsuta* obtenus par trois méthodes : macération à chaud, macération à froid et centrifugation. La première étape de notre travail a été la mise en évidence des principales classes de métabolites secondaires des feuilles et des tiges (criblage phytochimique) ainsi que la détermination quantitative des composés phénoliques et des flavonoïdes contenus dans les différents extraits des feuilles et des tiges, afin de fournir une base pour justifier son usage thérapeutique et de rechercher de nouvelles sources d'antioxydants sûrs et peu coûteux.

Pour ce faire, nous avons structuré notre travail en une partie bibliographique présentant un aperçu d'une part, sur les composés phénoliques et d'autre part, sur la plante *T. hirsuta*, suivie d'une autre partie rassemblant le matériel et les méthodes utilisées et enfin, les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus à partir des rendements et des composés recherchés suivi d'une discussion globale et une conclusion.

# *Chapitre I*

*Tymelaea hirsuta(L.)Endl.*

### I.1. Généralités

Selon Watson et Dallwitz, (1992) la famille des Thymelaceae comprend près de 500 espèces réparties en 44 genres essentiellement des arbres et arbustes, rarement des lianes ou des plantes herbacées. Cette famille cosmopolite a comme genres principaux *Gnidia* (160 espèces), *Pimelea* (110), *Daphne* (95), *Wikstroemia* (70), *Daphnopsis* (65), *Struthiola* (35), *Lachnaea* (30), *Thymelaea* (30), *Phaleria* (30) et *Gonystylus* (25). En Algérie les Thymelaeaceae sont représentées par le genre *Thymelaea* et *Daphne* (Quezel et Santa, 1963).

Le genre *Thymelaea* comprend trente et une espèces d'arbustes et d'herbes annuelles (Watson et Dallwitz, 1992). Parmi elles, huit espèces sont présentes en Algérie : *T. hirsuta*, *T. microphylla*, *T. passerina*, *T. velutina*, *T. virgata*, *T. nitida*, *T. virescens* et *T. tartonraira* (Quezel et Santa, 1963).

*Thymelaea hirsuta* du nom arabe « Metnan » et du français thymélée hirsute, passerine cotonneuse, passerine hérissée et passerine hirsute. Du grec thumos : thym et elaia : olivier ; du latin hirsutus : hirsute, hérissé de poils, et passer ; moineau (graines recherchées par les passereaux) (Rameau et al., 2008).

### I.2. Taxonomie

Selon la classification classique de Cronquist et al. (1981) la position taxonomique de *Thymelaea hirsuta* est comme suit

**Règne :** Plantae

**Sous règne :** Tracheobionta

**Embranchement :** Phanérogames

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous classe :** Rosidae

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Thymelaeaceae

**Genre :** *Thymelaea*

**Espèce :** *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., 1847

Et selon la classification phylogénétique APG III 2009 (systématique moléculaire) (INVP, 2019), les Thymelaeaceae, qui étaient anciennement associées aux Myrtales se retrouvent dans l'ordre des Malvales.

**Règne :** Plantae Haeckel, 1866

**Sous-Règne** : Viridaeplantae

**Infra-Règne** : Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011

**Classe** : Equisetopsida C.Agardh, 1825

**Clade** : Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998

**Clade** : Spermatophyta

**Sous-Classe** : Magnoliidae Novák ex Takht., 1967

**Super-Ordre** : Rosanae Takht., 1967

**Ordre** : Malvales Juss. ex Bercht. & J.Presl, 1820

**Famille** : Thymelaeaceae Juss., 1789

**Genre** : *Thymelaea* Mill., 1754

**Espèce** : *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl., 1847

Par la mondialisation des banques de données du règne vivant et notamment végétal ; la vérification des herbiers par le biais de différents caractères (du morphologique au moléculaire) à générer au niveau nomenclature botanique des synonymes différents désignant un même taxon. Selon Tela Botanica (2020) et INPN (2019) *T. hirsuta* a pour synonymes :

- *Daphne hirsuta* (L.) Samp., 1947
- *Passerina hirsuta* proles *polygalifolia* (Lapeyr.) Rouy, 1910
- *Passerina hirsuta* L., 1753
- *Passerina metuan* Forssk., 1775
- *Passerina polygalifolia* Lapeyr., 1813
- *Passerina telonensis* Gand., 1875
- *Piptochlamys hirsuta* (L.) C.A.Mey., 1843
- *Sanamunda tomentosa* Zumagl., 1849
- *Tartonia ovatifolia* Raf., 1840
- *Thymelaea hirsuta* var. *hirsuta* (L.) Endl., 1847
- *Thymelaea hirsuta* var. *polygalifolia* (Lapeyr.) Endl., 1848

### 1.3. Description Botanique

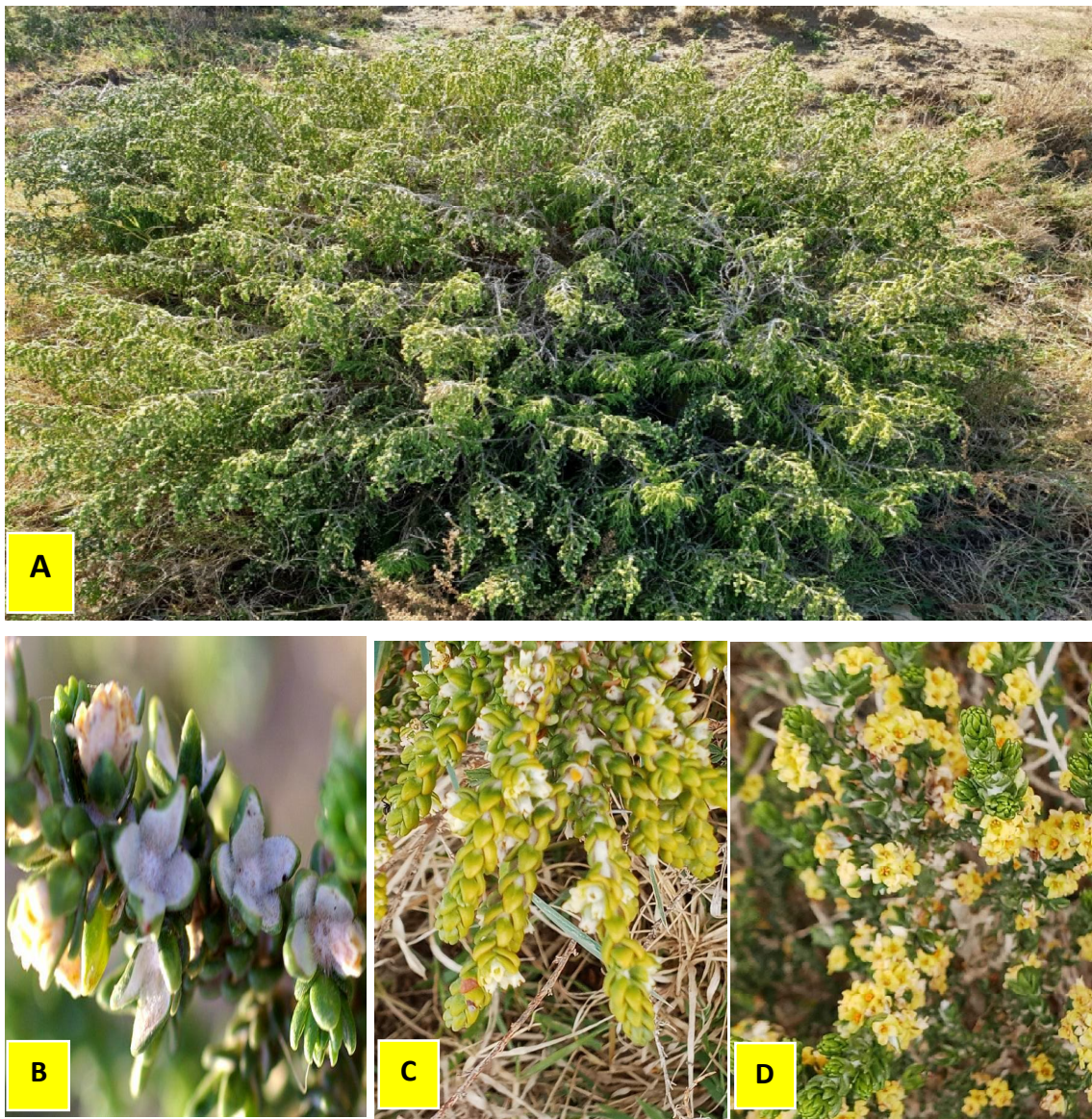
*T. hirsuta* est un sous arbrisseau de 40 à 100 cm ; nanophanérophyte, sempervirente (Rameau et al., 2008). Plante à tiges dressées (Fig. 01 A), grêle, rameuse à la base, glabre ou ± pubescente. Feuilles linéaires, lancéolées, petites 3-10 mm de long et 1-4 mm de large, présentes tout au long de la tige (Fig. 01 B), sessiles (Quezel et santa, 1963).

La plante porte sur des pieds différents, soit des fleurs unisexuées, soit des fleurs hermaphrodites (Shaltout et El keblawy, 1992 ; Dommée et *al.*, 1995 ; Jeanmonod et Gamisans, 2007). Les fleurs mâles verdâtres ont un calice cylindrique (Fig. 01 C), alors que celles femelles sont jaunâtres à calice renflé (Fig. 01 D). Les fleurs de 5 mm sont groupées entre 2 et 5 périanthes jaunâtres à l'intérieure, blanches, soyeuses et pubescentes à l'extérieur (Beniston, 1984 ; Somon, 1987). La plante est entomogame dont la dispersion du pollen (assurée par les insectes) (Cornara et *al.*, 2005). Les fruits sont des baies glabres, consommés par les animaux assurent la dispersion des graines (dispersion zoochore) (Jeanmonod et gamisans, 2007). Ces dernières présentent un tégument extérieur rugueux et assez dur. L'embryon est droit dans un albumen peu abondant (Beniston, 1984).

#### 1.4. Biologie et Ecologie

Elle est aperçue dans les régions méditerranéennes, saharo-arabique, et dans la côte nord du Sinaï et en Israël (Tackholm, 1974 ; Shaltout et El shourbagy, 1989 ; Veste et *al.*, 2008). Elle est nettement localisée dans les étages climatiques thermo- et mésoméditerranéenn (Rameau et *al.*, 2008). Les principes actifs 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 (Shaltout, 1992). Il semble que la salinité du sol, sa faible teneur en humidité et ses températures extrêmes (thermophiles) et son comportement heliophile favorisent les activités phénologiques de *T. hirsuta* (Shaltout, 1987 ; Rameau et *al.*, 2008). La survie de *T. hirsuta* est assurée par la reproduction sexuelle qui s'est avérée être le seul moyen de régénérer naturellement les populations, par contre la reproduction végétative est difficile à mettre en œuvre (Minuto et *al.*, 2005).





**Figure 1.** *Tymelaea hirsuta* (Linné) Endlicher. A- vue générale ; B -feuilles cotonneuses ; C- fleurs mâles. D- fleurs femelles. (Photos personnelles, 2020).

