

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

**Université Mentouri Constantine**  
**Faculté des sciences de la nature et de la vie**  
**Département de biologie et écologie**

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister  
(Ecole doctorale)

Option : Biotechnologie végétale

***Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique  
de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en  
évidence de leurs activités biologiques.***

**Présenté par : Madi Aicha**

**Devant le jury:**

<b>M. BENLARIBI M.</b>	<b>Président</b>	<b>Prof Univ. Constantine</b>
<b>M. MERGHEM R.</b>	<b>Promoteur</b>	<b>Prof Univ. Constantine</b>
<b>M. BENGUEDOUAR A.</b>	<b>Examineur</b>	<b>Prof Univ. Constantine</b>
<b>M. KHELIFI D.</b>	<b>Examineur</b>	<b>Prof Univ. Constantine</b>

***Année universitaire : 2009 - 2010***

## Remerciements

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon directeur de mémoire **M. Merghem R.** (professeur à l'Université de Constantine), qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissances les plus sincères pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils.

Je tiens à remercier **M. Benlaribi M.** (professeur à l'université de Constantine) d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

J'exprime ma profonde gratitude, et mes expressions de reconnaissance à **M. Benguedouar A.** (professeur à l'université de Constantine) pour son aide et ses conseils précieux le long de mon parcours universitaire.

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à **M. Khelifi D.** (professeur à l'université de Constantine), d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon travail.

## Dédicace

Je dédie ce modeste travail, à mes très chers parents surtout  
ma mère.

À mes sœurs Zahra, Meriem, et surtout Samsouma.

À mes frères Mèd Aminè, et Mèd Charif

À ma cousine Ghania.

À toute ma famille.

À mes très chères amies Asma, Fairouz, Sofia T, Sofia Z, et  
Wahiba.

À mes collègues.

À toute personne qui me connais.

## SOMMAIRE :

Introduction :	1
----------------	---

## Chapitre 1 : revues bibliographiques

I- Description des plantes :	4
------------------------------	---

1- Les plantes médicinales :	4
2- Description des plantes étudiées :	5
2.1- Le Thym :	5
A- <i>Thymus serpyllum</i> (serpolet) :	5
A-1 Description morphologique :	5
A-2 Classification taxonomique :	6
B- <i>Thymus algeriensis</i> :	6
B-1 Description morphologique :	6
B-2 Classification taxonomique:	7
C- Usage traditionnel du Thym :	7
2.2- La Sauge ( <i>Salvia officinalis</i> ).....	8
A- Description morphologique:	8
B- Classification taxonomique :	9
C- Usage traditionnel de la sauge :	9
3- Les composés phénoliques rapportés :	10
A- La sauge :	10
B- Le Thym:.....	11

II- structure et biosynthèse des composés phénoliques.....	12
--	----

1- Biosynthèse des composés phénoliques :	12
a- voie de l'acide shikimique :	12
b- la voie d'acétate malonate: .....	13
2- Biosynthèse des flavonoïdes :	14
3- Structure et catégories des composés phénoliques :	16
3-1 Les acides phénoliques :	17
A- les hydroxybenzoïques :	17
B- les hydroxycinnamiques :	17
3-2- Les flavonoïdes :.....	17
3-3 Les tannins :	18

III- rôle et propriétés biologiques des composés phénoliques: .....	20
---	----

1- Rôle physiologiques des polyphénols dans la plante :	20
1.1- la lutte contre les agents pathogènes :	20
1.2- L'astringence et le goût:.....	21
1.3- la couleur de la plante :.....	21
1.4- l'attraction et la pollinisation :	22
1.5- attribution à la croissance de la plante :.....	22
1.6- Composés phénoliques et symbiose :	23
2- Les propriétés biologiques des polyphénols :	24

2.1– propriété antioxydante :.....	24
A- Radicaux libres :.....	24
B- Stresse oxydatif :.....	25
C- Les ROS (reactive oxygen species):.....	25
D- Système de production des ROS :.....	26
E- Les défenses enzymatiques contre les ROS :.....	27
F- Les défenses non enzymatiques contre les ROS :.....	30
G- Mécanisme d’action des flavonoïdes contre les ROS :.....	31
2.2- Activité antibactérienne :.....	33
2.3- Autres propriétés biologiques des polyphénols :.....	35
A- Propriété anti-inflammatoire :.....	35
B- propriétés préventives des maladies cardio-vasculaires :.....	35
C- propriétés anticancérogènes :.....	36
D- Propriétés préventives des flavonoïdes sur les neurones :.....	36
E- Propriétés des flavonoïdes vis-à-vis des allergies :.....	36
<b>IV- Les polyphénols et la biotechnologie : .....</b>	<b>37</b>

## **Chapitre 2: Matériel et Méthodes**

1– Matériel végétal :.....	41
1.1- La récolte du matériel végétal :.....	41
1.2- La conservation des plantes :.....	41
1.3- Parties utilisées : feuilles et fleurs pour les deux plantes. ....	41
2– Méthodes :.....	41
2.1- Extraction :.....	41
2-2 dosage :.....	43
2.2-1 Dosage des phénols totaux :.....	43
2.2.2 Dosage des flavonoïdes :.....	44
2.3- chromatographie analytique sur couche mince :.....	44
2.3-1 Principe :.....	44
2.3.2 Protocole de CCM sur gel de polyamide :.....	45
2.3.3 Calcul du Rapport frontal :.....	45
2.4- Chromatographie sur colonne :.....	45
2.4.1 Principe :.....	45
2.4.2 Protocole :.....	45
2.5- La chromatographie sur papier wathman :.....	46
2.5-1 Principe :.....	46
2.5-2 Protocole :.....	47
2.6- Analyse spectrophotométrique UV-visible :.....	47
2.6.1- Principe :.....	47
2.6.2- Protocole de la série spectrale :.....	47
2.7- Tests biologiques:.....	50
2.7.1- Test d’activité antioxydante (DPPH):.....	50
2.7.2 Test d’activité antibactérienne :.....	51

## **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

1- Dosage :.....	54
1-1 dosage des phénols totaux :.....	54

1-2- dosage des flavonoïdes :.....	56
2- Diagnostique par CCM analytique : .....	57
3- Résultats de séparation par colonne ouverte :.....	61
4- Résultats de séparation par papier wathman :.....	63
5- Identification des composés isolés à partir des plantes : .....	65
5-1- <i>Thymus algeriensis</i> :.....	66
Interprétation des données spectrales F2A:.....	67
5-2 <i>Thymus serpyllum</i> :.....	73
5-3 <i>Salvia officinalis</i> : .....	78
5-4 Discussion générale :.....	81
6- Evaluation de l'activité antioxydante (test du DPPH) : .....	82
6-1 L'activité antioxydante de <i>Thymus algeriensis</i> :.....	82
6-2 L'activité antioxydante de <i>Thymus serpyllum</i> :.....	84
6-3 L'activité antioxydante de <i>Salvia officinalis</i> : .....	85
6-4 Discussion générale des résultats : .....	87
7- Résultats de l'activité antibactérienne :.....	88
7-1 Effet antibactérien des témoins :.....	88
7-2 Effet antibactérien des produits naturels extraits : .....	91
A- <i>Thymus algeriensis</i> :.....	91
B- <i>Thymus serpyllum</i> : .....	93
C- <i>Salvia officinalis</i> :.....	95
<b>Conclusion générale et perspectives :.....</b>	<b>97</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>100</b>

## Introduction :

La plante est un organisme vivant qui existe depuis l'antiquité. Elle constitue un maillon très important et fondamental dans le cycle biologique de vie des autres organismes vivants tel que les animaux aussi bien les êtres humains.

L'ensemble de ses organes forme une usine productrice immense, des milliers de substances qui sont différentes sur le plan structural ainsi biologique.

Cette usine utilise le  $\text{CO}_2$  dégagé dans l'atmosphère et l' $\text{H}_2\text{O}$  comme matières premières par le biais de la photosynthèse pour produire la première matière organique qui est  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ . Toutes les catégories de molécules sont synthétisées par la suite, chacune selon sa voie de biosynthèse.

Dans ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressaient aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel (Bérubé 2006). Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime environ 80% des habitants de la planète ont recours aux médecines traditionnelles à base de plante en tant que soins de santé primaire (Bérubé 2006).

Par conséquent les industries pharmaceutiques s'intéressent de plus en plus à la diversité des molécules biologiques des végétaux dans le but d'avoir de nouveaux composés pourvus de propriétés inédites.

La phytochimie est une étude basée sur les plantes, qui se situe à l'interface de nombreuses sciences appliquées comme la pharmacie, la chimie, la biologie, et la médecine. Elle date depuis longtemps et reste toujours un sujet d'actualité malgré les développements exponentiels des différents domaines tel que la biotechnologie et la chimie qui s'intéressent surtout à la production de nouvelles molécules dites synthétiques.

Seule une petite partie de 400000 espèces végétales connues était exploitée sur le plan phytochimique et pharmacologique (Waridel 2003), et une espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents et d'intérêts variés.

Vu cette richesse du monde végétal, notre travail s'intéresse au deux plantes médicinales; en se basant sur deux axes principaux le premier c'est identification structurale et le deuxième c'est l'étude des activités biologiques liées aux molécules isolées.

Le choix des plantes est basé d'une part sur l'importance de leur famille "les lamiacées" qui sont riches en métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes...) tout en sachant que ces derniers sont produits exclusivement par les plantes et d'autre part sur leur usage traditionnel connu et fréquent chez nos populations.

Cette étude vise la détermination structurale des différents flavonoïdes extraits a partir de ces deux plantes médicinales, leurs quantifications, et la mise en évidence des activités liées à ces molécules en prenant compte la recherche de nouveaux composés pour une meilleure et complète connaissance de la richesse du monde végétal.

Ce travail est réalisé dans le cadre du Projet de recherche F 0092 0060 107 intitulé : Les polyphénols: Phytonutriments des plantes d'intérêt économique : biodiversité, caractérisation et recherche de bioactivité.



## **Chapitre 1 : revues bibliographiques**

## **I- Description des plantes :**

### **1- Les plantes médicinales :**

Depuis l'antiquité l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé pour les utiliser comme médicaments et remèdes à fin de soigner les différentes maladies, jusqu'à maintenant les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essayent de synthétiser de nouvelles molécules. D'après les études statistiques, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes (Damintoti 2005).

Vers les années 1990 les grandes compagnies pharmaceutiques se sont détournées des produits naturels pour s'intéresser à la chimie combinatoire, croyant que dans quelques années le nombre de médicament serait plus élevé, cependant ce n'était pas le cas malgré le grand budget investis pour la recherche. Par conséquent le nombre de médicaments a chuté d'une façon remarquable sachant que pour la synthèse d'un seul médicament 10000 molécules doivent être synthétisées et testées (Bérubé 2006).

En partant de ces résultats et données, les biologistes et les chimistes reconnaissent l'importance majeure de produits naturels et que les méthodes et les techniques de biotechnologie ainsi que la chimie sont limitées; ce qui peut expliquer le grand intérêt porté à la recherche de composés issus des sources naturelles.

Les plantes avec leur nombre illimité constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à ses molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et activités biologiques. Les plantes aromatiques sont caractérisées par leur richesse en principes actifs et en substances telles que les polyphénols et les flavonoïdes.... Qui sont dotées des propriétés importantes et différentes.

A partir des recherches antérieures qui sont déjà faites, et les usages traditionnels appliqués par les autochtones algériens; les plantes médicinales: le Thym (*Thymus serpyllum*, et *Thymus algeriensis*) et la Sauge (*Salvia officinallis*) sont celles choisies pour cette étude.

## **2- Description des plantes étudiées :**

### **2.1- Le Thym :**

Utilisation du thym dans la vie humaine date depuis très longtemps, il était dédié à Vénus parce qu'il apportait de l'énergie vitale pour le corps. Aetius, est un célèbre médecin grec du V<sup>o</sup>siècle, recommandait le thym pour les sciatiques, les douleurs des reins et de la vessie, la colite et les ballonnements, pour les mélancoliques et ceux qui un esprit troublé. Au XI<sup>o</sup>siècle, Hildegarde et Albert le mentionnent contre la lèpre, la paralysie et les maladies nerveuses (anonyme 1).

L'origine du nom sujette à diverses interprétations : Thym proviendrait du mot latin "thymus" qui signifie "parfumé".Thym à partir du mot grec "thumus" qui signifie "courage" (anonyme 1).