### 1.5. Utilisations traditionnelles

Cette plante est utilisé aussi pour les traitements d'une gamme très étendue de troubles ; la toux, les blessures du système respiratoire, l'inflammation intestinale et rénale (Dasgupta, 2011), antidiabétique (hypoglycémiant) (Ziyyat *et al.*, 1997 ; Djeridane *et al.*, 2006) , antioxydant (El Amrani *et al.*, 2009), et anti-mélanogénèse (Kawano *et al.*, 2007).

### 1.6. Les principes actifs de *T. hirsuta*

Les principes actifs sont des substances ou métabolites contenus dans la plante qui lui donne toutes ses propriétés thérapeutiques et selon Hartmann (2007) on distingue deux classes

de métabolites : métabolites secondaires et métabolites primaires.

Les métabolites primaires sont vitaux à la survie de la cellule comme les glucides, les lipides et les acides aminés, directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction de l'organisme (Diallo, 2000).

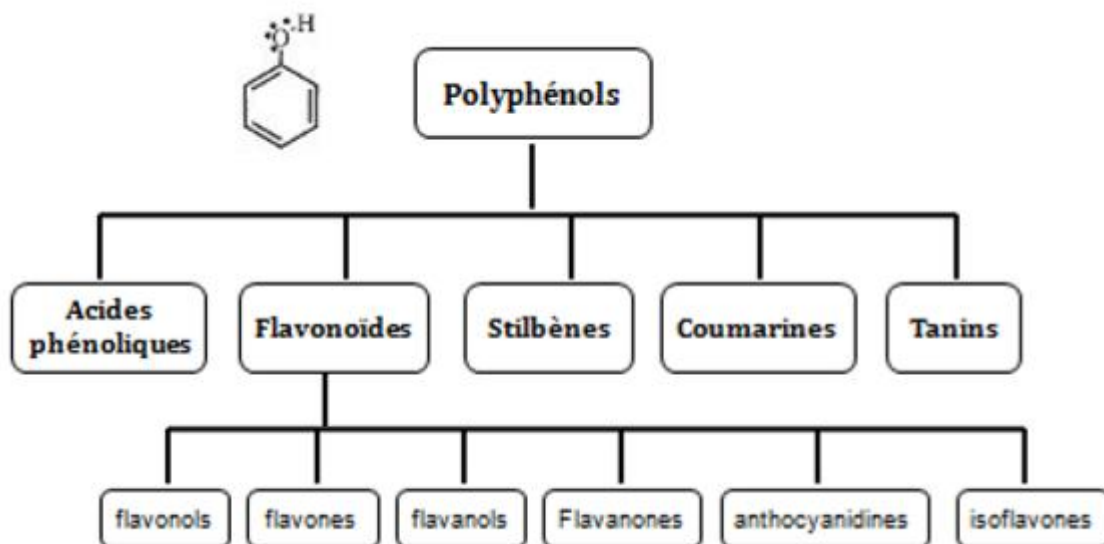
Les métabolites secondaires ont une large utilisation en thérapeutique, on les trouve dans toutes les parties des plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Les screenings phytochimiques sont des approches préliminaires de l'absence ou présence de principes actifs permettant une évolution expérimentale plus poussée qui ont montré pour *T. hirsuta* la présence des tanins, des coumarines, des saponines, des terpénoïdes, des antraquinones et des alcaloïdes (Amari et al., 2014). Selon les méthodes d'extraction et les solvants utilisés beaucoup de recherches ont indiqué l'existence d'une grande panoplie de composés chez *T. hirsuta* (Rizk et al., 1975 ; Nawwar et al., 1977 ; Brooks et al., 1990 ; El-Beheiry, 2000 ; Yahyaoui et al., 2018). Parmi les principales familles de métabolites secondaires que les recherches ont mis en évidence sont les Composés phénoliques. Les travaux d'Akrout et al. (2011) montrent dans des extraits de 50 % d'éthanol des teneurs en flavonoïdes de 36.8 mg RE/g d'extrait et de 345.2 mg GAE/g d'extrait en polyphénols totaux, ces extraits ont montré une activité anti tumorale significative, alors qu'elles sont négligeables par infusion,

Selon Trigui et al. (2013) la décoction a permis d'obtenir des teneurs totales en phénols et en flavonoïdes très élevées dans les extraits d'acétone et d'acétate d'éthyle avec  $147.6 \pm 1.85$  mg GAE/g et  $101.6 \pm 7.52$  mg GAE/g respectivement avec des propriétés antibactériennes et antifongiques pour ce dernier extrait en utilisant une concentration de 0.624 mg / ml. D'autres travaux par décoction ont montrés dans des extraits aqueux pour différentes parties de la plante de 61.12 mg GAE/g à 113.96 mg GAE/g de polyphénols totaux et de 2.61 mg QE/g à 3.15 mg QE/g en flavonoïdes (Amari et al., 2014). La macération de la poudre de *T. hirsuta* a exposé pour différents solvants des extraits riches en composés phénoliques variant de 5.38 à 315.65 mg GAE/g MS et des tannins de 0.7 à 73.8 mg CE/g MS (Yahyaoui et al., 2018). Les travaux cités mettent en évidence la présence ses composés phénoliques mais avec des teneurs différentes selon la méthodologie expérimentale utilisée. Les recherches sur les polyphénols suscitent beaucoup d'intérêt en raison des bénéfices qu'elles pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées au vieillissement, infarctus du myocarde, cancers, et maladies neurodégénératives (Hennebelle et al., 2004). Pour les molécules extraites nous exposons quelques une tant elles sont nombreuses chez *T. hirsuta* 6,8-d& GB-D-glucopyranosylapigenin (vicenin-2) (Nawwar et al., 1977) aussi

des daphnorine, daphnorétine, daphnine, daphnétine, daphnétine-glucoside, ombelliférone, scopolétine et esculétine (coumarines) (Rizk *et al.*, 1975), des gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine, 12-Oheptadécenoyl- 5-hydroxy-6,7-époxyrésiniféronol- 9,13,14-orthobenzoate et 12-Obutényl- 5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol- 9,13,14-orthobenzoate (diterpènesdaphnane) (Brooks *et al.*, 1990) ...etc.

### I.7. Composés phénoliques

Les polyphénols, sont des groupes de molécules aux structures diverses, trouvent déjà une large utilisation en phytothérapie. Cependant, leurs connaissances sont encore imparfaites, mais elles suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison des bénéfices qu'elles pourraient apporter en termes de prévention des maladies liées au vieillissement : infarctus du myocarde, cancers, maladies neurodégénératives (Hennebelle *et al.*, 2004). Ils sont également impliqués dans la défense des plantes contre les rayons ultraviolets ou l'agression par des agents pathogènes et selon (Pandey et Rizvi, 2009), les composés phénoliques constituent l'un des groupes de produits chimiques les plus étendus du règne végétal, dans lequel plus de 8000 composés ont été isolé et décrit par une structure caractérisée par la présence, au moins, d'un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Fig. 02).



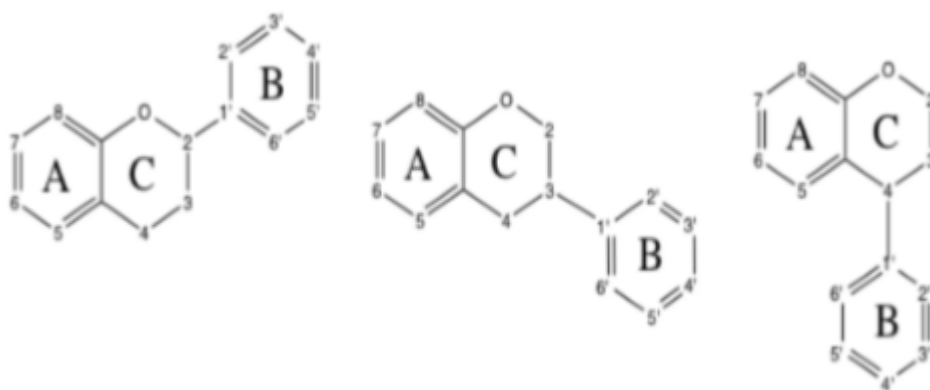
**Figure 02.** Classification des polyphénols (Zerargui, 2018).

Et ici, dans notre recherche, nous rapportons les sous-classes suivantes : flavonoïdes, acides phénoliques, tanins, coumarrine, lignan et lignine.



### I.7.1. Flavonoïdes

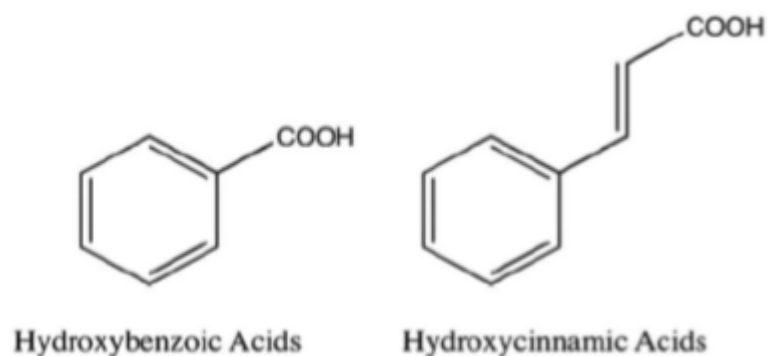
Les flavonoïdes sont des pigments végétaux, simples ou glycosylés, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Les flavones (par exemple, l'apigénol 13) et flavonols (comme le quercétol 14), incolores, ont un rôle de co-pigment et de protection alors que les flavonoïdes jaunes (chalcones comme l'isoliquiritigénine 16, auronones dont l'hispidol 17, et flavonols jaunes) et les anthocyanosides bleus et rouges sont directement visibles (Krief, 2003), ce composé se caractérise par 3 cycles, A, B et C, dont seuls A et B sont des cycles phénolique, le cycle C étant un cycle chromanique (Fig. 03). Cette structure est généralement noté C6-C3-C6. La structure générale de cette famille présente le cycle B en position C2 de cycle C. Cependant, certaines sous-classes de flavonoïdes diffèrent sur ce point avec une Obligation C3 ou C4. En effet, de nombreuses sous-classes se cachent derrière cette dénominateur commun : anthocyanes ; chalcones; les dihydrochalcones; les flavanols; les flavanones; les flavonols; isoflavones... etc (Djenidi, 2020)



**Figure 03.** Squelette des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

### I.7.2. Acides phénoliques

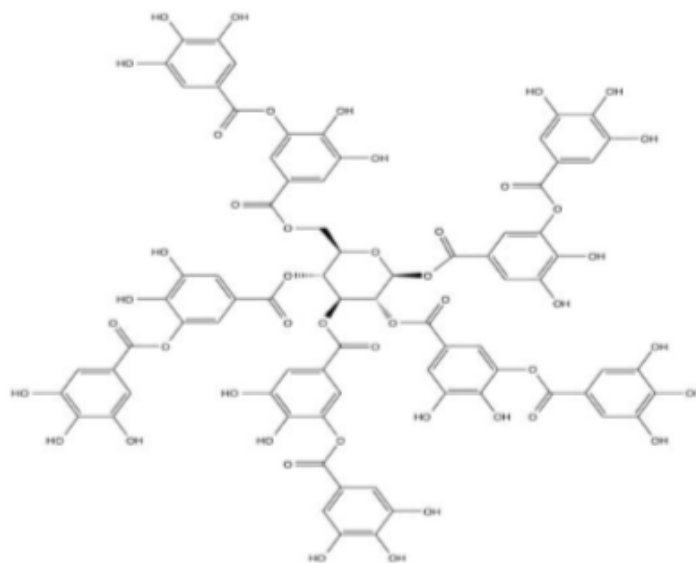
Les acides phénoliques se trouvent en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Fig. 04) (Pandey et Rizvi, 2009).