Le thym appartient à la famille des labiées, environ 215 espèces sont cultivées dans le monde (Ebrahimi *et al* 2008). En Algérie, il est représenté par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination. Citant ainsi quelques espèces connues en Algérie : *T.vulgaris*, *T.serpyllum*, *T.algériensis*, *T.hirtus*, *T.fontanésii*. (Quezel ; Santa 1963)

### **A- *Thymus serpyllum* (serpolet) :**

#### **A-1 Description morphologique :**

C'est une plante aromatique basse, qui ne dépasse pas 10 cm de hauteur, mais s'étend sur 50 cm de largeur ; elle est tapissante, aux tiges radicales aux nœuds, aux très petites feuilles opposées ovales ou lancéolées, aux courtes hampes florales dressées. De juin à septembre, son feuillage aromatique vert à reflets pourprés sous le soleil disparaît littéralement sous une nuée de petites fleurs bleues groupées en capitules terminaux. Après la floraison, (juin à octobre) viennent les fruits formés de quatre petits akènes. (Anonyme2)



**Figure :** Thymus serpyllum (Anonyme 2)

### **A-2 Classification taxonomique :**

Selon la classification classique des plantes, le serpolet suit la classification suivante (anonyme2) :

Règne : Plantae  
Sous règne : Tracheobionta  
Division : Magnoliophyta  
Classe : Magnoliopsida  
Sous classe : Astéridae  
Ordre : Lamiales  
Famille : Lamiaceae  
Genre : Thymus  
Espèce : *Thymus serpyllum*

### **B- Thymus algeriensis :**

#### **B-1 Description morphologique :**

Feuilles florales peu différentes des feuilles caulinaires, peu dilatées. Fleurs de 5 mm à 6 mm. Pelouse dans toutes les régions montagneuses. La longueur peut dépasser les 10 cm contrairement au serpolet. Espèce endémique (Quezel et Santa 1963).

## **B-2 Classification taxonomique :**

Règne : Plantae  
Sous règne : Tracheobionta  
Division : Magnoliophyta  
Classe : Magnoliopsida  
Sous classe : Astéridae  
Ordre : Lamiales  
Famille : Lamiaceae  
Genre : Thymus  
Espèce : *Thymus algeriensis*

## **C- Usage traditionnel du Thym :**

Le thym est utilisé fréquemment par les populations autochtones grâce à ses diverses propriétés importantes. Citant ci-dessous les plus connues et appliquées : Cette plante aromatique très odorante, utilisée dans la cuisine algérienne pour faire les différents plats ; recommandée contre tous les types de faiblesse, et indiquée pour les crampes d'estomac, les inflammations pulmonaires et les palpitations, ainsi que les affections de la bouche, les contusions (lésion produite par un choc sans déchirure de la peau), et les accidents articulaires (Djerroumi et Nacef 2004). Il est considéré aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces, dans le traitement des affections respiratoires ; rhume, grippe, et angine. Il contribue également dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies, et aussi l'expulsion des gaz intestinaux. (Hans 2007)

## **2-2- la sauge :**

D'après la 1ère histoire, une variété de sauge appelait « Chia » était cultivée par les mexicains. Les grecs, les romains et les arabes ont utilisé la sauge comme tonique, et en compresse contre les morsures de serpent. Au 18ème siècle, les feuilles de la sauge ont été roulées comme des cigarettes pour les fumer contre l'asthme et surtout au printemps (Anonyme 3).

Salvia est une plante annuelle et biennale d'origine méditerranéenne de la famille des labiées (Djerroumi, Nacef 2004). Il existe environ 900 espèces identifiées autour du monde (Maksinovic *et al* 2007 ; Longaray *et al* 2007). En Algérie les espèces qui ont été déterminées sont dans l'ordre d'une trentaine. Plusieurs appellations ont été données à la sauge. Selon Ibn El Beytar, les andalous la nomment "essalma" qui ajoute qu'elle est appelée " salbia" par les botanistes en Espagne. El djazairi indique l'expression "souek ennebi" comme synonyme de Saleme.



**Figure** : La sauge : fleurs et feuilles



**figure** : La sauge : feuilles

### **A- Description morphologique:**

Cette plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80cm, rameaux vert-blanchâtre. Feuilles assez grandes, épaisses, vert-blanchâtres, et opposées; fleurs bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Calice campanulé à 5 dents longues et

corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée; fruits en forme de tétrakènes (hans 2007)

**B- Classification taxonomique** : La sauge suit la classification suivante:

Règne : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Classe : Magnoliopsida  
Ordre : Lamiales  
Famille : Lamiaceae  
Genre : Salvia  
Espèce : *Salvia officinalis* L

**C- Usage traditionnel de la sauge** :

La sauge est une des plantes les plus utilisées, vu ses propriétés importantes; elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen

Pour usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies (Djerroumi et Nacef 2004).

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux (Radulescu *et al* 2004). Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et comphré (Duling 2007).

### 3- Les composés phénoliques rapportés :

#### A- La sauge (Tableau 1) :

Polyphénols	Auteurs
<b><u>Acides phénols</u></b>	
4-Hydroxybenzoïque acide	Wang et al 2000
3-Methoxy-4-hydroxybenzoïque acide (acide vanillique)	Cuvelier et al 1996
acide férulique	
acide rosmarinique	Cuvelier et al 1996
acide salvianolique	Cuvelier et al 1996; Wang et al 1998
cis-p-Coumarique acide 4-(2-apiosyl) glucoside	Zhang and Li 1994
trans-p-Coumarique acide 4-(2-apiosyl)glucoside	Lu and Foo 2000
	Lu and Foo 2000
6-Feruloyl-a-glucose	
6-Feruloyl-b-glucose	Wang et al 1998
1-(2,3,4-Trihydroxy-3-méthyl)butyl-6-feruloylglucoside	Wang et al 1998
	Wang et al 1998
6-Caffeoyl-1-fructosyl-a-glucoside	
1-Caffeoyl-6-apiosylglucoside	Wang et al 1998
1-p-Hydroxybenzoyl-6-apiosylglucoside	Wang et al 1998
	Wang et al 1998
<b><u>Les flavonoïdes</u></b>	
<b><u>Flavones</u></b>	
5,7,40-Trihydroxyflavone (apigénine)	
-7-Méthyl ether (genkwanine)	Sagdullaeva et al 1972; Cuvelier et al 1996
-7,40-Diméthyl ether(acacétine)	Brieskorn and Biechele 1971; Cuvelier et al 1996
	Cuvelier et al 1996
5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone (luteoline)	Brieskorn and Biechele 1971
<b><u>Flavonols</u></b>	
Quercétine	Kenjeric et al 2008
<b><u>Flavanones</u></b>	
5,7,30-Trihydroxy-40-méthoxyflavanone (hespétine)	Cuvelier et al 1996
<b><u>Flavone glycosides</u></b>	
Apigénine-7-glucoside (cosmosiine)	Masterova et al 1989
Luteoline-7-glucoside (cinaroside)	Wang et al 1998; Lu and Foo 2000
-7-Glucuronide	Lu and Foo 2000, Lima et al 2007



## B- Le Thym (Tableau 2) :

Polyphénols	Auteurs
<u>Les acides phénols</u>	
Acide Chlorogénique	Angela 2008
Acide Caftarique	Angela 2008 ; Mariana 2007
Acide Caffeique	Angela 2008 ; Mariana 2007
Acide p-coumarique	Angela 2008 ; Mariana 2007
Acide Ferulique	Angela 2008 ; Mariana 2007
Acide gentisique	Mariana 2007
acide rosmarinique	María 2008
<u>Les flavonoïdes</u>	
<u>Les flavones</u>	
Luteoline	Angela 2008 ; Mariana 2007 ; Marc 2000
Apigénine	Angela. 2008 ; Mariana 2007 ; Marc 2000
genkwanin	Marc 2000
<u>les flavanols</u>	
Quercétine	Mariana 2007

## **II – Structure et biosynthèse des composés phénoliques**

Chez les végétaux, comme chez autres organismes vivants, des enzymes spécifiques participent à la formation de petites molécules qui constitueront les éléments de base des macromolécules : protéines, acides nucléiques, polysaccharides, et les lipides. Leur synthèse caractérise les cellules ou les organismes en croissance, et constitue le métabolisme primaire. (Ferrari 2002) En outre, l'une des singularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle n'est pas bien établi.

Le fait que ces composés ne se rencontrent pas chez tous les êtres vivants indique qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général mais qui prend naissance de ses produits; ce sont les métabolites secondaires. Ces derniers sont les outils principaux de la coévolution plante-être vivant et environnement.

Au début, les recherches s'intéressaient aux effets protecteurs des polyphénols. Ces composés sont présents en grande quantité dans les plantes consommées par les herbivores; parce qu'ils limitent leur appétence et digestibilité. Par conséquent, ils ont été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. Ce qui est absolument différent de ce qu'on pense aujourd'hui après la reconnaissance de leurs propriétés et effets présumés sur la santé humaine (Scalbert 2004).

### **1- Biosynthèse des composés phénoliques :**

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues.

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux (Sarmi et Cheymer 2006). Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques :

**a- voie de l'acide shikimique :** Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la

formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques citant quelques transformations :

- vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique...) par Béta-oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques)
- vers les estres de type chlorogénique par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartrique, shikimique...) (Sarmi et Cheymer 2006).
- vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations, prénylations...)
- vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases. (Bouheroum 2007)

#### **b- la voie d'acétate malonate:**

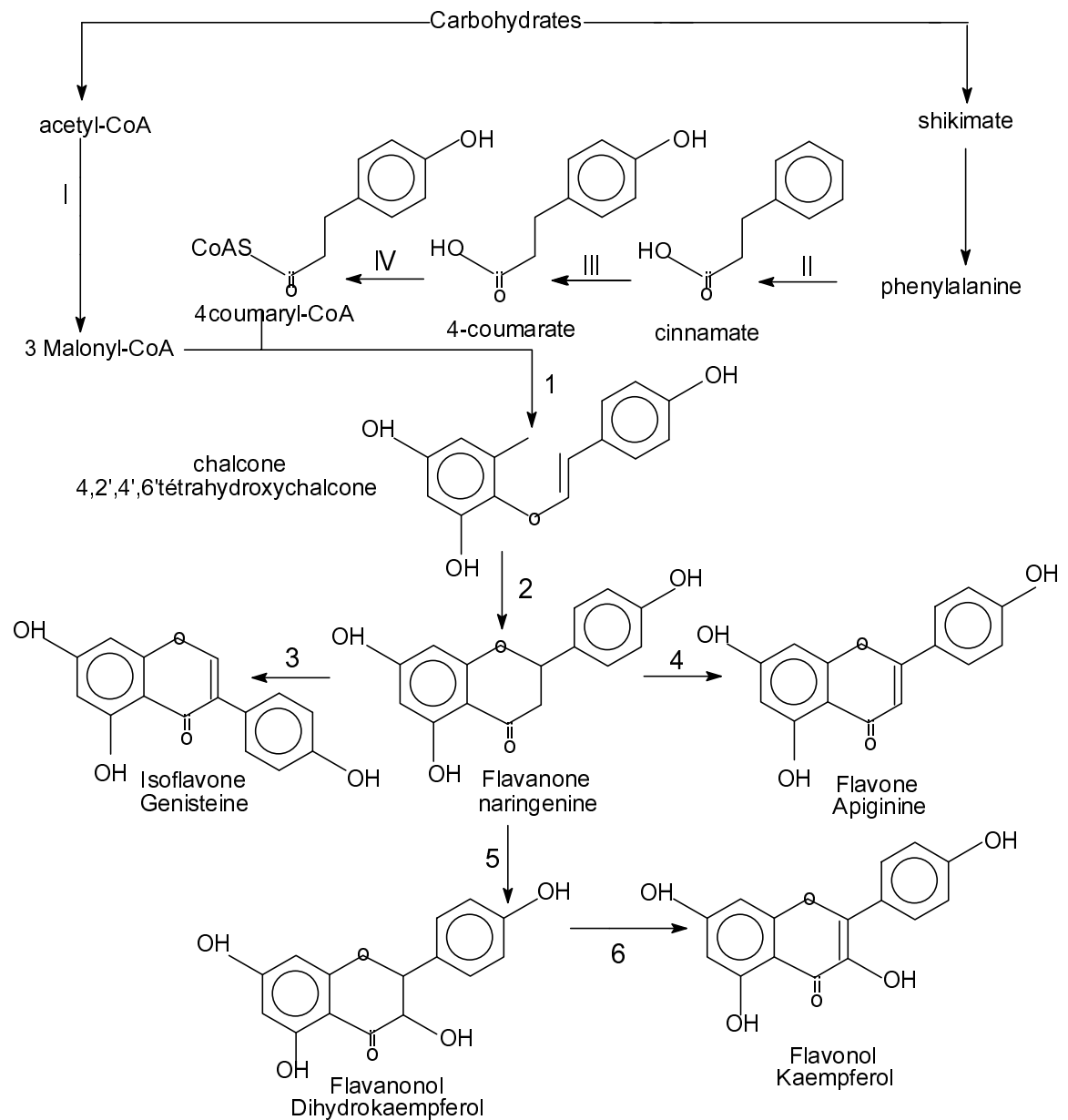
Elle conduit par condensations répétées à des systèmes aromatiques ex : les chromones, les isocoumarines, et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones. (Bouheroum 2007)

## **2- Biosynthèse des flavonoïdes :**

La formation de ces molécules flavonoïques s'effectue par un intermédiaire connu : tétrahydroxychalcone à partir de laquelle se différencient plusieurs types de flavonoïdes. (Bouheroum 2007)

Le squelette moléculaire de base a une double origine : 3 molécules d'acétyl CoA (CoA = coenzyme A) pour le cycle A qui dérive de la voie acétate malonate, une molécule de p-coumaryl pour le cycle B qui dérive de la voie shikimate et aussi pour l'hétérocycle C. C'est alors à partir de la chalcone ainsi formée par cette condensation chimique que vont être mis en place les flavonoïdes appartenant aux diverses classes, en particulier des pigments comme les anthocyanes et les flavonols, ou encore certains monomères de type flavonols dont la polymérisation conduira aux tannins condensés.