**Figure 04.** Structure basique des acides phénoliques (Dehimi, 2018)

### I.7.3. Tanins

Les tanins sont des composés plus gros que les classes décrites précédemment. En effet, ce sont des molécules de polymère (Fig. 05) (Djenidi, 2020). Deux sous-classes se distinguent encore parmi les tanins : les tanins hydrolysables sont dérivés d'acides phénoliques simples, qui sont liés au Sucre par estérification et les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères de flavan-3-ols (catéchines) et de flavan-3,4-diols (leucoanthocyanines), ils ne sont que partiellement solubles dans l'eau et l'alcool (Berthod et *al.*, 1999 ; Pengelly et *al.*, 2004 ).



**Figure 05.** Acide tannique (Djenidi, 2020)

#### I.7.4. Coumarines

Selon Cowan (1999), les coumarines sont des composés phénoliques constitués d'un benzène et des noyaux à-pyrènes, ces composés caractérisés par des propriétés physiologiques et antimicrobiennes (Dongmo, 2009).

**Tableau 01 :** Principaux types de coumarines (Macheix et *al.*, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Scopolétole
	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

#### I.7.5. Alcaloïdes

Parmi les premiers produits naturels isolés des plantes médicinales, les alcaloïdes ; il s'agit d'un composé organique à structure azotée hétérocyclique, plus ou moins basique

d'origine naturelle, végétale, principalement dans les angiospermes, à des exceptions encore (lycopodine de lycopode, palustrine chez Equisetum) sont extraits soit dans l'eau acide ou dans des solvants tels que le chloroforme après alcalinisation. (Menasria, 2013 ; Abdel-Hameed, 2009).

Les alcaloïdes ont été divisés en trois classes principales selon les précurseurs et la structure finale :

- **Alcaloïdes vrais** : dérivés des acides aminés, basiques et contiennent l'azote dans l'hétérocycle comme la nicotine.
- **Pseudo-alcaloïdes (typique)** : similaires à la propriété de véritables alcaloïdes, ils sont basiques mais ne dérivent pas d'acides aminés comme la caféine (Menasria, 2013).
- **Proto-alcaloïdes (atypique)** : sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, elles ont un caractère basique et sont produites *in vivo* à partir d'acides aminés comme la colchicine

#### **1.7.6. Terpénoïdes**

Ces composés ne sont pas spécifiques aux végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou sesquiterpènes et diterpènes se retrouvent également chez les animaux, sa structure étant formée de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiés, dérivé du 2-méthylbutadiène (polymères d'isoprène). Selon le nombre d'unités d'isoprène définies, les classes suivantes sont distinguées : monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterterpènes (C25), triterpènes (C30) et tétraterpènes (C40). Les terpènes simples en C10 et C15 sont certainement apparus tardivement au cours de l'évolution et caractérisent les plantes vasculaires qui ont développé des appareils sécrétoires (Krief, 2003).

*Chapitre II*  
*Matériel et Méthodes*



### II.1. Situation géographique de la zone d'étude

*T. hirsuta* a été récoltée au niveau de la wilaya de Tébessa dans la région de Bekkaria, qui est caractérisée par un climat semi-aride avec un été chaud et un hiver froid.

Cette région est liée par la route nationale N°08, cette commune s'inscrit entre les coordonnées suivantes : latitude 35.365832, longitude 8.249351 et une altitude de 926m.

### II.2. Matériel végétal

*T. hirsuta* a été choisies dans cette étude par sa présence dans la région de Tébessa et son utilisation en médecine traditionnelle par certain de la population locale. Cette espèce a été récoltée au stade floraison au cours de l'année 2019 au mois de Décembre.

La récolte des échantillons a été effectuée sur trois arbustes de *T. hirsuta* avec trois répétitions par plante. Le matériel végétal a été séché à l'air libre et à l'ombre (Fig. 06).



**Figure 06 .** Séchage du matériel végétal (photo originale)

Les parties utilisées dans l'expérimentation sont les feuilles (F), les tiges (T) et les ramifications (R), chaque partie est broyée finement. Le matériel végétal a été broyé à l'aide d'un broyeur (Fig. 07) électrique afin d'augmenter la surface de contact entre la matière végétale et le solvant utilisé. Le broyat obtenu a été conservé dans des sachets en papier à température ambiante, dans un endroit sec et à l'abri de l'humidité et de la lumière jusqu'à son utilisation au laboratoire.



**Figure 07.** Broyage des parties végétales de *T.hirsuta* (photo originale)

### II.3. Préparation des extraits

Dans le but d'extraire les substances actives de la plante *T. hirsuta*, trois méthodes d'extraction ont été utilisées, la macération et la centrifugation avec deux solvants à chaud : l'eau distillée et l'éthanol et la macération à froid (Annexe 01).

#### II.3.1. Par macération à chaud

La méthode d'Upson et *al.* (2000) extraction solide/liquide, le matériel végétal finement broyé (5g) a été soumis à une extraction par macération dans un liquide de 150 ml chaud à 95°C, sous agitation magnétique à 80°C (30 min). Ce procédé empêche l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique. Celle-ci a été réalisée pendant trois jours successifs et à une température ambiante avec une filtration à l'aide d'un papier Whatman, avec renouvellement du solvant chaque 24 heures. Les trois macéras sont réunis pour une utilisation ultérieure (extraits bruts). Trois liquides ont été utilisés pour la macération :

- Milieu aqueux : 100% eau distillée chaude.
- Milieu hydro-alcoolique : mélange éthanol/eau (7/3 : v/v).
- Milieu alcoolique : 100% éthanol.

Les extraits bruts ont été obtenus après évaporation à l'étuve à 50°C.

### II.3.2. Extraction par macération à froid

Les polyphénols, classe de molécules hydrosolubles, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte. Ainsi, le solvant qui a été choisi pour notre étude est l'éthanol qui présente une polarité moyenne, et l'eau dont la polarité est la plus élevée.

L'extraction est faite par un mélange éthanol /eau (v/v) (30 :70), (50 :50), (70 :30) et (100/ 00) pour 2 g de poudre de végétal, pendant 72 heures avec renouvellement du solvant chaque 24 heures et agitation de temps à autre. Chaque 24h on récupère le macéra de chaque échantillon séparément.

Les macéras des 3 jours pour chaque échantillon sont réunis puis filtrés par du tissu mousseline. Les filtrats sont évaporés à sec dans l'étuve à 50°C.

### II.3.3. Par centrifugation

Après agitation, pendant 15 minutes à température ambiante, le mélange (végétal + solvant) est centrifugé à 4000 tours par minute pendant 10 minutes. Le surnageant est conservé au réfrigérateur pour des analyses ultérieures.

Trois liquides ont été utilisés pour la centrifugation :

- Milieu aqueux : 100% eau distillée chaude.
- Milieu hydro-alcoolique : mélange éthanol/eau (7/3 : v/v).
- Milieu alcoolique : 100% éthanol.
- Les extraits bruts ont été obtenus après évaporation à l'étuve à 50°C (Fig. 08).



**Figure 08.** Extraction éthanolique par centrifugation (photo originale)

**II.4. Détermination du rendement brut**

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée (Falleh et *al.*, 2008) :

$$R (\%) = 100 M.\text{ext} / M.\text{éch}$$

**R** : est le rendement en pourcentage

**M.ext**: est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg

**M.éch**: est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg

**II.5. Compositions chimiques**

Toutes les matières obtenues après évaporation suite à la macération et la centrifugation sont reprises dans le méthanol (15 ml à chaque échantillon). La solution obtenue est laissée décanter 24 h à une température ambiante puis filtrée sur tissu et papier filtre n° 3, afin d'éliminer les substances non phénoliques (impureté, graisses, cires... etc), puis conservée à 4°C jusqu' à utilisation.

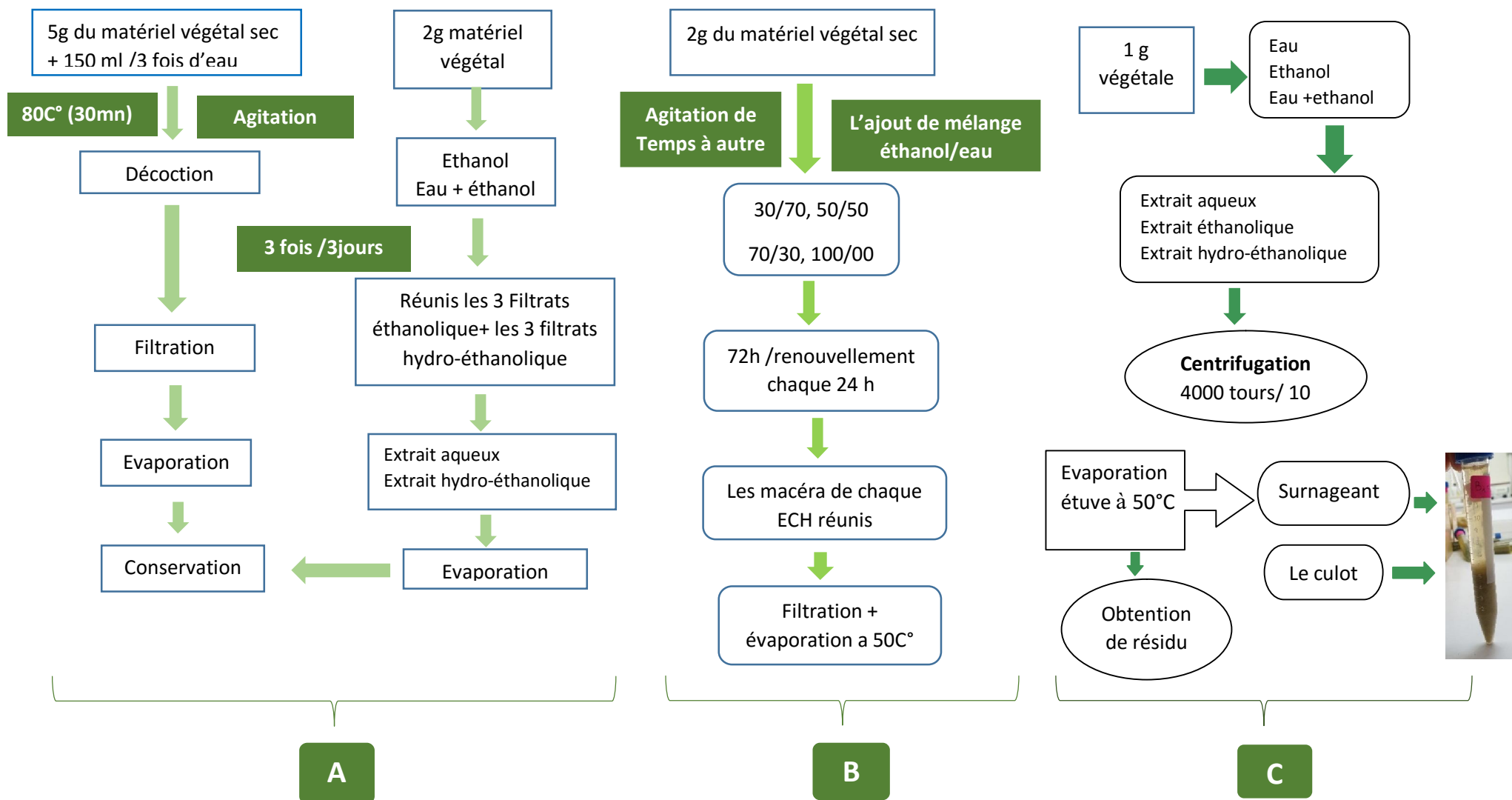


Figure 09. Méthodes d'extraction .A : par macération à chaud ; B : par macération à froid ; C : Par centrifugation.