La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycosilations...(Sarmi et Cheymer 2006)



### Les enzymes :

- I- Acetyl CoA carboxylase
- II- Phenylalanine ammonia lyase
- III- Coumarate 4-hydroxylase
- IV- 4-coumarate CoA ligase
- 1- Chalcone synthase
- 2- Chalcone isomérase
- 3- Hydroxy-2 isoflavone synthase
- 4- Flavone synthase
- 5- Flavanone-3 hydroxylase
- 6- Flavonol synthase

Biosynthèse des flavonoïdes (Treki 2002)

### 3- Structure et catégories des composés phénoliques :

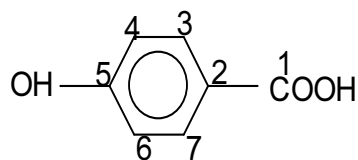
Structuralement, les composés phénoliques comprennent un noyau aromatique, qui possède un ou plus de substituant hydroxylé. Ce dernier conduit les composés phénoliques simples à se polymériser pour obtenir des phénols complexes ou polymérisés; malgré la grande diversité structurale ce groupe est connu sous le nom : Polyphénols.

La plupart des composés phénoliques sont présents conjugués avec un mono ou poly saccharides, liés à un ou plusieurs groupes phénols, ça peut être aussi des dérivations fonctionnelles comme des esters et des méthyles esters. Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes; comme le montre le tableau suivant (Nagendran 2006) :

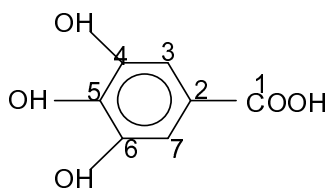
**Tableau 3:** classe des polyphénols

Classe	Structure
Phénols simples, benzoquinones	C6
acide hydroxybenzoïque	C6-C1
acéthophénones, acide phénylacétique	C6-C2
acide hydroxycinnamique, phénylpropanoïdes (coumarines, isocoumarines, chromones)	C6-C3
flavonoïdes, isoflavonoïdes	C6-C3-C6
lignanes, néolignanes	(C6-C3)*2
biflavonoïdes	(C6-C3-C6)*2
tannins condensés (proanthocyanidines, ou flavolans)	C6-C3-C6)*n

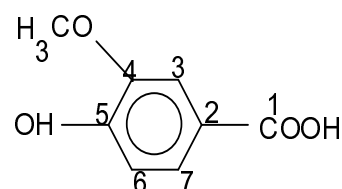
D'après la classification si dessus, on distingue que : les acides phénoliques, les flavonoïdes, et les tannins sont considérés comme les principaux composés phénoliques.



Acide hydroxybenzoïque



Acide gallique



Acide vanillique

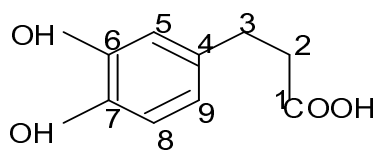
### **3-1 Les acides phénoliques :** Cette classe est divisée en deux sous classe

#### **A- les hydroxybenzoïques :**

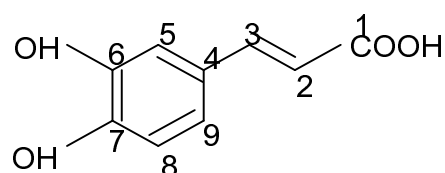
Incluse plusieurs molécules et les plus fréquentes sont; L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque. Ces composants ont une structure de C6-C3 en commun.

#### **B- les hydroxycinnamiques :**

Ces molécules possèdent un cycle aromatique avec 3 carbones en plus C6-C3; par exemple : l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique, et l'acide sinapique (Nagendran 2006).



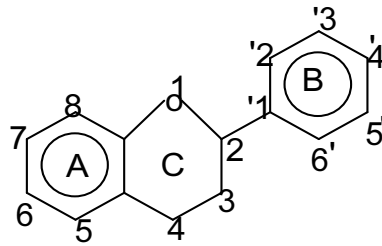
Acide p coumarique



Acide caféique

### **3-2- Les flavonoides :**

Ils constituent le plus large groupe des phénols dans la plante. Les flavonoides identifiés jusqu'à maintenant sont de 4000 composés; ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi 2004).



**Figure :** Structure nucléaire des flavonoïdes (Rania 2007)

Ces molécules ont un poids moléculaire faible, consiste à 15 atomes de carbones arrangés comme suit : C6-C3-C6 sont composés de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle (Nagendran 2006).

Les substitutions variées au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes des flavonoïdes :

Flavonols: quercétine, myricétine, rutine, kaempférol...

Flavones : apigénine, lutéoline...

Flavanones : eriodictyol, naringine, naringénine...

isoflavones : génistéine, daidzéine...

anthocyanidines : alpha tocophérol, malvidine...(Sarmi et Cheymer 2006).

Les flavones, et les flavonols sont les plus connus grâce à leur pouvoir antioxydant élevé, et les plus divers sur le plan structural. Les substitutions touchant les noyaux A ou B qui peuvent parvenir dans chaque classe des flavonoïdes sont : une oxydation, alkylation, glycosylation, acylation, et sulfation.

### **3-3 Les tannins :**

Sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé, ils constituent le 3<sup>ème</sup> groupe important des composés phénoliques. Les tannins possèdent 2 sous groupes; tannins hydrolysables et tannins condensés. Les premiers sont esters acide gallique (gallo et ellagi tannins).

Les derniers sont des polymères de polyhydroxyflavan 3-ol monomères (aussi connu proanthocyanidine).



Il existe un 3 sous groupe; les phlorotannins ont été isolés à partir des algues brunes, mais qui ne sont pas inclus dans l'alimentation humaine (Sarmi et Cheymer 2006).

### **III- rôle et propriétés biologiques des composés phénoliques:**

#### **1- Rôle physiologiques des polyphénols dans la plante :**

La présence des flavonoïdes ainsi d'autres polyphénols dans quasiment toutes les parties du végétal, confère une protection considérable à la plante.

Elle assure la survie de cette dernière dans les différentes conditions environnementales (climat, sols, sécheresse, rayons UV...). Ces métabolites sont doués de plusieurs rôles au sein de la plante, dont on peut citer :

##### **1.1- la lutte contre les agents pathogènes :**

Des recherches récentes ont démontré que la teneur en polyphénols s'accroît si la plante est agressée par des bactéries, champignons, ou autres comme les rayons UV et l'élévation de la température (Mohammedi 2006, Piquemal 2008) cela confirme qu'ils ont un rôle important dans la défense de la plante.

Le mécanisme de défense des polyphénols lors de l'attaque d'un pathogène est élucidé par des expériences déjà faites sur des espèces d'arbre qui est résumé comme suit ;

- Une fois le pathogène a pu s'intégrer à l'intérieur de l'hôte, ceci aboutit à la mise en place d'un épiderme interne délimitant une zone périhaustoriale. Dans cette région s'accumulent des polyphénols et plus particulièrement des flavonoïdes.
- Dès ce stade s'installe une compétition entre deux phénomènes qui sont d'une part la force de pénétration du pathogène ; cela est lié à la capacité et l'intensité prolifératrices de ses cellules. Et d'autre part les capacités de synthèse des flavonoïdes par les cellules de l'hôte. Si c'est la force de pénétration du pathogène qui l'emporte, celui-ci envahit rapidement les tissus de l'hôte. Dans le cas contraire, les capacités de synthèse des polyphénols qui l'emporte, ils s'accumulent dans la zone périhaustoriale et forment un manchon qui isole totalement ce pathogène. Ce dernier se trouve bloqué dans sa progression (Lepoivre 2003). Par la suite, d'autres systèmes de défense qui interagissent pour l'élimination totale du pathogène.

## **1.2- L'astringence et le goût:**

L'astringence est la sensation tactile provoquée par l'ingestion de nombreux aliments, du cacao au thé, du vin rouge aux noix.... Derrière cette perception de râpeux ou de sécheresse, se cachent des polyphénols.

Il s'agit plus précisément des proanthocyanidines ou tannins condensés, des polymères de flavanols qui contribuent aussi à l'amertume. D'un point de vue chimique, ces polyphénols provoquent la précipitation des protéines salivaires, entraînant avec elles leur cortège de molécules d'eau qui lubrifie alors la muqueuse buccale (Mohammedi 2006 ; Guggenbühl 2003).

## **1.3- la couleur de la plante :**

La coloration des fleurs, fruits, et des feuilles de la plante est due à la présence des substances organiques colorantes; qui absorbent seulement certaines longueurs d'onde de la lumière et émettent celle que nous percevons comme la couleur des fleurs. Ainsi, les pétales bleus possèdent les pigments qui reflètent la lumière bleue et absorbent les autres composantes du spectre.

Ces pigments sont essentiellement la chlorophylle, les polyphénols (flavonoïde, acides phénol, ...), les caroténoïdes. Les pigments floraux les plus courants et les plus abondants sont les flavonoïdes, dont les anthocyanes, qui couvrent une grande gamme de couleur du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune, par contre les caroténoïdes donnent l'orange et le jaune. Ces deux types de pigments peuvent d'ailleurs coexister, ce qui donne une large gamme de couleurs. (Anonyme 4). Les facteurs qui peuvent influencer la couleur apparente sont :

**L'acidité** : Le pH varie dans les vacuoles de 2,5 à 7,5. La cyanidine (anthocyane), prendra une coloration rouge en milieu acide, violette en milieu neutre et bleue en milieu basique.

**Le degré d'hydroxylation du cycle B** : L'effet de "bleuissement" s'accroît au fur et à mesure avec l'oxydation. (Piquemal 2008)

#### **1.4- l'attraction et la pollinisation :**

Ces métabolites, polyphénols et flavonoïdes interagissent aussi dans le phénomène d'attraction, la couleur de la plante est considérée comme un signal visuel aux insectes pollinisateurs (Marfak 2003 ; Mohammedi 2006).

Dans certains cas, les flavonoïdes servent pour éloigner les prédateurs. Il existe même des flavonoïdes qui sont toxiques pour certains insectes qui sont néfastes pour la plante.

#### **1.5- attribution à la croissance de la plante :**

L'intervention des polyphénols dans le développement et la croissance de la plante n'est pas confirmée jusqu'à maintenant, car les recherches établies dans ce sujet ont mené à des résultats différents. L'un confirme cette hypothèse et d'autres la refusent.

##### **1<sup>ère</sup> hypothèse :**

Les flavonoïdes peuvent intervenir dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en agissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Marfak 2003 ; Anonyme 5). Il semble d'autre part que lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques, des composés phénoliques et phénols simples sont synthétisés stimulant l'activité peroxydasique caractéristique des tissus par voie de lignification. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel. (Mohammedi 2006)

##### **2<sup>ème</sup> hypothèse :**

William et Hopkins (2003) rapportent que deux flavonols (kamférol et quercétine) sont appliqués dans la croissance de la plante qui est régulée par la lumière. Le kamférol inhibait cette croissance en stimulant l'oxydation de l'acide 3-indole acétique (**AIA**).

Besseau (2007) a confirmé lors de son travail sur le métabolisme des phénylpropanoïdes, que l'accumulation des flavonoïdes conduit à l'inhibition du transport d'auxine et à une forte réduction de la croissance des plantes. Quand la

synthèse des flavonoïdes est bloquée par la répression de la chalcone synthase, les plantes retrouvent une croissance normale.

### **1.6- Composés phénoliques et symbiose :**

L'existence d'une symbiose entre les légumineuses (trèfle, luzerne, pois, soja, haricot...) et des bactéries du genre *Rhizobium* permet à la plante d'acquérir la faculté de fixer directement l'azote atmosphérique. Les flavonoïdes possèdent un rôle important et primordial dans ce phénomène biologique. Ils représentent le premier niveau de spécificité entre la plante hôte et les différentes lignées bactériennes. (Lahlah 2008, Kechkar 2008, Mohammedi 2006)

La symbiose *Rhizobium*/légumineuse se met en place, que lorsque les gènes codant pour les facteurs Nod sont activés. Cette activation s'effectue par une action conjointe d'une protéine Nod D, qui est produite constitutivement par un gène bactérien et le composé phénolique (flavonoïdes) exsudé dans la rhizosphère.

La nécessité de flavonoïdes inducteurs a été démontrée en 1986 chez l'espèce *luzerne/Rhizobium mililoti* où la lutéoline était efficace à faible concentration. Il est important de noter que le flavonoïde se diffère d'une espèce à autre, cette spécificité dépend de deux facteurs qui sont :

- ❖ La production caractéristique des composés phénoliques ou flavonoïques par une légumineuse donnée.
- ❖ La reconnaissance de ces composés par la bactérie symbiotique spécifique. Il s'est avéré que certains flavonoïdes peuvent être inducteurs chez des espèces de *Rhizobium*, et inhibiteurs chez d'autres.