### **II.5.1. Screening phytochimique**

C'est une technique qui permet de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les quinones, les stéroïdes, les terpènes.

Selon Luhata *et al.* (2008) les paramètres photochimiques ont été mis en évidence :

#### **II.5.1.1. Flavonoïdes et leucoanthocyanes**

##### **II.5.1.1.1. Principe**

En présence de NaOH 1N, de HCl concentré et des copeaux de Magnésium, les flavonoïdes donnent les réactions de coloration caractéristique. En présence des flavonoïdes, les colorations suivantes peuvent être obtenues : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge-violacé, rouge-foncé au violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées. Ces couleurs correspondent respectivement aux anthocyanes, flavones, flavonels, flavonones, isoflavones et leucoanthocyanes.

La même réaction effectuée au bain marie en absence de copeaux de Magnésium est effectuée ; l'apparition de la coloration rouge confirme la présence des leucoanthocyanes.

##### **II.5.1.1.2. Mode opératoire**

5 g de matériel végétal placés dans un Erlen meyer sont infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, 6 ml d'infusé sont prélevés et introduits dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube. A l'infusé contenu dans les 3 tubes à essai sont additionnés respectivement, 1 ml de NaOH, 1ml d'eau distilée et 1ml de HCl concentré et de copeaux de Magnésium.

#### **II.5.1.2. Quinones**

##### **II.5.1.2.1. Principe**

En présence de NaOH à 10 %, les solutions des quinones présentent une coloration caractéristique virant du rouge au violet.

##### **II.5.1.2.2. Mode opératoire**

5 g de matériel végétal sont broyés et humectés de quelques gouttes de HCl. La macération de ce matériel végétal ce fait dans un Erlen Meyer fermé et contenant 10 ml

d'éther de pétrole pendant une heure ou 24 heures. Après filtration, 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de NaOH à 10 %. La coloration rouge virant au violet apparaît en présence des quinones.

### **II.5.1.3. Saponines**

#### **II.5.1.3.1. Principe**

Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparaît dans les solutions de saponines.

#### **II.5.1.3.2. Mode opératoire**

5 g de matériel végétal trituré sont mis dans un Erlen Meyer dans lequel on y ajoute 50 ml d'eau distillée pour réaliser une décoction pendant 30 minutes. Après refroidissement, 5 ml du décocté sont filtré et prélevé et introduit dans un tube à essai de 16 mm de diamètre et 160 mm de hauteur après agitation.

L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

Cependant, en cas d'une faible mousse, le décocté est testé avec un mélange à volume égal de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N et K<sub>2</sub>CrO<sub>3</sub> à 10 % (chrome de potassium)

### **II.5.1.4. Tanins**

#### **II.5.1.4.1. Principe**

En présence de Chlorure ferrique à 1% ; les extraits aqueux tanniques donnent des colorations bleu-vert, bleu-sombre et verte ou des précipités.

#### **II.5.1.4.2. Mode opératoire**

5 g de matériel végétal sont infusés dans 50 ml d'eau bouillante contenue dans un Erlen Meyer pendant 30 minutes. 2 ml de l'infusé sont prélevés et mis dans un tube à essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 1%. L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiques.

2 ml de l'infusé sont placés dans un tube à essai saturé en acétate de sodium avec quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub>. La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

### **II.5.1.5 Stéroïdes et terpenoïdes**

#### **II.5.1.5.1. Principe**



En présence de l'acide acétique anhydre et de l'acide sulfurique concentré (réactif de LIEBERMAN-BURCHARD), l'extrait organique étheré contenant les stéroïdes donne des colorations mauves et vertes

#### **II.5.1.5.2. Mode opératoire**

1g de matériel végétal est mis en macération pendant 24 heures dans l'éther de pétrole ou dans le benzène. Après filtration et introduction dans un Erlen Meyer de 100 ml, le solvant est évaporé au bain de sable. Le résidu est récupéré par 1 ml de chloroforme, 1 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Il se produit une coloration violette devenant progressivement verte. La coloration verte se stabilise au bout de 30 minutes et indique la présence des stéroïdes.

Par ailleurs, 2 ml de la solution acidifiée sont traités par quelques gouttes de réactif de HIRSCHSON. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des terpénoïdes

#### **II.5.1.6. Alcaloïdes**

##### **II.5.1.6.1. Principe**

La mise en évidence des alcaloïdes consiste à les précipiter à l'aide du réactif de MAYER.

##### **II.5.1.6.2. Mode opératoire**

Prendre 1 g de poudre de matière végétale sèche qu'on met à macérer dans 10 ml de méthanol à la température ambiante pendant 24 heures, puis à l'étuve à 50°C pendant 4 heures. La solution obtenue est filtrée, lavée avec des portions de méthanol chaud. Ensuite, on évapore à sec la solution obtenue à l'étuve à 50°C. Le résidu est recueilli deux fois par 2 ml de solution chaude d'acide chlorhydrique 1% et est filtré.

La solution acide obtenue est basifiée par l'ammoniaque concentrée dans une ampoule à décanter. On y ajoute 15 ml de Chloroforme qui sera évaporé à sec à l'air libre et le résidu obtenu, est repris par 0,5 ml de HCl 1% et agiter.

Ainsi, les alcaloïdes ayant été protonés sont supposés être passés en phases aqueuses. La phase aqueuse au-dessus est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur. Six gouttes sont déposées sur une lame porte-objet et précipitées à l'aide du réactif de MAYER pour la mise en évidence des alcaloïdes.

##### **II.5.1.7. Coumarines**

1 g de la poudre végétale est placé dans un tube à essai en présence de 2 ml d'eau distillée. Le tube est recouvert avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et porté dans un bain marie pendant quelques minutes. Puis on ajoute 0.5 ml de NH<sub>4</sub>OH dilué (10%) deux tâches



sur un papier filtre sont examinés sous la lumière ultraviolette à 254 nm. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

## II.5.2. Estimations quantitatives

### II.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique de Folin-Ciocalteu selon la méthode citée par (Wong *et al.*, 2006).

Les propriétés colorimétriques de réactif de Folin-Ciocalteu sont modifiées lorsqu'il est complexé à certaines molécules. Il réagit avec la fonction -OH des phénols (Catalano *et al.*, 1999). Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique  $H_3PMO_{12}O_4$  et d'acide phosphotungstique  $H_3PW_{12}O_{40}$  qui est réduit par l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène  $W_8O_{23}$  et de molybdène  $MO_8O_3$ , cette réaction se traduit par le développement d'une coloration bleue foncée.

De chaque extrait 200  $\mu$ l (dissous dans le méthanol) ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation, 800  $\mu$ l de la solution de carbonate de sodium  $Na_2CO_3$  (75 g/l) a été ajoutée. Le mélange est agité puis incubé pendant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre UV-Vis à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0-200) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg) (Wong *et al.*, 2006) (Annexe 2. Fig 8).

### II.5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) citée par (Djeridane *et al.*, 2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

Le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière visible à une longueur d'onde 430 nm.

1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$  (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes

d'incubation.

La quantification des flavonoïdes à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisé par un standard étalon la catéchine g/l (Annexe2. Fig 9)

### **II.6. Analyse statistique**

L'interprétation des données est réalisée après une analyse de variance, à l'aide du programme de statistique STATISTICA 10 La comparaison des moyennes a été faite par le test de Fisher et suivi par une comparaison des groupes homogènes selon le test de Newman & Keuls au seuil 5% à 1%o si le test est significatif.

# *Résultats et discussion*

## III.1. Résultats

### III.1.1. Analyse qualitative

#### III.1.1.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est la détection des composés chimiques par le test de solubilité des composants de la réaction de précipitation, l'observation visuelle de la turbidité et des changements de couleur spécifiques. Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal de *T. hirsuta* sont mentionnés dans le tableau 02.

Sur la base des résultats, les principaux métabolites secondaires de *T. hirsuta* ont été identifiés ; on note une moyenne présence des flavonoïdes et leuco-anthocyanes (coloration rouge) dans les trois parties végétales (feuilles, tiges, fleurs) avec une faible présence des leucoanthocyanes dans les tiges. Cependant les saponosides sont absents des feuilles et des fleurs, tandis que leur présence est forte dans les tiges (apparition d'une mousse persistante). Une présence totale et forte des stéroïdes (coloration mauve) est constatée dans les trois parties végétales alors qu'on note l'absence des quinones (pas de coloration rouge au violet) et des terpenoïdes (pas de coloration verte) dans toutes les parties végétales. La mise en évidence des tanins a permis de noter l'absence des tanins galliques, et une forte présence des tanins catéchiques (coloration blue-verte / bleu-sombre et verte ou précipités) dans les feuilles et les fleurs avec une moindre présence dans les tiges. Aussi on remarque que les alcaloïdes ne sont absents que des tiges (les précipités n'apparaissent pas) à l'opposé les coumarines ne sont présentes qu'au niveau des tiges avec apparition de taches fluorescentes.