Le mécanisme de l'interaction entre les composés phénoliques inducteurs et la protéine Nod D produite par différentes espèces de *Rhizobium* est encore mal connu. Il semble que cette protéine interagisse par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale avec les flavonoïdes inducteurs spécifiques. Après liaison, la protéine Nod D pourrait agir en déformant la double hélice d'ADN du promoteur qui gouverne l'expression des différents gènes Nod codant les facteurs nod. (Macheix *et al* 2005).

## **2- Les propriétés biologiques des polyphénols :**

### **2.1– propriété antioxydante :**

C'est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

#### **A- Radicaux libres :**

Par définition, sont des entités chimiques possédant un électron non apparié « célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron célibataire a naissance suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour entraîner la rupture des liaisons entre les électrons. (Boutabet 2007, Lahoual 2004, Hadi 2004, Servais 2002)

Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, protéines cellulaires, les acides nucléiques, et ainsi provoquant la mort cellulaire. (Marfak 2003, Boutabet 2007). Il existe deux sources différentes de ces radicaux libres:

#### **A.1- Sources endogènes :**

Les réactions enzymatiques, dont plusieurs d'entre elles sont considérées comme source principale des ROS ex ; NADPH oxydase, lipoxygénase, xanthine oxydase (enzyme dans le foie).

La mitochondrie est un élément fondamental pour le fonctionnement de la cellule, dans le quel s'effectue la respiration cellulaire. La consommation de l'oxygène et les différentes réactions du transfert des électrons (énergie) produisent en performance les ROS. Les ions métalliques présents dans l'organisme ex ; fer cuivre, peuvent coopérer avec des espèces moins réactives pour produire des radicaux hydroxyles. , (Boutabet 2007, Servais 2002).

## **A.2- Sources exogènes :**

Les ROS sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation d'alcool ou médicaments (dont leurs structures peuvent jouer le rôle des accepteur et donneurs d'électron), l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme ; Les facteurs interagissant lors des inflammations. Toutes ces situations provoquent une surproduction des ROS dans l'organisme (Fuorocci 2006).

## **B- Stresse oxydatif :**

Dans l'organisme, la production des radicaux libres est contrôlée par les systèmes de défenses. En conditions normales, on assiste à un équilibre de la balance antioxydants/prooxydants. (Mohammedi 2006)

Une fois cet équilibre est affecté par une augmentation de la production d'oxydants ou par une altération dans la défense antioxydante, on assiste à ce qu'on appelle « stresse oxydatif ». (Boutabet 2007, Lahoual 2004)

## **C- Les ROS (reactive oxygen species):**

Ces espèces constituent l'ensemble des dérivés des radicaux de l'oxygène. Il existe plusieurs formes de ces espèces dont les plus importantes sont les suivantes :

### **a- L'anion superoxyde :**

La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde :  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ . Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.

### **b- Le radical hydroxyle : OH•.**

Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.

### **c- Le radical peroxyde : ROO•**

d- L'oxygène singulet :  $^1\text{O}_2$  forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité. (Hadi 2004, Mohammadi 2006). Il existe d'autres formes des ROS, présentées dans le tableau suivant (Fuorocci 2006, Boutabet 2007)

**Tableau 4:** Espèces réactives de l'oxygène (ROS).

ROS	Formule chimique
Oxygène Radical	$^3\text{O}_2$
hydroperoxyde moléculaire	$\text{HOO}^-$
Hydroperoxyde	$\text{ROOH}$
Radical alkoxyde	$\text{RO}^-$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Radical oxyde nitrique	$\text{NO}^-$
Peroxinitrite	$\text{ONOO}^-$
Hypochlorite	$\text{ClO}^-$

#### **D- Système de production des ROS :**

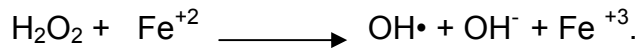
L'oxygène moléculaire constitue le premier élément de plusieurs réactions chimiques qui conduisent à la génération des molécules oxydantes, qui sont générés continuellement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Cet élément  $\text{O}_2$  moléculaire est oxydé en anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ , qui donne naissance au peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de superoxyde dismutase. Ce dernier a deux devenir différents selon le milieu et ses composants, il peut donner naissance à d'autres éléments oxydés, ou à la formation des éléments neutres en présence des enzymes antioxydantes.



Le peroxyde d'hydrogène réagit avec le radical superoxyde, aboutissant ainsi à la production du radical hydroxyle. Ce phénomène est nommé réaction d'Haber-weiss.  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}^{\cdot-}_2 \longrightarrow \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ .

Comme il peut être réduit en présence des ions ferreux, et convertit en un radical hydroxyle hautement réactif et grandement toxique par la réaction de fenton :



De plus, une production excessive d' $\text{O}^{\cdot-}_2$  favorise la réaction entre l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote (NO), ce qui entraîne la production de peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Celui-ci est un agent oxydant extrêmement puissant, capable d'endommager plusieurs molécules biologiques.



## **E- Les défenses enzymatiques contre les ROS :**

### **E.1- Réaction à la superoxyde dismutase :**

L'oxygène moléculaire réduit en anion superoxyde  $\text{O}^{\cdot-}_2$  est transformé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène et en oxygène, selon la réaction :  $\text{O}^{\cdot-}_2 + \text{O}^{\cdot-}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

L'existence de cette enzyme en quantité suffisante assure la transformation rapide des  $\text{O}^{\cdot-}_2$  produits par la chaîne respiratoire.

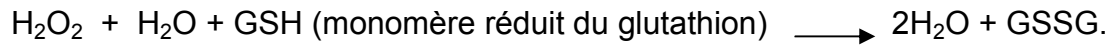
### **E.2- Réaction à la catalase :**

Le peroxyde d'hydrogène peut être hydrolysé par la catalase en libérant ainsi l'oxygène et l' $\text{H}_2\text{O}$  selon la réaction :



### **E.3- Réaction à la glutathion peroxydase :**

La glutathion peroxydase assure la transformation du peroxyde d'hydrogène en présence d'H<sub>2</sub>O et le monomère GSH en dimère de glutathion liés par un pont de disulfure (liaison entre deux bases de cystéines.).



Ce dernier est réduit une autre fois par la glutathion réductase pour compléter le cycle.  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$ . (Boutabet 2007)

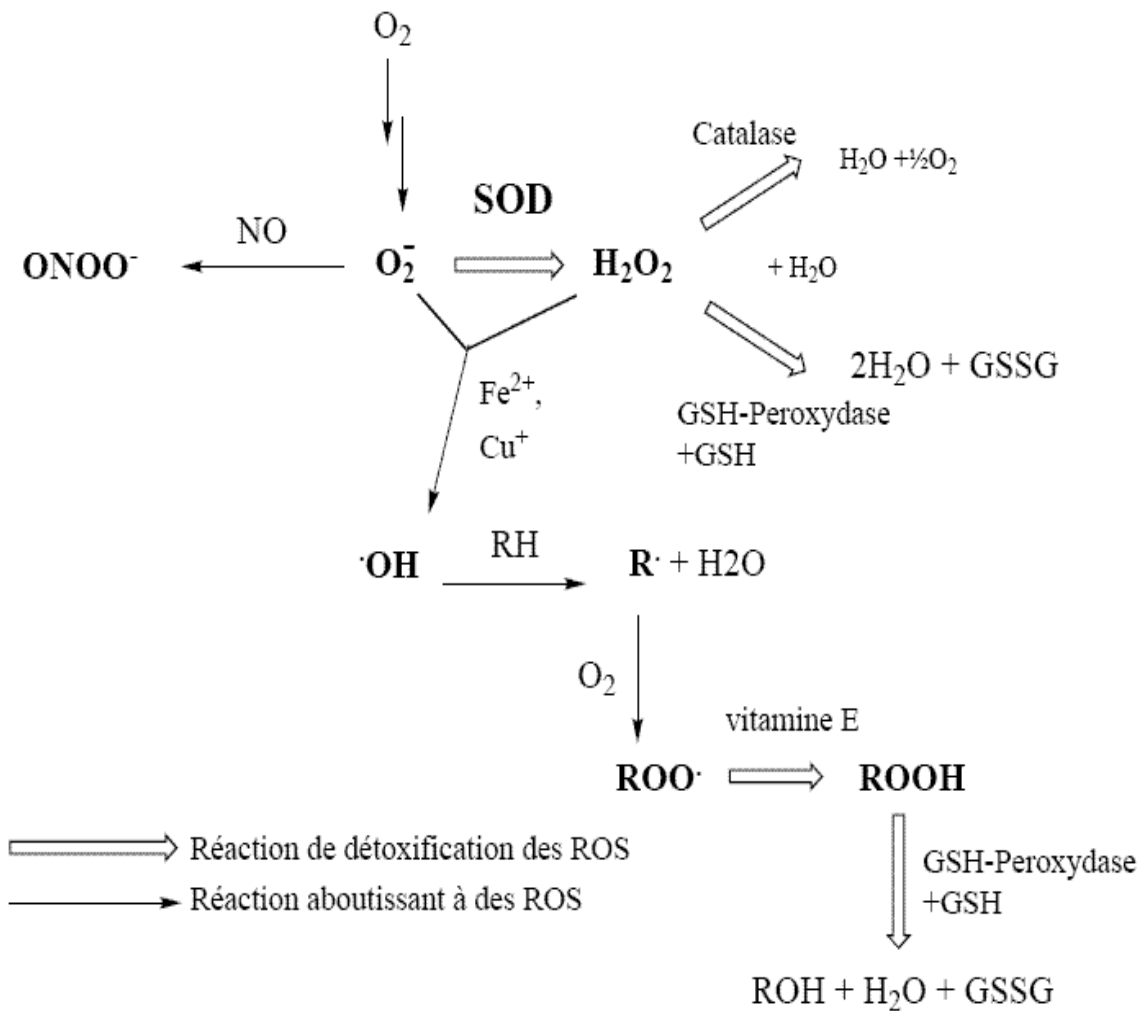


Schéma récapitulatif de la formation et la neutralisation des ROS (Anonyme 6)

## **F- Les défenses non enzymatiques contre les ROS :**

En plus des voies enzymatiques, il existe d'autres mécanismes non enzymatiques qui interviennent dans la détoxification des ROS. L'exemple de la vitamine E et C, le bêta carotène, et les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes...).

### **F.1- La vitamine E (alpha tocophérol) :**

C'est une molécule qui se localise surtout dans la membrane externe des mitochondries et du réticulum endoplasmique. Elle est constituée de deux extrémités dont l'une hydrophile et l'autre hydrophobe, qui lui favorisent la fixation aux radicaux libres. (Boutabet 2007)

L' $\alpha$ -tocophérol réagit avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation (Hadi 2004), et en inhibant la peroxydation lipidique (Servais 2002 ; marfak 2003).

Pieroni *et al* (2002) rapportent que les expériences cliniques sur des patients ayant la maladie d'Alzheimer présentent des avantages remarquables suite à un traitement par la vitamine E. Cette dernière est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines (Mohammedi 2006), et de quantité moins importante dans les fruits, les légumes et la viande. (Greet 2004)

### **F.2- La vitamine C (l'acide ascorbique) :**

C'est une molécule hydrosoluble. Lors de son oxydation en acide d'hydroascorbique, elle passe par une forme intermédiaire qui est le radical ascorbyl capable de capter certaines espèces radicalaires. (Boutabet 2007)

La vitamine C intervient dans la protection de la peau vis-à-vis la toxicité induite par les rayonnements ultraviolets. A forte concentration, la vitamine C peut se comporter comme un prooxydant générateur des radicaux libres. (Hadi 2004, Servais 2002)

### **F.3- La $\beta$ carotène :**

C'est une molécule liposoluble présente dans les membranes biologiques. Sa structure chimique hautement insaturée lui favorise adéquatement les liaisons avec les radicaux libres et plus particulièrement l'inactivation de l'oxygène singulet (Hadi 2004). La fixation du radical libre sur un carbone de la chaîne polyinsaturée le stabilise, ce qui a pour effet d'arrêter la réaction radicalaire (Boutabet 2007). Les caroténoïdes empêchent les dommages génétiques, et l'expression des oncogènes (gènes provoquant le cancer), (Mohammedi 2006)

### **F.4- Les polyphénols :**

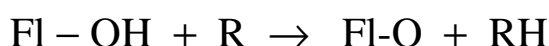
La capacité antiradicalaire de ces métabolites secondaires, plus particulièrement les flavonoïdes fait sujet de nombreuses études récentes dans le domaine des thérapeutiques antioxydantes, pour compenser l'insuffisance des moyens naturels de protection dans certains désordres comme le vieillissement cellulaire, le cancer ...

### **G- Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ROS :**

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydatif, vis-à-vis les effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, ou inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS, ou en captant les cations métalliques.