**Tableau 02** .Mise en évidence des principaux principes actifs chez *T. hirsuta*.

Métabolites secondaires	Parties végétales		
	Feuilles	Tiges	Fleurs
Flavonoïdes	++	++	++
Leuco- anthocyanes	++	+	++
Saponosides	-	+++	-
Tannins catéchiques	+++	+	+++
Tanins galliques	-	-	-
Quinones	-	-	-
Stéroïdes	+++	+++	+++
Terpènoïdes	-	-	-
Alcaloïdes	+	-	+
Coumarines	-	+	-

### III.1. 2. Analyse quantitative

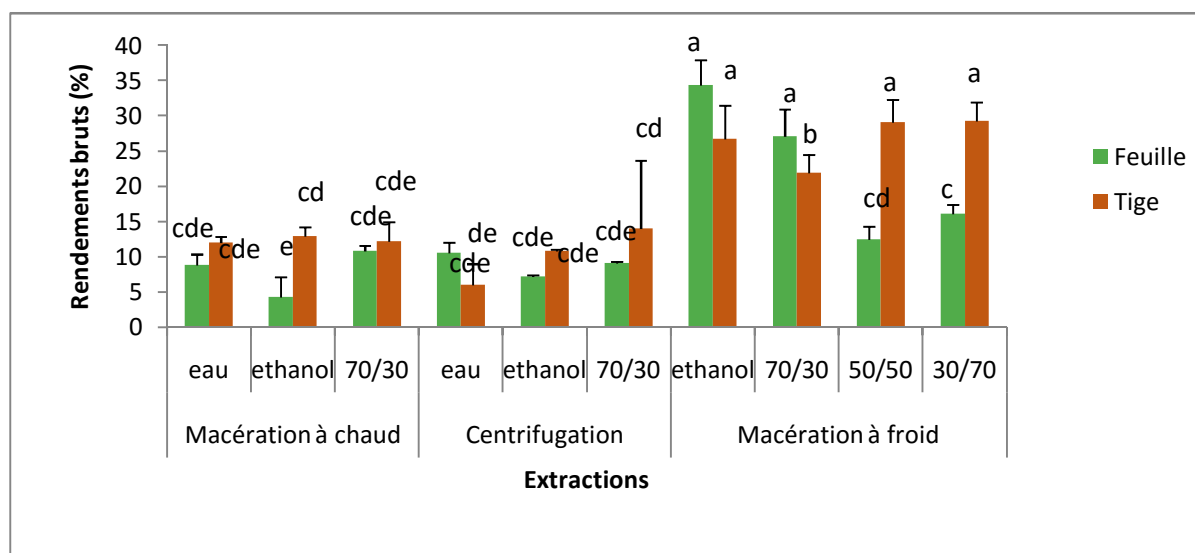
#### III.1. 2.1. Rendement d'extraction

L'extraction des polyphénols de *T. hirsuta* par les trois méthodes, macération à chaud et à froid, et centrifugation a permis de déterminer le rendement brut des feuilles et des tiges exprimés en pourcentage de matière sèche (% MS) sont illustrés par la figure 10 . L'extrait obtenu a une couleur verte ou brune selon le type de la partie étudiée, feuilles ou tiges (Annexe 01. Fig 6). Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que le rendement brut de *T. hirsuta* obtenu à partir de la méthode de macération à froid est le plus élevé en comparaison des deux autres méthodes dont les résultats ne sont pas très distants l'un de l'autre.

L'extraction par macération à froid a montré que la diminution de la quantité d'alcool (éthanol) dans le mélange d'extraction joue un rôle important dans le taux de l'extrait brut des feuilles à l'opposé des tiges avec un rendement alcoolique très élevé chez les feuilles. Dans l'ensemble les feuilles enregistrent de 34.37 à 12.5% et pour les tiges de 29.25 à 21.87 % d'extrait brut.

Pour les deux autres méthodes d'extraction, l'extrait alcoolique (éthanol) obtenu à partir de la tige par macération à chaud considéré comme le plus élevé avec un taux 12,93% par rapport aux autres extraits, d'autre part, l'extrait hydro alcoolique obtenu à partir de la tige par centrifugation est le plus élevé avec la valeur de 14,03%. Les tiges ne semblent pas montrés de différence en rapport des quantités diverses des liquides utilisés et des deux méthodes contrairement aux feuilles. L'analyse de la variance a montré des résultats très hautement significatifs jusqu'à 1‰ (Tab. 03) pour les méthodes d'extraction (macérations à chaud et à froid et centrifugation) ainsi que l'interaction extractions et parties végétales (feuille, tige).

Les résultats significatifs ont été comparés par le test de Student-Newman-keuls (SNK), qui a montré sept groupes homogènes distincts (Fig. 10).



**Figure 10.** Rendement brut des composés phénoliques obtenus à partir de *T. hirsuta* par trois Méthodes d'extraction (macération à chaud, centrifugation, macération à froid) à partir de trois extraits (alcoolique, hydro-alcoolique et hydrique) au niveau des feuilles et des tiges.

Lettres alphabétiques : groupes homogènes SNK à 5%.

**Tableau 03.** ANOVA des rendements bruts entre l'extraction et l'interaction extraction partie végétale de *T.hirsuta*

	SC	DDL	MC	F	P
<b>Extraction</b>	4014,58	9	446,06	50,491	***
<b>parties végétales</b>	20,72	1	20,72	2,345	ns
<b>Extraction*parties végétales</b>	970,37	9	107,82	12,204	***
<b>Erreur</b>	353,38	40	8,83		

\*\*\* : très hautement significatifs, ns : non significatif

### III.1. 2. 2. Quantification des composés phénoliques

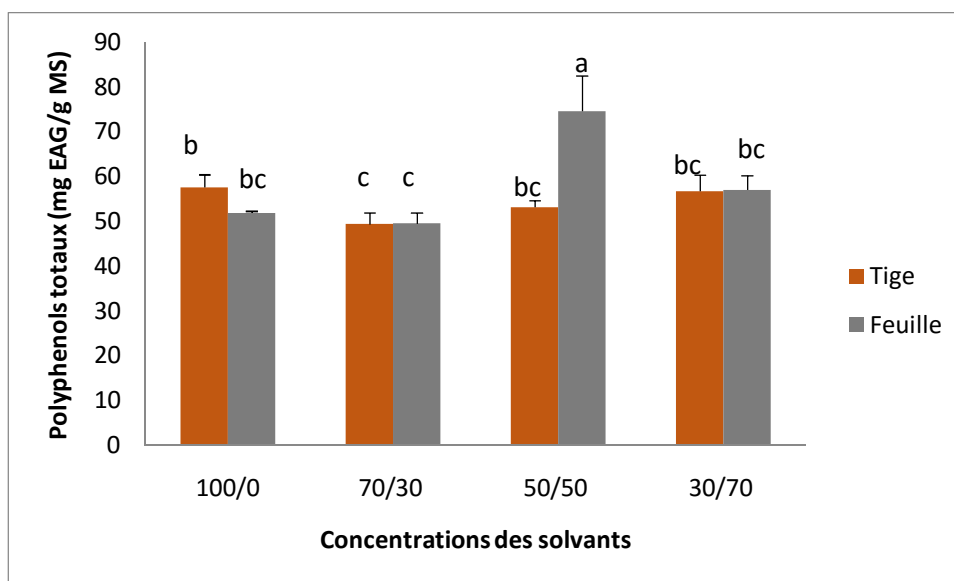
#### III.1.2.3. dosage des Polyphénols totaux

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0-200) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mg) (Annexe 02. Fig 8).

Selon les résultats obtenus le taux le plus élevé en polyphénols est obtenu par le solvant hydro- éthanolique (50/50) au niveau des feuilles (74,65 mg EAG / g MS). La plus basse valeur est de 49.41 mg EAG/ g MS par le solvant le solvant (70/30) des tiges (Fig .11). Dans l'ensemble le reste des valeurs sont très proches les unes des autres avec un maximum de différence de 6 mg EAG/ g MS.

L'analyse statistique est très hautement significative entre concentrations des solvants et parties végétales à 1‰ (Tab. 04).

Les comparaisons des groupes homogènes par le test SNK entre concentrations ont montré trois groupes distincts (Annexe 03. Tab 1 et 2), deux solvants sont regroupés ensemble. Les comparaisons entre l'interaction concentrations x parties végétales ont montré quatre groupes distincts, trois solvants sont regroupés ensemble (Fig. 11).



**Figure 11.** Teneurs en polyphénols totaux en fonction de concentration des solvants et des parties végétales.

Lettres alphabétiques : groupes homogènes SNK.

**Tableau 04.** ANOVA des polyphénols totaux de *T.hirsuta*.

	SC	DDL	MC	F	p
<b>Concentration (C)</b>	101068	3	33689	13,110	***
<b>parties végétales (PV)</b>	8267	1	8267	3,217	ns
<b>C x PV</b>	112763	3	37588	14,627	***
<b>Erreur</b>	102788	40	2570		

\*\*\* : très hautement significatifs, ns : non significatif

### III. 1.2.4. Flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et le taux des flavonoïdes a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage des catéchines (Annexe 02. Fig 9).

Les teneurs en flavonoïdes totaux obtenues montrent une variabilité de teneur entre les différents extraits, en fonction de la concentration en solvant et les parties végétales (Fig. 12).

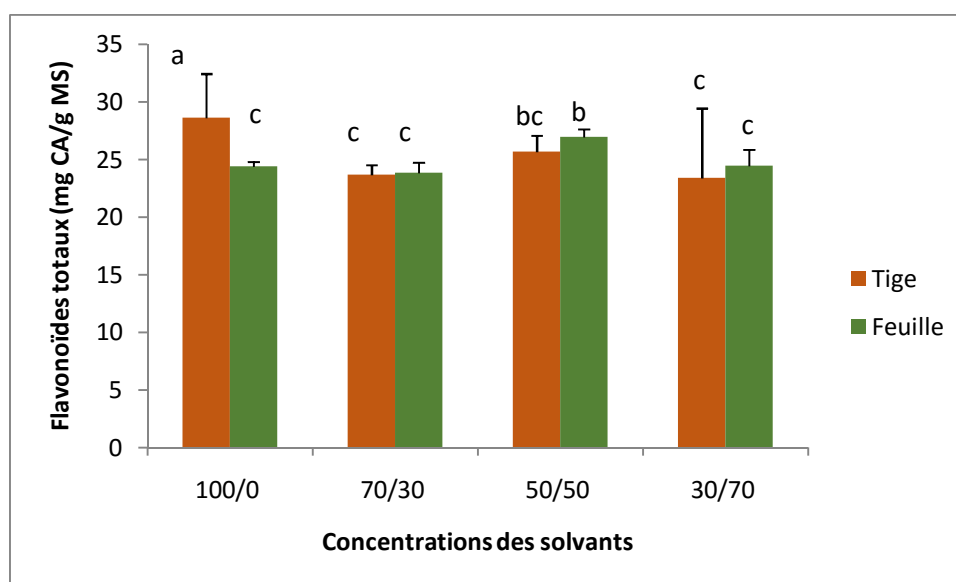
L'extrait par 100% d'éthanol correspond à la meilleure concentration en flavonoïdes avec 28,60 mg CA / g MS au niveau des tiges. Dans l'ensemble les différences sont minimales pour



un groupe. L'étude statistique montre des différences très hautement significatives pour l'ensemble du test à 1‰ (Tab .05).