#### **G.1- Capture directe des radicaux libres :**

La structure chimique des flavonoïdes leur confère la capacité de fixer directement les radicaux libres « effet antiradicalaire ». L'évaluation de ce pouvoir antiradicalaire s'effectue par l'analyse spectrophotométrique UV/visible en utilisant le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle). Les flavonoïdes peuvent piéger le radical superoxyde, hydroxyle, alkoxyle et peroxyde, par transfert d'hydrogène. (Fuorroci 2006, Marfak 2003)



Fl : représente le flavonoïde.

R : représente le radical libre.

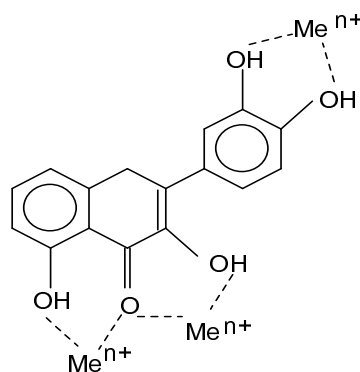
Le radical flavonoxy (FL-O) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable. La capacité antiradicalaire des flavonoïdes dépend principalement de leurs structures. (Marfak 2003)

### G.2- Capture des cations métalliques :

Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles très réactifs via la réaction de Fenton. (Fiorucci 2006)

Les flavonoïdes sont connus par leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production des ROS, pour cette raison sont considérés comme de bons chélateurs.

On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : Un noyau catéchol sur le cycle B, Les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C. Les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C. La quercétine est la plus active des flavonoïdes. (Marfak 2003)



**Figure** : sites de chélation des flavonoïdes (quercétine)

### **G.3- Inhibition enzymatique :**

Les flavonoïdes sont responsables de l'inhibition de très nombreuses enzymes, qui sont impliquées directement dans le stress oxydatif cellulaire exemple de la glutathione S-tranférase, les lipoxygénases, la xanthine oxydase, et les nitrique oxyde synthases (NOS). Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le flavonoïde et l'enzyme étudiés.

#### **\* Xanthine oxydase :**

Elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction s'accompagne de la génération des ROS  $O_2^-$  et  $H_2O_2$  à partir du dioxygène. A l'aide des méthodes chimique, il a été montré une similarité au niveau structural du cycle purine de la xanthine et du cycle A des flavonoïdes.

D'autres facteurs entrent en jeu comme l'absence de substitution en position 6 ou la présence de fonction hydroxyle en position 7, 3 et/ou 5. Cela acquière aux flavonoïdes ces différents critères des inhibiteurs potentiels. Le flavonoïde est capable de se lier aussi bien à l'enzyme native qu'au complexe enzyme/substrat (Marfak 2003).

#### **\*NO synthases (NOS) :**

Elle constituée d'un groupe d'enzymes responsables de la synthèse du monoxyde d'azote, responsable de la production des ROS. De nombreuses publications traitent de ce sujet et font références aux flavonoïdes comme inhibiteurs potentiels de la NOS, mais aucun indice au niveau moléculaire n'a pu être apporté pour éclaircir le mécanisme d'inhibition. (Fuorocci 2006)

### **2.2- Activité antibactérienne :**

Plusieurs études *invitro* et *invivo* sont focalisées pour l'évaluation des propriétés antibactériennes, et antifongiques des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales.

Moroh *et al* (2008), ont démontré l'effet antibactérien des extraits acétiques riches en alcaloïdes et en flavonoïdes de *Morinda morindoides*, sur 8 souches

d'*Escherichia coli*, germes bactériens rencontrés communément dans la diarrhée des nourissants, et des enfants jusqu'à l'âge de 5 ans.

Yango *et al* (2004), ont travaillé sur les extraits de mange (contenant des polyphénols dont les huiles essentiels font les composés majeurs) qui ont donnés des effets bienfaits chez des consommateurs volontaires (30 personnes), ayant des troubles gastro intestinaux causés par des agents entéropathogènes : *Escherichia coli*, et *Staphylococcus aureus*. Les tests in vivo des extraits ont mis en place un effet remarquable, dont les troubles gastro intestinaux ne sont pas survenus, ou ont diminué considérablement chez les personnes de test.

Alzoreky et Nakahara (2002), au cours d'une étude antibactérienne de 26 espèces de plantes médicinales, ont trouvé que la souche bactérienne la plus sensible est l'*Escherichia coli* par rapport aux extraits de *Thymus serpyllum*, *Cinamomum cassia* et autres.

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne était étudiée par Katarzyna et ses collaborateurs (2007). Ils ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à gram négatif (*Escherichia coli*...) et gram positif (*Staphylococcus aureus*...).

El Ajjouri *et al* (2008). Les huiles essentielles (thymol, et le carvacrol) extraits de *Thymus capitatus* et *Thymus bleicherians* sont pourvus d'action antifongique vis-à-vis les champignons qui sont responsables des pourritures brune et blanche du bois d'œuvre pendant le stockage. Par conséquent, l'utilisation de formulation volatile à base de plantes aromatiques et médicinales peut présenter de nombreux avantages de préservation du bois d'œuvre à l'échelle industrielle.

Lavigne *et al* (2007), lors d'une étude faite sur le crambe (famille des crucifères) ont démontré l'effet bénéfique de cette plante dans la prévention des infections urinaires. Les proanthocyanidines sont les principaux composés de l'activité antiadhérence des souches d'*Escherichia coli* uropathogène. Ces proanthocyanidines agissent en inhibant la synthèse des p-fimbriaes (responsables de la virulence bactérienne) et en déformant le corps cellulaire de la bactérie. Cette



plante présente un effet sur toutes les espèces *Escherichia coli* résistantes ou sensibles.

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ses agents pathogènes n'est bien connu, les études exploitées par Dominico *et al* (2005) ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits polyphénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physico-chimiques des composés polyphénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien.

### **2.3- Autres propriétés biologiques des polyphénols :**

#### **A- Propriété anti-inflammatoire :**

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols, peuvent prévenir de la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils inhibent l'enzyme NOS responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique, qui est déclencheur chimique de l'inflammation. (Lahlah 2008)

D'autres études, affirment l'action inhibitrice de ces flavonoïdes, plus particulièrement la lutéoline, l'apigénine, catéchine sur la cyclo-oxygénase enzyme synthétiques des molécules impliquées fortement dans le processus inflammatoire. (Gérotti 2006)

#### **B- propriétés préventives des maladies cardio-vasculaires :**

Le rôle inhibiteur des flavonoïdes sur l'oxydation in vitro des lipoprotéines de faible densité (LDL) fait sujet de nombreuses études. L'oxydation de ces molécules est en partie la cause des lésions dues à l'accumulation de dépôts lipidiques (essentiellement cholestérol) dans les vaisseaux sanguins. (Fuorocci 2006)

L'effet des flavonoïdes réside dans leurs capacités de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leurs résistances. (Lahlah 2008).

Une étude a été menée chez 23 sujets recevaient durant 4 semaines, un supplément riche en anthocyanidines oligomériques, des anthocyanines, et des acides phénoliques extraits de pépin de raisin, myrtille, agrume, et du vin rouge. Cette étude montre que les repas riche en graisse dégradent la fonction endothéliale de -12,37%, mais après supplémentation en flavonoïdes la dégradation diminue jusqu'à -3,16%. La différence est hautement significative. Par conséquent, l'effet des flavonoïdes était certain et très considérable, en limitant la dégradation de la fonction endothéliale. (Barringer *et al* 2008)

### **C- propriétés anticancéreuses :**

Récemment, une étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de plusieurs polyphénols, plus particulièrement des flavonoïdes sur les dommages causés à l'ADN des cellules hépatiques par divers composés hépatotoxiques et carcinogènes (qui oxydent les bases, et cause la rupture des deux brins d'ADN). La myricétine et la quercétine ont permis de diminuer la rupture des 2 brins d'ADN et le taux de pyrimidines oxydées, par contre ils n'ont aucun effet sur les purines oxydées. Les catéchines ont permis de limiter la rupture des deux brin d'ADN ainsi l'oxydation des bases purines. (Delgado *et al* 2008).

### **D- Propriétés préventives des flavonoïdes sur les neurones :**

D'autres études basées sur la recherche des propriétés inédites des flavonoïdes, ont pu confirmer l'effet de ces composés vis-à-vis la maladie de parkinson qui se caractérise par une dégénérescence (dénaturation) des neurones, dont l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de cette maladie. Les chercheurs ont observé que la luteoline inhibait de manière dose-dépendante la perte de neurones. (Chen *et al* 2008)

### **E- Propriétés des flavonoïdes vis-à-vis des allergies :**

Des chercheurs ont comparé les effets de 6 flavonoïdes (astragaline, fisetine, kaempferol, myricétine, quercétine, et rutine) sur les réactions inflammatoires allergiques. L'action pharmacologique de ces molécules suggère qu'elle pourrait présenter un intérêt dans le traitement des désordres allergiques (Park *et al* 2008).

#### **IV- Les polyphénols et la biotechnologie :**

La plante est le seul organisme vivant possédant la capacité de produire les métabolites secondaires, qui sont douées de plusieurs propriétés physiologiques et biologiques surtout celles destinées à la santé humaine.

Vu les bienfaits multiples de ces composés, de nombreuses études sont consacrées à la recherche des techniques, dont on peut tirer de grandes quantités de ces molécules sans arracher le monde végétal.

Prenant un exemple, le taxol était commercialisé en 1990, pour un traitement efficace contre les cancers des ovaires, seins, et poumons. Mais il faut environ 10 kilogrammes d'écorce d'if de pacifique pour extraire à peine 1gramme du taxol. Donc il faut sacrifier 6 arbres centenaires pour soigner un seul patient. D'un autre côté la synthèse d'une substance apparente qui est le taxotère, est très coûteuse et ne peut pas satisfaire tous les besoins.

A partir de là, les scientifiques cherchaient des techniques moins coûteuses, telles que l'exploitation de cellules ou d'organes végétaux *in vitro*. En cultivant ainsi en bioréacteur des racines manipulées génétiquement pour produire beaucoup de métabolites. C'est ce qui était fait par une équipe chinoise, qui a pu multiplier par 15 le rendement en métabolites secondaires, dans les racines de la plante *Salvia miltiorrhiza*. Cependant, les coûts d'infrastructures sont élevés, et il est difficile de conserver des conditions de parfaite stérilité en utilisant cette technique à l'échelle industrielle.

Par la suite, deux biologistes de INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) Eric Gontier et Frédéric Bourgaud qui ont travaillé longtemps sur la culture *in vitro*, ont mis en œuvre une technique plus simple qui consiste à cultiver la plante entière en conditions hors-sol, sous serre, et en extraire les métabolites secondaires une fois par mois en moyenne sans la tuer. Le procédé était breveté en 2002.

### **La technique appliquée :**

- La plante est cultivée dans un milieu liquide en « hydroponie », suivant une technique couramment utilisée pour faire pousser la tomate, et le concombre. Les extrémités sont trempées dans l'eau et régulièrement irriguées avec une solution nutritive composée d'eau et d'éléments minéraux. Cette technique présente un double avantage ; elle permet de doser avec précision les éléments nécessaires à la croissance de la plante, et elle la protège des parasites présents dans le sol.
- Stimulation de la production des métabolites secondaires par la simulation de l'attaque d'un parasite en induisant dans la solution nutritive des extraits d'insectes ou champignons pathogènes. Ces derniers sont nommés des éliciteurs.
- Lors de la fixation d'éliciteur sur la membrane externe des cellules végétales, une cascade de réactions est déclenchée en stimulant les gènes de défense du végétal. La cellule produit deux molécules l'acide jasmonique et l'acide salicylique, qui diffusent dans l'ensemble du végétal et provoquent la synthèse des métabolites secondaires par les cellules racinaires.

Les éliciteurs multiplient par six le rendement de ces métabolites. Le renforcement de la synthèse est effectué en ajoutant dans la solution nutritive des acides aminés, et des précurseurs qui sont assimilés par les cellules des racines.

Jean Paul Fèvre président de PAT SAS (Plant Advanced Technologies SAS), a déclaré que le rendement de la production peut être multiplié par huit, en combinant les éliciteurs avec les précurseurs.

- Les métabolites secondaires ainsi fabriqués sont ensuite stockés dans les différents tissus de la racine, en particulier l'épiderme. La libération de ces molécules est réalisée en appliquant aux racines un traitement qui les rend perméables. L'ajout des tensioactifs dans la solution nutritive permet d'accueillir, selon la plante de 20% à 80% des métabolites contenus dans la racine. Benoit Mignard (ingénieur dans la PAT SAS) déclare que la perméabilité favorise également la pénétration des éliciteurs. Actuellement, ils essaient d'appliquer l'élicitation et perméabilisation en même temps afin d'obtenir les meilleurs rendements. La réussite de cette technique dépend

avant tout d'un bon dosage entre les éliciteurs, précurseurs, et agents perméabilisant qu'il faut adapter pour chaque famille de plante.