Les comparaisons SNK indique que les teneurs en flavonoïdes des tiges d'extrait éthanolique sont classées dans le premier groupe (a), les teneurs en flavonoïde des feuilles d'extrait éthanol eau 50/50 sont dans le groupe (ab), puis les teneurs en flavonoïdes des tiges d'extrait éthanol eau 50/50 sont dans le troisième groupe (bc) et finalement les teneurs en flavonoïdes des feuilles et des tiges des différents autres extraits dans le dernier groupe (c).

(Annexe 03.Tab 3 et 4).



**Figure 12.** Teneurs en flavonoïdes totaux en fonction de concentration des solvants et des parties végétales.

Lettres alphabetiques : groupes homogènes SNK.

**Tableau 05.** ANOVA des flavonoïdes totaux de *T.hirsuta*.

	SC	DDL	MC	F	p
<b>Concentration (C)</b>	7921	3	2640	9,94	***
<b>parties végétales (PV)</b>	219	1	219	0,82	ns
<b>C x PV</b>	5999	3	2000	7,53	***
<b>Erreur</b>	10623	40	266		

\*\*\* : très hautement significatifs, ns : non significatif

## **III.2. Discussion générale**

### **III.2.1. Screening phytochimique**

Le criblage phytochimique de 10 principes actifs a permis de visualiser la présence de 7 composés chez *T. hirsuta*. Quatre métabolites secondaires sont présents dans les feuilles, les tiges et les fleurs dont les flavonoïdes, les leucoanthocyanates, les tanins catéchiqes et les stéroïdes. Les tanins galliques, les terpénoïdes et les quinones sont complètement absents des parties végétales du *T. hirsuta* : Les saponosides et les coumarines ne sont présents qu'au niveau des tiges par contre les alcaloïdes sont mis en évidence dans les feuilles et les tiges.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Kadi et *al.* (2017) pour *T. hirsuta* de Tunisie selon lesquels il y a présence des flavonoïdes, des tanins, des stéroïdes, des coumarines, des saponosides et des alcaloïdes mais contrairement à nous ils mettent en évidence la présence de quinones dans un mélange de feuilles et de tiges. En revanche, selon Nawel (2018) les tanins catéchiqes sont absents et les tanins galliques sont présents dans un mélange de feuilles et de fleurs ce qui est à l'opposé de nos résultats.

Ces différences résultent de la relation entre la quantité de polyphénols contenus dans la plante et les changements des conditions climatiques, la nature du sol, ainsi que la partie étudiée de la plante (Boizot et Charpentier, 2006). Ces arguments sont appuyés par Falleh et *al.* (2008) qui confirment l'effet des conditions climatiques difficiles des lieux où elles poussent (température élevée, forte exposition au soleil, sécheresse et salinité) qui stimulent la biosynthèse de métabolites secondaires tels que les polyphénols.

### **III.2.2. Le rendement brut**

Le rendement brut de l'extrait éthanolique obtenu à partir des feuilles par macération à chaud (4,26%) sont inférieurs à ceux d'Ilihoum et *al.* (2018) qui a trouvé un rendement élevé d'environ 7,8% (extrait méthanolique) pour les feuilles de *T. hirsuta* de la région d'Oued Nini de la wilaya d'Oum El Bouaghi , et de Kadi et *al.* (2017) qui a trouvé un rendement élevé d'environ 10% pour les feuilles de *T. hirsuta* de la région Arris wilaya de Batna. En revanche, notre rendement en extrait aqueux de 8,86% est supérieur à celui d'Ilihoum et *al.* (2018) qui est 4%. En résumé nos résultats sont à l'encontre de ceux de d'Ilihoum et *al.* (2018) qui montrent que le rendement obtenu par extraction au méthanol des feuilles est relativement supérieur à celui de l'extraction aqueuse.

Les résultats obtenus sont différents de ceux trouvés par certains auteurs qui ont travaillé sur d'autres plantes. En effet, le rendement de l'extrait alcoolique des feuilles de *T. hirsuta* 4,26% est bien inférieur à celui de *Searsia tripartita* (Ucria) Moffett (Anacardiaceae) (23,79% extraction éthanolique; 36,20 extraction méthanolique) et celui de *Limoniastrum guyonianum* Coss et Durieu ex Boiss.(Plumbaginaceae) (14,80% extrait éthanol, 21,5% extrait méthanol) (Hadjadj, 2017), mais les résultats de Gueriani et Boudraf (2018) obtenus lors de l'extraction aqueuse de *Daphne gnidium* L. (Thymelaceae) collectés dans la région de Bouira (8%), sont proches de nos résultats 8,86%.

En comparaison, on observe que grâce au méthanol, l'efficacité d'extraction des composés phénoliques a été améliorée, ce qui s'explique par le simple fait que cet alcool (polarité 6.6) est plus polaire que l'éthanol (polarisation 5.2). C'est pourquoi, il est connu par sa plus grande efficacité pour extraire des quantités maximales de composants d'intérêt (Bourgou et *al.*, 2016).

De nombreuses études ont montré et prouvé l'importance des solvants dans l'extraction des composés phénoliques. Chaque solvant est capable d'extraire des composés phytochimiques qui ne peuvent probablement être obtenus qu'avec son utilisation, et aussi parce que l'activité pharmacologique de l'extrait de la plante médicinale dépend du solvant d'extraction (Dos Santos et *al.*, 1991). Selon les recherches de Do et *al.* (2014), la technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés phytochimiques existants dans les matières végétales. Traditionnellement, les solvants d'extraction les plus utilisés sont en particulier l'eau et l'alcool éthylique (Dos Santos et *al.*, 1991).

L'eau est un solvant qui extrait préférentiellement des composés polaires tels que les flavonoïdes (Jones et Kinghon, 2006). Les tanins et les terpénoïdes peuvent également être extraits à l'eau mais à chaud (King et Bott, 2012), c'est pour cette raison que l'eau a été chauffée à 80 ° C avant l'ajout du matériel végétal lors de l'extraction aqueuse.

L'éthanol est un solvant polaire et est miscible avec de l'eau (King et Bott, 2012) permet l'extraction de substances phytochimiques polaires telles que les lectines, les alcaloïdes, les acidoïdes, les flavones, les polyphénols, les tanins, les saponines, et est également capable de séparer les microparticules des macromolécules (protéines et glucides) (Ahmad et *al.*, 2006).

Des travaux ultérieurs de Perva-Uzunalic et *al.* (2006) et Do et *al.* (2014) confirment que l'utilisation combinée de l'eau et du solvant organique peut faciliter l'extraction des substances

chimiques qui sont solubles dans l'eau et / ou dans le solvant organique. Selon Mohammedi et Atik (2011) l'addition de 30% d'eau distillée aux solvants purs augmente leur pouvoir extractant. La présence de l'eau, ayant un moment dipolaire plus fort que celui des alcools, déstabilise les parois cellulaires. Par conséquent, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande du soluté, favorisant ainsi l'extraction (Penchev et *al.*, 2010).

Les travaux de Su et *al.* (2006) et Naczki et Shahidi (2006) montrent que la récupération des polyphénols et autres composés antioxydants de la matière végétale dépend largement de la solubilité de ces composés dans un solvant donné, de la polarité et de la viscosité du solvant notamment le pH (Djouahra, 2012) En plus de la taille des particules, la présence de substances interférentes (Stalikas, 2007) le type de solvant, la température, le temps d'extraction et rapport de mélange (Hayat et *al.*, 2009).

### **III.2.3. Les polyphénols**

Selon les résultats obtenus durant cette étude, la plante *T. hirsuta* a une teneur plus élevée en polyphénols (74.65 mg EAG/g MS) en solvant hydro-éthanolique (50/50) (éthanol/eau), des feuilles avec une teneur moins importante que la première (proche de 57 mg EAG/g MS) dans un solvant éthanolique, bien qu'il y ait une augmentation moyenne des polyphénols dans les solvants suivants: solvant éthanolique des feuilles, solvants hydro-éthanoliques (30/70) des feuilles et tiges, (50/50) des tiges avec une très faible teneur polyphénols le solvant (70/30) des feuilles et des tiges.

Nos résultats concordent avec ceux de Bouzouina et *al.* (2016) pour *T. hirsuta* de l'ouest algérien, la valeur de polyphénols la plus élevée a été extraite des feuilles d'extrait hydro-éthanolique (74,65 mg EAG/g MS), notre résultat est nettement supérieur à celui de Bouzouina et *al.*, (2016) qui est égale à  $19.83 \pm 0.42$  mg EAG/ g MS) d'extrait hydro-méthanolique des feuilles. Les résultats d'Ilihoum et *al.*, (2018) indiquent que la quantité en polyphénols totaux d'extraits méthanoliques des feuilles de *T. hirsuta* (68,176 ug EAG/g MS) est proche des d'extraits aqueux (70,2115 ug EAG/ mg MS), sont en similitude avec nos résultats. La quantité des polyphénols dans le solvant éthanolique des feuilles (51,85 mg EAG/g MS) est quasiment similaire à celle du solvant hydro-éthanolique (30/70 volume d'eau est supérieur à celle de l'éthanol) des feuilles (57,02 mg EAG/ mg MS), ces deux solvants appartiennent à la même catégorie.

#### **III.2.4. Teneurs en flavonoïdes totaux**

Nos résultats indiquent que la teneur en flavonoïdes dans les feuilles de l'extrait éthanolique (24,378401 mg CA / g MS) est légèrement supérieure à la teneur en flavonoïdes foliaires dans l'extrait méthanolique d'Ilihoum et *al.*, (2018) (20,588 µg EQ / mg).

Selon Amari, (2015) la teneur en flavonoïdes des feuilles de *T. hirsuta*, déterminée à partir de l'extrait aqueux, est égale à (3,15 ± 0,15 mg EQ / g). La teneur en feuilles est bien inférieure à celle mentionnée par Trigui et *al.* (2013) soit environ 29,3 mg / g. Cependant, elle est 8 fois plus élevée (0,40 mg / g) que celle donnée par Mohammedi et Atik (2011). Cela peut être lié au climat de la région ou à la méthode utilisée qui ne donne pas la composition quantitative complète des extraits (Wu et *al.*, 2005).

Le résultat de l'extrait aqueux de Trigui et *al.* (2013) est presque proche de notre résultat concernant la quantité totale de flavonoïdes foliaires déterminée à partir de l'extrait hydro éthanolique 50/50 (26.96 mg Ca/ g MS).

# *Conclusion*

## **Conclusion**

L'utilisation traditionnelle de plantes médicinales en suspension aqueuse pour la résistance locale aux maladies est connue. L'importance du développement moderne de ces plantes réside dans la possibilité d'obtenir des principes actifs transformables en médicaments à partir de leurs extraits.

Dans ce travail, nous avons tenté de mettre en évidence les principaux principes actifs contenu dans les parties végétales de *T. hirsuta* par un criblage phytochimique ; ce dernier indique que *T. hirsuta* se compose de principes actifs majoritairement abondants dans les feuilles et les fleurs tels que les alcaloïdes et les tanins catéchiques, par contre les saponosides et les coumarines sont contenus seulement au niveau des tiges. La comparaison quantitative des rendements bruts obtenus des parties végétales, des méthodes et des solvants d'extraction a pour objectif de cerner la meilleur méthode et solvant d'extraction et la partie végétale la plus riche de la plantes en principes actifs.

Cette investigation a suggéré que la méthode la plus susceptible d'extraire parfaitement les principaux composants, est la macération à froid par le solvant éthanolique au niveau des feuilles. Le dosage des métabolites secondaires des extraits de *T. hirsuta* a révélé que l'extrait hydro-éthanolique au niveau des feuilles est plus riche en polyphénols totaux par rapport à l'extrait éhanolique, alors que ce dernier est plus riche en flavonoïdes au niveau des tiges.

D'autres recherches plus approfondies, et plus complètes seront nécessaires pour clarifier les propriétés chimiques et les mécanismes d'action des principes actifs extrait par les différents solvants et méthodes d'extraction.

## *Références bibliographiques*



- ✓ Abdel-Hameed, E. S. S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food chemistry*, 114(4), 1271-1277.
- ✓ Ahmad, I., Aqil, F., & Owais, M. (Eds.). (2006). *Modern phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs*. John Wiley & Sons, 404 p.
- ✓ Akrouf, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., & Madrid, P. C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49(2), 342-347.
- ✓ Amari, N. O., Bouzouina, M., Berkani, A., & Lotmani, B. (2014). Phytochemical screening and antioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsuta* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(2), 104-109.
- ✓ Atoui, AK, Mansouri, A., Boskou, G., et Kefalas, P. (2005). Infusions de thé et d'herbes: leur activité antioxydante et leur profil phénolique. *Chimie alimentaire*, 89 (1), 27-36.
- ✓ Baba Aissa, F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident", *Librairie Moderne Rouiba, EDAS, Alger*, 178 p.
- ✓ Beniston, W. S. (1984). *Fleurs d'Algérie*, édition entreprise nationale de livre, 359 p.
- ✓ Berthod, A., Billardello, B., & Geoffroy, S. (1999). Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analisis*, 27(9), 750-757.
- ✓ Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA*, In: Numéro spécial, 79-82.
- ✓ Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R. (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
- ✓ Bouzouina, M., Amari, N. O., Berkani, A., Lotmani, B., Hanafi, M., & Lazizi, A. (2016). Total phenolics contents, flavonoïds contents, and fatty acids compositions in *T. hirsuta* L. Aerial Parts, Grown in Western Algeria: pp 18.
- ✓ Brooks, G., Evans, A. T., Aitken, A., Evans, F. J., Rizk, A. F. M., Hammouda, F. M., & Ismail, S. E. (1990). Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 29(7), 2235-2237.
- ✓ Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. English, 463 p.

- ✓ Catalano, L., Franco, I., Nobili, M. D., & Leita, L. (1999). Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents. A comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica (Italy)*: 193-205.
- ✓ Cornara, L., Borghesi, B. A. R. B. A. R. A., Caporali, E., Casazza, G., Roccotiello, E., Troiano, G., & Minuto, L. (2005). Floral features and reproductive ecology in *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. *Plant systematics and evolution*, 250(3-4), 157-172.
- ✓ Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- ✓ Cronquist, A., & Takhtadziān, A. L. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, 1262 p.
- ✓ Dasgupta, A. (2011). Interferences of herbal remedies with immunoassays for therapeutic drugs: focus on digoxin. Herbal Supplements. Efficacy, Toxicity, Interactions with Western Drugs and Effects on Clinical Laboratory Tests. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 407-423.
- ✓ Dehimi, K. (2018). Study of biological activities of extracts from *Thymelaea microphylla* Coss. and Dur (Doctoral dissertation). Pp 11.
- ✓ Diallo, D. (2000). Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius* (Aizoaceae), *Diospyros abyssinica* (Ebenaceae), *Entada africana* (Mimosaceae), *Trichilia emetica* (Meliaceae) (Doctoral dissertation, Univ. Lausanne, Faculté des sciences), 221 p.
- ✓ Djenidi, H. (2020). *Activité antioxydante et antiradicalaire des aliments d'origine végétale consommés dans les régions de Biskra et Setif* (Doctoral dissertation) : 34-48.
- ✓ Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- ✓ Djouahra, D. (2012). Alcaloïdes et polyphénols d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forssk): Effet antimicrobien et antioxydant (Doctoral dissertation, univ-bouira. dz; université bouira; univ bouira), 110 p.
- ✓ Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
- ✓ Dobignard, A. and C. et Chatelain (2013). Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord (4 vol.), Genève, C.J.B.G, 436p.
- ✓ Dommée, B., Biascamano, A., Denelle, N., Bompar, J. L., & Thompson, J. D. (1995). Sexual tetramorphism in *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae): morph ratios in open-pollinated progeny. *American Journal of Botany*, 82(6), 734-740.

- ✓ Dongmo, R. C. M. (2009). Evaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'*Acalypha manniana* (Euphorbiaceae) et *Tristemma hirtusa* (Melatomataceae) Mémoire de Master en Biochimie clinique et Pharmacologie. *Université Dschang, Cameroun*, 75, 73 p.
- ✓ Dos Santos, J. R., Fleurentin, J., Cabalion, P., Mazars, G., & Younos, C. (1991). Ethnopharmacologie. Sources, Méthodes, Objectifs. Ed : de l'ORSTOM—Société Française d'Ethnopharmacologie : 26–40.
- ✓ El Amrani, F., Rhallab, A., Alaoui, T., El Badaoui, K., & Chakir, S. (2009). Hypoglycaemic effect of *Thymelaea hirsuta* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plants Res*, 3, 625-629.
- ✓ El-Beheiry, M. (2000). Evaluation of the organic composition of *Thymelaea hirsuta* populations in Egypt. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ*, 29(1), 375-383.
- ✓ Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- ✓ GUERIANI, R., & BOUDRAF, O. (2018). Etude phytochimique et effets antifongique de *Daphne gnidium* L (Doctoral dissertation, Université de Bouira) :P p 34.
- ✓ HADJADI, S., & OULD, E. (2017). Analyses phytochimiques et activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales du Sahara septentrional Est Algérien (Doctoral dissertation), 53p.
- ✓ Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
- ✓ Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S. & Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63-70
- ✓ Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- ✓ <https://www.aquaportail.com/definition-537-alcaloide.html>
- ✓ Ilihoum, R., Boukalmouna, I., & Karouche, S. (2018). Comparaison des activités biologiques des feuilles et racines de *T. hirsuta* : 46-54.
- ✓ Jeanmonod, D., & Gamisans, J. (2007). *Flora corsica*. Ed : Su, 644p.
- ✓ Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2006). Extraction of plant secondary metabolites. In 'Natural products isolation'. 2nd edn. (Eds SD Sarker, Z Latif, AI Gray) pp. 323–351

- ✓ Kawano, M., Matsuyama, K., Miyamae, Y., Shinmoto, H., Kchouk, M. E., Morio, T. & Isoda, H. (2007). Antimelanogenesis effect of Tunisian herb *Thymelaea hirsuta* extract on B16 murine melanoma cells. *Experimental dermatology*, 16(12), 977-984.
- ✓ Kadi, K., Hamli, S., Zeraib, A., & Yahia, A.(2017). Effet antibactérien des extraits de *T. hirsuta* L. Revue des Régions Arides n°43 (3/2017) – Numéro spécial – Actes du 5ème Meeting International sur l'Aridoculture et les Cultures Oasiennes : Biotechnologie végétale en zones arides et oasiennes Zarzis (Tunisie), 19-21 décembre 2016
- ✓ Kerkoub, H. (2018). Valorisation de certaines plantes sauvages: *Thymelaea hirsuta* Endl.(Metnane) et *Haloxylon scoparium* Pomel.(Remt). Bio-activité et Caractérisation des Composés Phénoliques. (Doctoral dissertation, Université Mustapha Stambouli de Mascara ), 62p.
- ✓ King, M. B., & Bott, T. R. (2012). Extraction of natural products using near-critical solvents. Springer Science & Business Media, 325 p.
- ✓ Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS) : 21-26.
- ✓ Luhata, P., Kalonda, E., Kanangila, A. B., Kitawa, E. K., Mulungulungu, D. & Lumbu, J. B, (2008). Étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea*. Université de Lubumbashi. Mémoire en ligne. Pp 5.
- ✓ Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, 185p.
- ✓ Menasria, L. (2013). Etude des teneurs en alcaloïdes d'une plante médicinale «*Matricaria pubescens*» et la détermination de leurs activités antibactériennes.
- ✓ Minuto, L., Casazza, G., & Profumo, P. (2005). Sexual polymorphism and spatial segregation of *Thymelaea hirsuta* in Liguria (north-west Italy). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 139(2), 234-240.
- ✓ Mohammedi, Z., & Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst : 609-615.
- ✓ OMS (Organisation Mondiale de la Santé). (2013). *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023*. Organisation mondiale de la Santé, 72p.

- ✓ Naczki, M. et Shahidi, F. (2006). Phénoliques dans les céréales, les fruits et les légumes: occurrence, extraction et analyse. *Journal d'analyse pharmaceutique et biomédicale*, 41 (5), 1523-1542.
- ✓ Nawel, D. R. A. M. C. H. I. A. (2018). Activité antimicrobienne de l'huile essentielle et extraits brutes de *Thymelaea Hirsuta* (Doctoral dissertation) :P p 44.
- ✓ Nawwar, M. A., Ishak, M. S., El-Sherbieny, A. E. A., & Meshaal, S. A. (1977). Flavonoids of *Reaumuria mucronata* and *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 132p.
- ✓ Palomo Contreras, N. (2010). La gestion des plantes médicinales chez les communautés autochtones Nahuas de la Huasteca Potosina, Mexique , Mémoire présenté à la faculté des arts et des sciences en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Géographie, Université de Montréal, Canada, 294p.
- ✓ Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- ✓ Penchev, P. I. (2010). *Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions* (Doctoral dissertation), 138p.
- ✓ Pengelly, A. (2004). The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine, 2ème Ed, 161p.
- ✓ Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food chemistry*, 96(4), 597-605.
- ✓ Quezel, P. & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS, Paris.566p
- ✓ Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008). *Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne* (Vol. 3). Forêt privée française,241p.
- ✓ Rizk, A. M., AM, R., FM, H., & SI, I. (1975). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. III. Coumarins. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung*, 85(1) : 107-115.
- ✓ Schippmann, U., Leaman, D. J., & Cunningham, A. B. (2002). Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. *Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries*: 1-21.
- ✓ Shaltout, K. H. (1987). Pattern, phenology and sex ratio of Egyptian *Thymelaea hirsuta* populations. *Vegetatio*, 67-73.
- ✓ Shaltout, K. H. (1992). Nutrient status of *Thymelaea hirsuta* (L.) Endl. in Egypt. *Journal of arid environments*, 23(4), 423-432.