- La plante continue sa croissance grâce à cette technique, et elle peut être traité à nouveau un mois plus tard, après avoir subi les mêmes procédés d'élicitation et de perméabilité.

De bons résultats ont été obtenus par la société PAT SAS en appliquant cette technique sur plusieurs espèces.

Le cas de la plante *Datura innoxia*, ils ont obtenu 3 fois plus de métabolites secondaires en un an que l'extraction à partir de plantes cultivées en champ, à surface égale. Ses alcaloïdes sont destinés à tonifier le cœur, dilater la pupille pour réaliser des fonds d'œil.

Aussi le cas pour l'espèce *Ruta graveolens*, qui contient des furocoumarines utilisés pour soigner l'eczéma et le psoriasis.

Concernant le Taxol, cette méthode a fournit des quantités bien plus grandes que la récolte traditionnelle. Quelques centaines de serres pourraient suffire ainsi satisfaire la demande annuelle de Taxol dans le monde. (Abadie 2007)

## **Chapitre 2 : Matériel et méthodes**

## **1– Matériel végétal :**

### **1.1- La récolte du matériel végétal :**

Les deux plantes ont été récoltées de deux zones différentes de la wilaya de Constantine. La sauge de l'université Mentouri et le serpolet de la région de Bni Haroune, par contre le *Thymus algeriensis* était collecté d'El kala

### **1.2- La conservation des plantes :**

Elles ont été conservées plus de 1 mois à l'obscurité.

**1.3- Parties utilisées** : feuilles et fleurs pour les deux plantes.

## **2– Méthodes :**

### **2.1- Extraction :**

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenant dans les parties aériennes de la plante en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.

#### **a- Protocole d'extraction :**

Macération de 100g de chaque plante broyée dans de l'éthanol-eau (50 :50), cette macération est répétée 3 fois en renouvelant le solvant chaque 24H. Les macérations hydroalcooliques sont réunies et filtrées; puis évaporées presque à sec sous pression réduite par l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris par de l'eau distillée jusqu'à volume 100 ml et filtré par papier wathman.

#### **b-Séparation liquide-liquide :**

Cette étape se repose sur la spécificité et la polarité des solvants organiques vis-à-vis les molécules polyphénoliques séparées contenant dans le résidu obtenu.

### c- Affrontement par l'acétate d'éthyle :

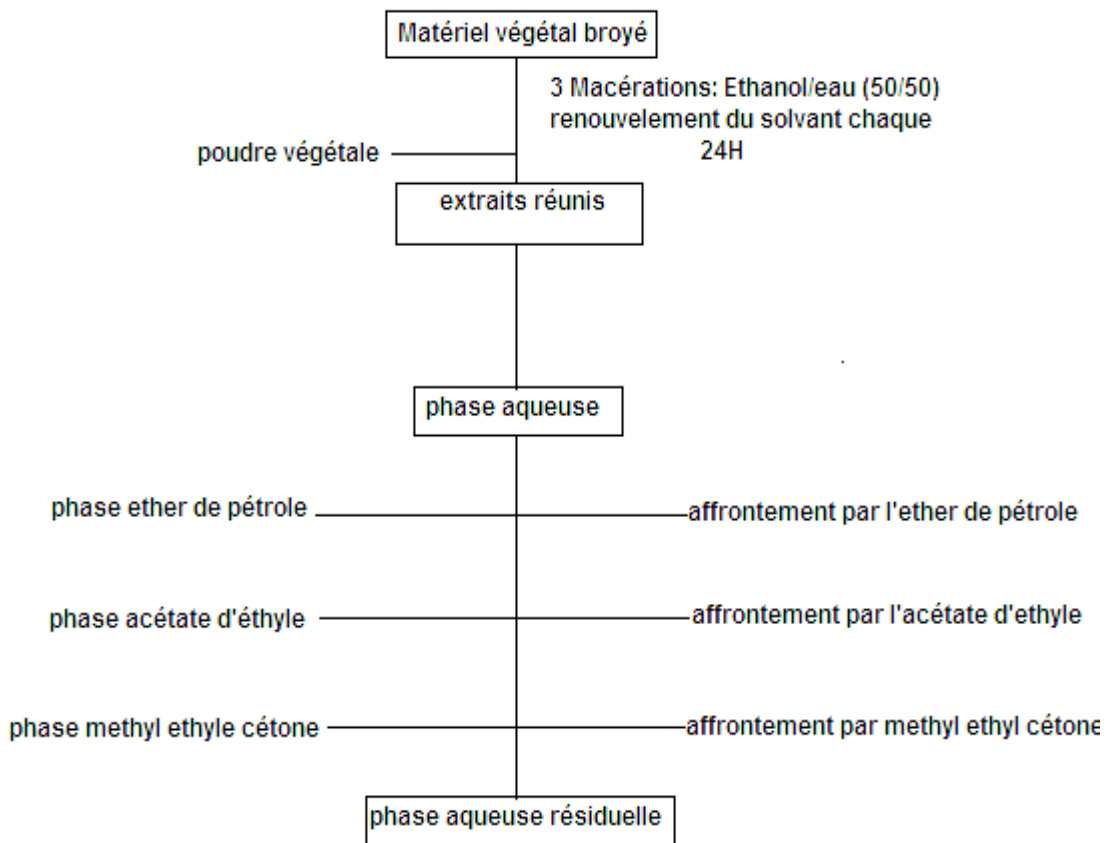
C'est un solvant qui entraîne les mono-o-glycosides et partiellement les di-o-glycosides Le même volume du solvant est ajouté au volume de la phase aqueuse.

### d- Affrontement par le butanol :

Ce solvant va entrainer essentiellement le reste des di-o-glycosides, les tri-o-glycosides et les C-glycosides.

Après évaporation a sec les différentes phases ont été repris par du méthanol a fin d'effectuer les analyses phytochimiques.

Schéma : Protocole d'extraction (Merghem et al 1995)





## 2-2 dosage :

### 2.2-1 Dosage des phénols totaux :

#### a- Principe :

Les métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules végétales, dont leur nature chimique et teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à autre. Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des phénols totaux. L'analyse par le réactif de Folin Ciocalteu est la plus utilisée.

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub> PW<sub>12</sub> O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub> PMO<sub>12</sub> O<sub>40</sub>). Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé. (kassemi 2006)

#### b- Protocole :

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie, suivant le protocole appliqué par Miliauskas *et al* (2004).

1 ml de l'extrait éthanolique de la plante est mélangé avec 5 ml de folin ciocalteu (2M) dilué 10 fois et 4ml de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>) à concentration de 75g/l. L'absorbance est mesurée à 765 nm, après incubation pendant 1 heure à température ambiante. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

$$C = c \cdot v / m$$

C : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique /g d'extrait plante).

c : concentration d'acide gallique (mg/ml).

v : volume de l'extrait (ml).

m : masse de l'extrait pur de plante (g).

### **2.2.2 Dosage des flavonoïdes :**

La quantification du contenu flavonoïque est estimée par la méthode d'AlCl<sub>3</sub>, selon le protocole modifié de: Kumaran et Karunakaran (2005).

1ml de l'extrait de la plante est mélangé avec 1 ml de la solution trichlorure d'aluminium (20mg/ml) et une goutte d'acide acétique. L'absorbance est mesurée à 415 nm, après incubation à température ambiante pendant 40 min. Dans les mêmes conditions, la solution standard de quercétine est préparée avec une concentration égale à 0,1 mg/ml. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois. Le taux des flavonoïdes contenant dans l'extrait de la plante est calculé selon l'équation suivante

$$X = (A.m_0)/(A_0.m)$$

X : la quantité des flavonoïdes (mg équivalent quercétine /g d'extrait plante).

A : l'absorption de l'extrait.

A<sub>0</sub> : l'absorption de la solution quercétine.

m : masse de l'extrait de plante (mg).

m<sub>0</sub> : masse de la quercétine dans la solution.

### **2.3- chromatographie analytique sur couche mince :**

#### **2.3-1 Principe :**

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile (Ekoumou 2003, Debete 2005) qui est en générale un mélange de solvant; adapté au type de séparation recherché (Ferrari 2002), et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permette d'avoir les empreintes le contenu polyphénolique et flavonoïque de l'extrait.

### **2.3.2 Protocole de CCM sur gel de polyamide :**

**Phase stationnaire** : plaque en verre de gel de polyamide SC6 préparées dans le laboratoire.

**Phase mobile** : Toluène/ Ethanol/Méthanol (40/30/30)

**Extraits** : phase acétate, phase Mec et phase eau des trois plantes.

La visualisation des plaques est effectuée sous la lampe à UV, en utilisant deux longueurs d'onde : 365nm et 254nm. (Merghem 1995)

### **2.3.3 Calcul du Rapport frontal :**

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant / la distance parcourue par le solvant. Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances flavonoïque, en tenant compte la nature du solvant utilisé. Sachant que plusieurs facteurs peuvent influencer sur la valeur du Rf ex : la qualité de l'absorbant, la qualité du solvant, la concentration de l'échantillon, la saturation de la cuve... (Treki 2002)

## **2.4- Chromatographie sur colonne :**

### **2.4.1 Principe :**

Cette technique a été réalisée en 1906 par le botaniste Mikhail Tswelt, et jusqu'à nos jours elle est appliquée dans nos laboratoires.

Cette technique repose sur le phénomène d'absorption, dont les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant ; les produits apolaires sont élués les premiers.

### **2.4.2 Protocole :**

On a monté la colonne avec du polyamide SC6, solubilisé dans le toluène et laissé pendant une nuit pour se saturer.

L'éluant utilisé est constitué d'un mélange de deux solvant : toluène et le méthanol commençant par le système 100% toluène jusqu'à 100% méthanol pour les produits qui présentent une grande affinité pour la phase stationnaire (le polyamide).

Les phases : méthyle éthyle cétone et l'acétate d'éthyle des deux plantes *Thymus serpyllum* et *Salvia officinalis* sont fractionnées suivant la même procédure.

Ces phases sont mélangées avec une petite quantité de polyamide et évaporées dans l'évaporateur rotatif, puis laissées sécher jusqu'à l'obtention d'une poudre qui est introduite par la suite dans la colonne.

La progression des substances dans la colonne est suivie par la lumière UV (ultra-violette) qui indique le parcours des molécules en fonction de leur couleur.

Le nombre de fractions collectées est d'une moyenne de 10, et le volume de fraction est de 25ml pour chaque gradient de concentration du mélange utilisé.

Les fractions collectées sont évaporées et récupérées par le méthanol, à fin de poursuivre l'analyse par chromatographie sur couche mince. (Merghem 1995)

Toutes les fractions sont testées sur plaques CCM de polyamide, et seules qui présentent un seul spot sont choisies pour l'analyse spectrale, ainsi les testes biologiques.

## **2.5- La chromatographie sur papier wathman :**

### **2.5-1 Principe :**

Cette technique se repose sur le principe de partage ou d'absorption des produits. Elle est constituée d'une phase stationnaire « le papier » et phase mobile « le solvant » qui entraîne les molécules séparées avec des vitesses et distances différentes, selon leur degré d'affinité vis-à-vis les deux phases.

Elle est généralement appliquée pour la séparation et la purification des produits ayant de petites quantités. On a employé une chromatographie préparative sur papier wathman pour séparer les extraits de la plante *Thymus algeriensis*.

### **2.5-2 Protocole :**

L'extrait est déposé verticalement sur la feuille de papier wattman n°3, qui est placée dans une cuve à l'aide d'un support rempli de solvant. Le système solvant utilisé après plusieurs essais est composé d'acide acétique/eau distillée (50/50).

Après le développement et le séchage du chromatogramme, dont la durée de migration est de 14 heures, les bandes homogènes sont marquées et délimitées dans une chambre noire sous la lumière UV. (Merghem 1995)

Ces bandes sont découpées et plongées dans du méthanol pour solubiliser le produit séparé, qui est destiné pour d'autres analyses, et tests biologiques.

### **2.6- Analyse spectrophotométrique UV-visible :**

#### **2.6.1- Principe :**

La spectrophotométrie est une méthode quantitative ainsi qualitative, sensible, et permet d'analyser les échantillons à faible concentration. Les spectres sont caractéristiques aux molécules, et procurent des informations sur le squelette moléculaire et les différentes substitutions.

Le spectre UV-vis des composés flavonoïques solubilisés dans le méthanol présente deux pics ; qui se situent respectivement entre 320 nm – 380 nm correspond au cycle B et 240 nm – 270 nm correspond au cycle A. Ce spectre est susceptible d'être modifié en présence des réactifs, dont les changements du spectre apportent des indications sur la position des groupements hydroxyles de la molécule.

#### **2.6.2- Protocole de la série spectrale :**

Cette technique d'analyse se base sur les différentes propriétés chélatantes des réactifs utilisés, qui agissent sur des sites bien précis (Akroum 2006).

**1<sup>ère</sup> série :**

Enregistrement du spectre méthanolique de produit analysé.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de 3 gouttes d'une base forte NaOH.

Enregistrement du même spectre d' NaOH après 5 minutes.