- ✓ Shaltout, K. H., & El-Keblawy, A. A. (1992). Sex expression in Egyptian *Thymelaea hirsuta* (Thymelaeaceae) populations. *Plant systematics and evolution*, 181(3-4), 133-141.
- ✓ Shaltout, K. H., & El-Shourbagy, M. N. (1989). Germination Requirements and Seedling Growth. *Flora*, 183, 429-436.
- ✓ Somon, E. (1987). Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie. Ed: O.P.U.Alger,586p.
- ✓ Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295
- ✓ Su, X., Duan, J., Jiang, Y., Shi, J., & Kakuda, Y. (2006). Effects of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(4), 348-353
- ✓ Tackholm, Y. (1974) in *Students Flora of Egypt*, 2nd Ed,Cairo University Press, Beirut, 360p.
- ✓ Trigui, M., Hsouna, A. B., Tounsi, S., & Jaoua, S. (2013). Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41, 150-157.
- ✓ Upson, T. M., Grayer, R. J., Greenham, J. R., Williams, C. A., Al-Ghamdi, F., & Chen, F. H. (2000). Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(10), 991-1007.
- ✓ Veste, M., Sartorius, U., & Breckle, S. W. (2008). Ion relations of plants and soil patterns. In *Arid Dune Ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg :353-365.
- ✓ Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1992). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval.
- ✓ Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry*, 99(4), 775-783.
- ✓ Wu, J. H., Tung, Y. T., Wang, S. Y., Shyur, L. F., Kuo, Y. H., & Chang, S. T. (2005). Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 5917-5921.
- ✓ Yahyaoui, M., Bouajila, J., Cazaux, S., & Abderrabba, M. (2018). The impact of regional locality on chemical composition, anti-oxidant and biological activities of *Thymelaea hirsuta* L. extracts. *Phytomedicine*, 41, 13-23.
- ✓ Zerargui, F. (2018). Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives (Doctoral dissertation) ;P p 21.

## Références bibliographiques

---

- ✓ Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., & Benjelloun, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 58(1), 45-54.

# *Annexes*



Annexe 1. Etapes d'extraction

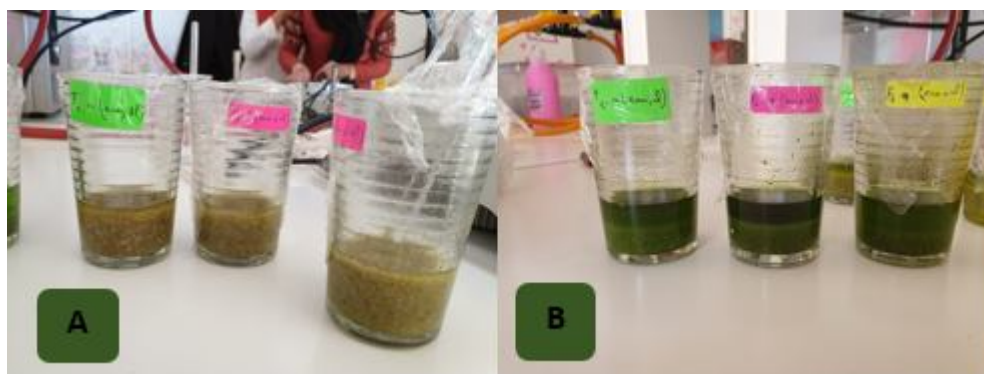


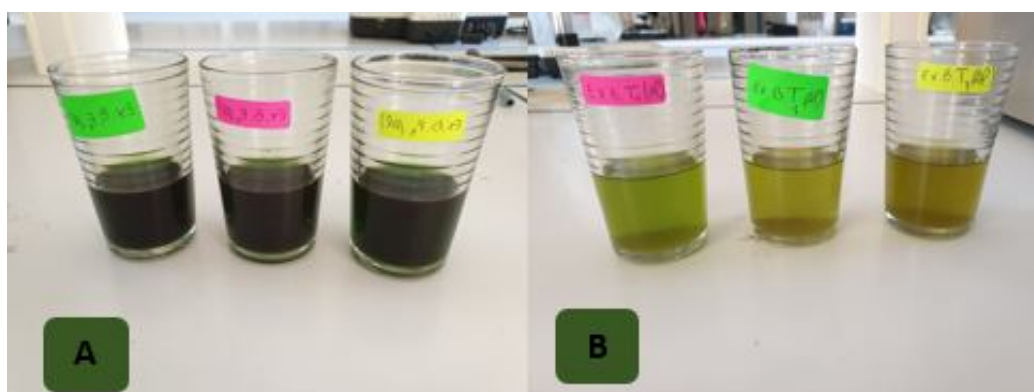
Figure 01. Macéras A. tige, B. feuille



Figure 02. Filtration

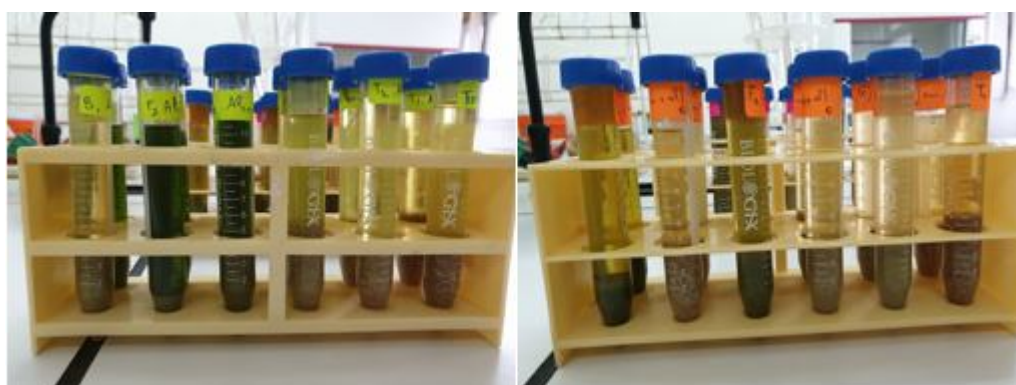


Figure 03. Résidus des feuilles et des tiges après filtration.

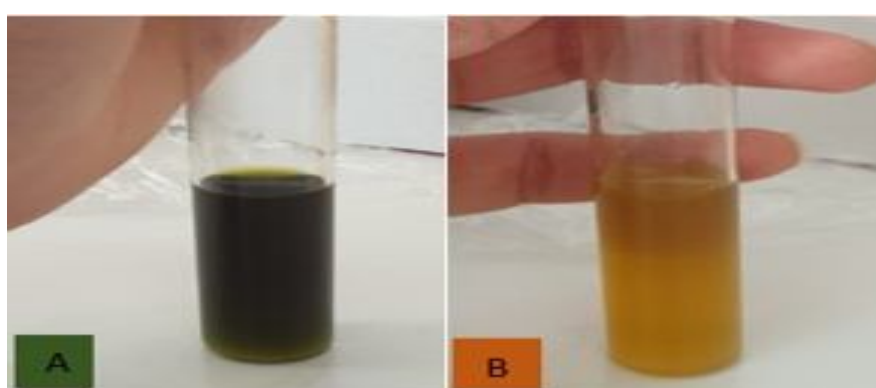


**Figure 04.** Extraits bruts éthanoliques (mélange du premier et deuxième macéras)

A. feuille, B. tige



**Figure 05.** Extraits obtenus par la centrifugation



**Figure 06.** Extrait hydro-ethanolique par macération à chaud de : **A** : feuille, **B**: tige de *T.hirsuta*



Figure 07. Evaporation

## Annexe 2. Courbes d'étalonnage

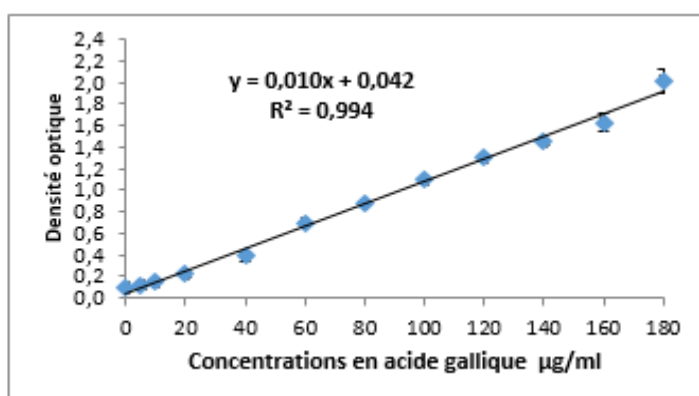


Figure 08. Courbe d'étalonnages de l'acide gallique

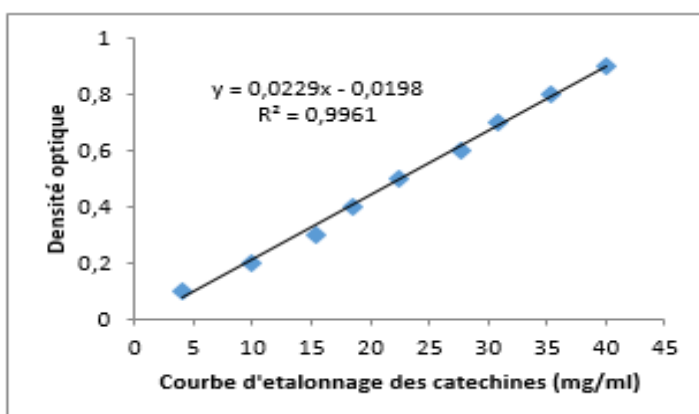


Figure 09. Courbe d'étalonnage des catéchines

**Annexe 3.** Comparaison des groupes homogènes par le test de Newman and Keuls.

**Tableau 1.** Entre concentrations (polyphénols)

Concentration	1	2	3
70/30	c		
100/0		b	
30/70		b	
50/50			a

**Tableau 2.** Entre l'interaction concentrations x parties végétales (polyphénols)

	concentration	parties végétales	1	2	3
3	70/30	Tige	c		
4	70/30	Feuille	c		
2	100/0	Feuille	c	b	
5	50/50	Tige	c	b	
7	30/70	Tige	c	b	
8	30/70	Feuille	c	b	
1	100/0	Tige		b	
6	50/50	Feuille			a

**Tableau 3.** Entre concentrations (flavonoïdes)

concentration	1	2
70/30	b	
30/70	b	
50/50		A
100/0		A

**Tableau 4.** Entre l'interaction concentrations x parties végétales (flavonoïdes)

<b>concentration</b>	<b>parties végétales</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
30/70	Tige	c		
70/30	Tige	c		
70/30	Feuille	c		
100/0	Feuille	c		
30/70	Feuille	c		
50/50	Tige	c	b	
50/50	Feuille		b	a
100/0	Tige			a

# *Perspectives futures*

Quelques-uns des sujets proposés par les membres de jury au cas où nous continuerions la formation doctorale, si Dieu le veut :

- Etude comparative de rendements des composés phénoliques de la plante *T.hirsuta* extraite pendant les quatre saisons, pour savoir la saison au quelle l'extraction des substances bioactives est optimale.
- Comparaisons des composés phénoliques extraits par différentes méthodes opératoires des quelques plantes médicinales, pour trouver les méthodes d'extraction les plus efficaces pour chaque plante.
- L'influence de facteur thermique in vitro sur l'efficacité de l'extraction des rendements phénoliques.