**2<sup>ème</sup> série :**

Enregistrement du même spectre méthanolique.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de 5 gouttes d'AlCl<sub>3</sub> à 5%.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de HCl (2N) à la même solution d'AlCl<sub>3</sub>.

**3<sup>ème</sup> série :**

Enregistrement du même spectre méthanolique.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout de deux pincées de NaOAc à la solution méthanolique.

Enregistrement du spectre suite à l'ajout d'une pincée d'acide borique H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub>.

Ces réactifs causent des déplacements bathochromiques et autres hypsochromiques de la bande I et II en comparant le spectre du réactif avec le spectre méthanolique.

Le tableau suivant donne les changements possibles suite à l'ajout des différents réactifs, et leurs interprétations.

**Tableau 5:** Interprétation des déplacements de BI et BII (Merkham 1982)

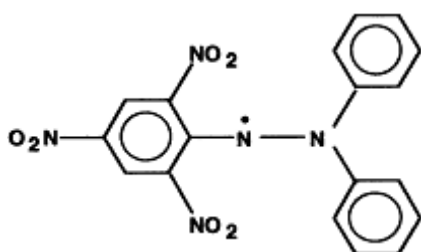
Réactif	Déplacement en nm		Interprétation
	BI	BII	
MeOH	310 – 350	250 – 280	Flavone
	330 – 360	250 – 280	Flavonol 3 – substitué
	350 – 380	250 - 280	Flavonol 3 – OH
NaOH (BI)	+ 45 nm à 60 nm avec stabilité d'intensité.		4' – OH
	+ 50 nm à 60 nm avec diminution d'intensité.		3, 4' di – OH
	Faible déplacement avec diminution d'intensité.		4' – O Me
	Absence de pic entre 320 nm et 335 nm.		7 – OR
	Apparition d'un pic entre BI et BII.		7 – OH
Transformation de Bi en une inflexion.		5 – OH	
AlCl <sub>3</sub> / MeOH	+ 20 nm à 45 nm		5 – OH
	+ 60 nm		3 – OH
AlCl <sub>3</sub> + HCl / AlCl <sub>3</sub>	- 30 nm à 45 nm (hypsochromique)		3', 4' di – OH
	- 10 nm		3', 4' - OH, O Me
	- 20 nm		3', 4', 5' tri – OH
AlCl <sub>3</sub> + HCl / MeOH	+ 17 nm à 55 nm		5 – OH
NaOAc / MeOH	+ 20 nm à 80 nm		7 – OH
	Déplacement très faible		7 – OR ; 7 – OH et 6-OR
	Diminution d'intensité avec le temps		6,7 ; 7, 8 ou 3', 4' di-OH
Spectre se décompose avec le temps		5,6,7 ; 5,7,8 ; 3,3',4' tri-OH	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / MeOH	+ 12 nm à 36 nm		3', 4' di – OH
	+ 5 nm à 10 nm		6,7 ; 7, 8 di – OH

## 2.7- Tests biologiques:

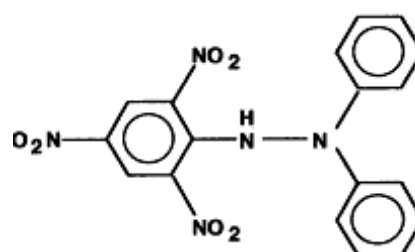
### 2.7.1- Test d'activité antioxydante (DPPH):

#### a- Principe:

L'activité antiradicalaire des composés isolés à partir des trois plantes est évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-pyrril-hydrazyl) sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés).



DPPH (radical libre)



DPPH (radical capté)

#### Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux 2004).

#### b- Protocole : (Loo ; Jain ; Darah 2008)

Préparation de la solution du DPPH : la concentration de cette solution est de 0,037mg/ml préparée à partir de 9,25 mg solubilisé dans 250ml du méthanol absolu.

100 µl d'extrait à concentration de 5mg/ml (choisie après des essais préliminaires), ajouté à 3ml de la solution du DPPH préparée.

Laisser 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre le blanc. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon équation suivante :

$$\boxed{[(A1 - A2) / A1] \times 100}$$

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence d'extrait.



Chaque test est répété trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne des trois essais et l'écart type.

### **2.7-2 Test d'activité antibactérienne :**

D'après la littérature, les composés phénoliques sont doués d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. À partir de là, on a testé nos produits isolés et extraits du thym et de la sauge en présence de différentes souches bactériennes pathogènes, pour mettre en évidence et évaluer cette propriété des différents extraits.

#### **La méthode de diffusion :**

##### **a- Principe :**

Cette méthode permet la mise en évidence de l'effet antibactérien des composés testés sur des bactéries, ainsi que la détermination de la résistance et la sensibilité de ces souches vis-à-vis les composés flavonoïques testés.

Le principe de cette technique est le même que celui du test d'antibiogramme, dont les disques sont chargés d'antibiotiques et déposés à la surface des milieux de cultures solides etensemencés par des espèces bactériennes bien déterminées. L'antibiotique commence à diffuser dès son application sur le milieu de culture, et pour favoriser la croissance bactérienne, ces boîtes sont incubées dans l'étuve pendant 24 heures ou plus selon la bactérie.

L'effet d'antibiotique sur la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une zone appelée « zone inhibition » dépourvue des bactéries. Le même principe est suivi dans notre étude.

##### **b- Protocole :**

###### **b-1 Les souches de test :**

On a choisi de travailler sur 3 espèces pathogènes qui sont ; le *Staphylococcus aureus* (bactérie à gram positif), *Enterobacter sp*, et *Escherichia coli*

(bactéries à gram négatif). Ces espèces sont procurées par le service de Microbiologie du CHU de Constantine.

### **b-2 Repiquage des bactéries :**

Les bactéries sont ensemencées sur des boites de pétri contenant les milieux spécifiques et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

A partir de ces boites, des colonies isolées des différentes bactéries sont incubées pendant 24 heures dans des bouillants nutritifs à 37°C, pour obtenir une croissance bactérienne optimale.

### **b-3 Préparation des disques :**

Des disques de 6 mm de diamètre préparés en papier wathman n°1, et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C. Ces disques stériles sont plongés dans les extraits qui sont des flavonoïdes déjà identifiés.

### **b-4 Application du test :**

Dans des boites de pétri stérile, le milieu de culture Muller Hinton (MH) est coulé. Laisser pendant 15 min pour se solidifier, sur lequel 3µl de bactérie sont déposées et ensemencées à l'aide d'un râteau.

Les disques déjà préparés et chargés de composés polyphénoliques témoins et les composés flavonoïques extraits sont séchés et déposés sur la surface après. Ces boites sont incubées à 37°C pendant 24 heures (Treki 2002).

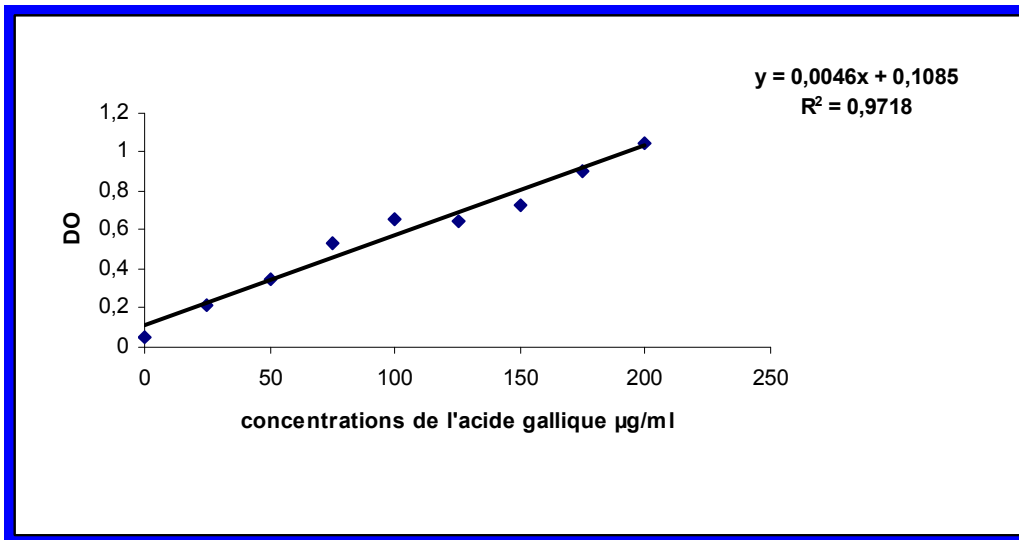
## **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

## 1- Dosage :

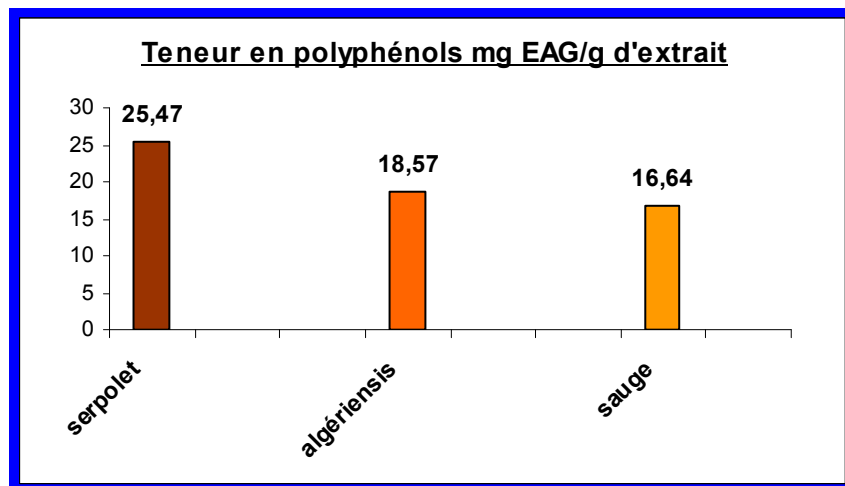
### 1-1 dosage des phénols totaux :

La spectrophotométrie a permis de quantifier le taux des polyphénols dans l'extrait éthanolique des trois plantes médicinales. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations.

La teneur en phénols totaux est rapportée en mg équivalent acide gallique/g d'extrait de plante.



Courbe d'étalonnage des phénols totaux



Histogramme1 : Teneur des phénols totaux en mg EAG/g d'extrait de plante

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on distingue que les espèces de *Thymus* sont riches en phénols totaux par rapport à la sauge qui a présenté la teneur la plus faible. Les teneurs obtenues sont :

25,47± 0,01mg EAG/g d'extrait de *Thymus serpyllum*.

18,57± 0,02 mg EAG/g d'extrait de *Thymus algeriensis*.

16,64± 0,01mg EAG/g d'extrait de *Salvia officinalis*.

En effet, la teneur des phénols totaux n'est pas stable, et se diffère d'une plante à une autre et entre les espèces du même genre, ce qui est le cas dans notre étude concernant les deux espèces du thym. Miliauskas *et al* (2004) ont trouvé des teneurs différentes pour 4 espèces de *Salvia*, dont les valeurs sont comprises entre 9,7±0,4 et 24±1,1mg EAG/g d'extrait.

Le même cas est signalé par Casio *et al* (2006), lors d'une étude effectuée sur plusieurs plantes de la famille des lamiacées. Les espèces du Thym comprennent de 12,1±1,1mg à 14,1±1,2 mg EAG/g d'extrait en polyphénols totaux, par contre les espèces de la sauge ont marquées un taux plus élevé.

En générale, on remarque que nos valeurs sont proches à celles de la littérature parce que toutes les plantes appartiennent à la même famille (lamiacée). Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

1- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. (Ebrahimi *et al* 2008).

2- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (Miliauskas *et al* 2004).

3- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (Lee *et al* 2003).

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante

favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (Tim ; Andrew 2005 ; Piquemal 2008).

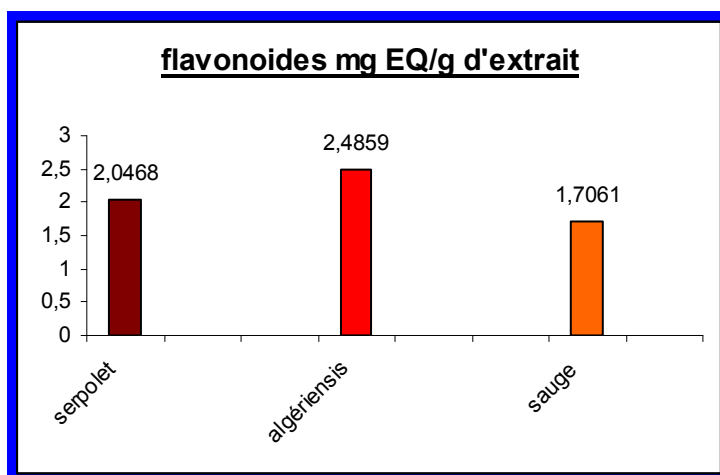
### 1-2- dosage des flavonoïdes :

Les teneurs en flavonoïdes contenants dans les extraits éthanoliques des trois plantes ont été estimées par la méthode d'AlCl<sub>3</sub> selon la formule suivante :

$$X = (A \cdot m_0) / (A_0 \cdot m)$$

**Le tableau 6** : Données expérimentales obtenues :

	<b>A</b>	<b>A<sub>0</sub></b>	<b>m (g)</b>	<b>M<sub>0</sub> (mg)</b>
<b><i>T. serpyllum</i></b>	0,522±0,002	0,276	0,0924	0,1
<b><i>T.algeriensis</i></b>	0,564±0,005	0,276	0,0822	0,1
<b><i>S.officinalis</i></b>	0,607±0,001	0,276	0,1289	0,1



**Histogramme 2** : Teneur en flavonoïdes en mg EQ/g d'extrait de plante.

Les résultats indiquent que le *Thymus algeriensis* présente la teneur la plus élevée en flavonoides qui est de 2,48± 0,005 mg EQ/g d'extrait en le comparant avec le serpolet et la sauge dont leurs extraits contiennent respectivement 2,04± 0,002 et 1,7± 0,001 mg EQ/g d'extrait.

Ces analyses sont similaires en moyenne à celles trouvées par Miliauskas et ses collaborateurs (2004) dont les valeurs sont comprises entre 1,4 - 5,7 mg EQ/g d'extrait pour les espèces de la sauge, et entre 0,3 - 13,8 mg EQ/g d'extrait pour le reste des plantes médicinales.

Une basse corrélation est observée entre le contenu polyphénolique et flavonoïde ( $r=0,1$ ). Le cas d'extrait de *T.sepyllum* est riche en phénols totaux, mais il ne présente pas la teneur la plus élevée en flavonoïdes. Ces mêmes résultats sont obtenus par Meda *et al* (2005), lors d'une étude effectuée sur plusieurs espèces de miel, ainsi que les résultats de milliauskas *et al* (2004). Ce phénomène peut être dû aux méthodes analytiques utilisées.

## **2- Diagnostique par CCM analytique :**

Cette technique informe sur le contenu en polyphénols et en particulier en flavonoïdes des phases analysées, et procure les informations nécessaires pour la poursuite des autres analyses préparatives.

En se basant sur les résultats analytiques, les phases les plus riches en flavonoïdes sont choisies pour effectuer les étapes de l'isolement et la purification. Les spots sont visualisés sous deux longueurs d'onde 254nm puis 365nm, cette dernière a donné des fluorescences plus claires et distinctes que la première longueur d'onde.

Le tableau suivant illustre les différentes tâches obtenues dans le chromatogramme avec leurs fluorescences et Rf (rapport frontal).

**1<sup>ère</sup> plante *Thymus algeriensis* :**

**Tableau 7 :** fluorescence et Rf des tâches :

Phase Acétate		Phase Mec		Phase Eau	
Fluorescence	Rf	fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf
Jaune	0,12	J orangé	0,01	Violet	0,03
Bleu light	0,25	Bleu light	0,11	Bleu light	0,50
J orangé	0,31	Brun	0,25		
Violet	0,36	Violet	0,38		
Brun	0,51	Brun	0,49		
Bleu light	0,69	Bleu	0,73		
Brun	0,74				
Violet	0,90	Violet	0,95	Violet	0,95

**2<sup>ème</sup> plante *Thymus serpyllum* :**

**Tableau 8 :** fluorescence et Rf des tâches :

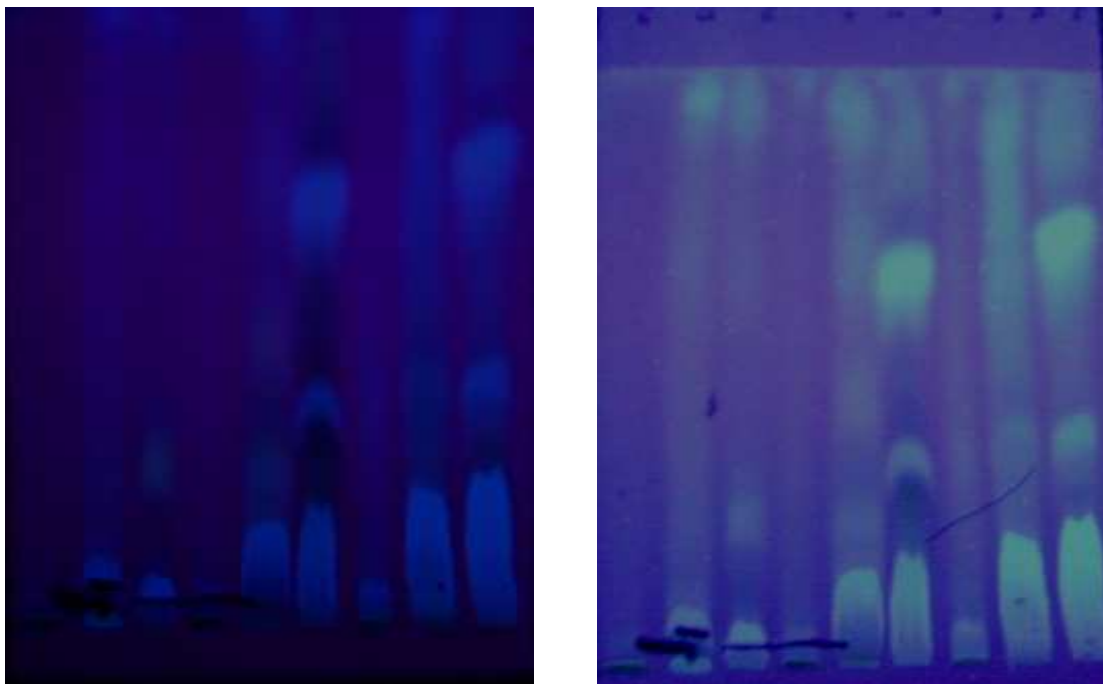
Phase Acétate		Phase Mec		Phase Eau	
Fluorescence	Rf	fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf
J pâle	dépôt	J pâle	dépôt	Violet	0,02
Violet	0,03	Violet ++	0,02	Violet +	0,47
Bleu light	0,04	Violet	0,06	bleu	0,93
J brun	0,12	brun	0,12		
Orangé	0,22	Brun	0,19		
Bleu light	0,29	Jaune	0,24		
Brun	0,34	Brun	0,31		
J brun	0,39	Orangé clair	0,44		
Bleu light	0,49				
Brun	0,61				
Jaune	0,73	Violet	0,71		
Violet	0,87	Bleu	0,94		



**3<sup>ème</sup> plante *Salvia officinalis* :**

**Tableau 9** : fluorescence et Rf des tâches ::

Phase Acétate		Phase Mec		Phase Eau	
Fluorescence	Rf	fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf
Jaune pâle	Dépôt	blanc	depôt	Brun	depôt
Violet	0,01	Bleu light	0,04	Violet	0,04
Bleu light	0,06				
Brun	0,13	Violet	0,12		
J fluorescent	0,24	Jaune brun	0,22		
Brun	0,39				
Violet	0,68	Violet	0,61		
Bleu	0,92	Bleu	0,94		



**Figure** : Plaque de polyamide à 254 nm et 365 nm.

Les phases sont ordonnées de droite à gauche : Phase acétate, Mec et eau de *T.serpyllum*, *T.algeriensis*, *S.officinalis*.

Il est connu qu'il existe une relation entre la fluorescence et la nature ainsi que les substitutions du composé flavonoïque chromatographié. Ce lien est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau 10** : Détermination de la structure des flavonoides (Treki A 2002)

Couleur du spot	Type de flavonoides
Brun	3-OH absent ou 3-substitué
Violet	Flavone 5-OH et 4-OH Flavone 3-OR et 5-OH ; 4-OH Flavone 6 ou 8 OH Chalcone, isoflavone, dihydroflavonol, flavanones.
Bleu clair	Flavone sans 5-OH libre Flavonol sans 5-OH libre avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonol 3-OH libre avec ou sans 5-OH libre.
Jaune vert brillant	5-OH libre ou 5-OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonol avec 3-OH libre Aurone, chalcone, flavanone.
Jaune pâle	dihydroflavonol

Les plaques obtenues présentent une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavonoïques, les spots sont bien distincts et montrent une richesse considérable des plantes en substances flavonoïques. Partant de leurs fluorescences et Rf, les échantillons sont riches en flavones en 1<sup>er</sup> lieu qui correspondent aux tâches violettes, brunes, et bleues.

En 2<sup>ème</sup> lieu en flavonols qui présentent la couleur jaune et ses dérivés, jaune pâle, jaune fluorescent, et jaune orangé. Ceci est conforme avec les travaux de Lima et ses collaborateurs (2007), ainsi que Kosar et son équipe (2005). Ces derniers mentionnent que les plantes appartenant à la famille des lamiacées sont riches en flavonoides ; de type flavones et flavonols

Les Rf différents sont dus à la polarité des composés vis-à-vis le système solvant de migration, et la phase stationnaire. Celle-ci s'installe suite à une différence au niveau du squelette moléculaire, dont les molécules méthylées ont un Rf plus élevé que celles glycosylées.

Ce qu'on a pu tirer aussi de ces résultats, que les deux phases acétate d'éthyle et méthyle éthyle cétone (Mec) présentent de grandes similitudes en composés flavonoïques, ce qui nous a permis de les mélanger à fin d'avoir plus de quantité et de chance à séparer ces composés, en utilisant la séparation en colonne ouverte pour la sauge et le serpolet, et la CCM préparative sur papier wathman pour le *Thymus algeriensis*.

### **3- Résultats de séparation par colonne ouverte :**

La séparation par colonne est une technique appliquée pour les échantillons dont leur quantité peut atteindre plusieurs grammes.

Toutes les fractions collectées sont évaporées et analysées en CCM de polyamide, celles qui contiennent plus d'une seule molécule ne sont pas prises en considération pour la poursuite d'étude, ainsi que les mono tâches dont la quantité n'est pas suffisante.

Les tableaux suivant indiquent le nombre de fractions collectées, et leur système d'élution.

#### **Thymus serpyllum :**

**Tableau11:** Le système d'élution et le nombre de fraction collectée du serpolet.

Le système d'élution Toluène %- méthanol%	Le nombre de fraction	Le système d'élution Toluène %- méthanol%	Le nombre de fraction
100 – 0	5	45 – 55	8
98 – 2	15	40 – 60	8
95 – 5	10	35 – 65	8
90 – 10	7	30 – 70	8
85 – 15	10	25 – 75	8
80 – 20	6	20 – 80	7
70 – 30	7	15 – 85	6
65 – 35	11	10 – 90	7
55 – 45	8	5 – 95	8
50 – 50	9	0 – 100	7

### **Salvia officinalis :**

**Tableau 12 :** système d'élution et le nombre de fraction collectée de la sauge.

Le système d'élution Toluène %- méthanol%	Le nombre de fraction	Le système d'élution Toluène %- méthanol%	Le nombre de fraction
100 – 0	6	70 – 30	4
95 – 5	8	60 – 40	2
90 – 10	5	50 – 50	3
85 – 15	2	30 – 70	3
80 – 20	6	20 – 80	5
75 – 25	5	0 – 100	6

L'analyse par CCM a permis de rassembler les fractions qui ont le même aspect (la couleur, le Rf et le nombre des spots). La fraction identifiée est choisie en se basant sur 3 caractères ; elle contient une seule molécule (CCM analytique), donne un bon spectre méthanolique, et présente en quantité suffisante.

Les fractions étudiées et séparées à partir de *Thymus serpyllum* sont :

Fraction 1 : 0% toluène - 100% méthanol (1)

Fraction 1 : 30% toluène – 70% méthanol (2)

Fraction 1 : 40% toluène – 60% méthanol (3)

Fraction 1 : 70% toluène – 30% méthanol (4)

Fraction 2 : 85% toluène – 15% méthanol (5)

Les fractions étudiées et séparées à partir de *Salvia officinalis* sont :

Fraction 4 : 80% toluène – 20% méthanol (6)

Fraction 1 : 50% toluène – 50% méthanol (7)

Fraction 1 : 30% toluène – 70% méthanol (8)

### **CCM analytique des fractions étudiées :**

L'analyse de ces fractions est effectuée sur des plaques préparées en polyamide DC6, et visualisées sous la lampe UV à deux longueurs d'ondes différentes 364nm et 254nm. Les chromatogrammes obtenus ont permis de calculer les Rf et distinguer les couleurs de ces fractions sous lampe UV. Les informations

acquises vont être utilisées pour l'identification des molécules, dont le présent tableau résume ces données.

**Tableau récapitulatif 13** : fraction, fluorescence et rapport frontal des fractions isolées à partir du serpolet et la sauge.

plante	Fraction	Couleur	Rf (cm)
<b><i>Thymus serpyllum</i></b>	(1)	Bleu light	0,02
	(2)	Jaune brun	0,12
	(3)	Blanc fluorescent	0,32
	(4)	Violet clair	0,80
	(5)	Violet fluorescent	0,71
<b><i>Salvia officinalis</i></b>	(6)	violet	0,93
	(7)	violet	0,51
	(8)	Violet	0,15

Les résultats de la CCM confirment que ces composés isolés par colonne sont des flavonoïdes, de type flavonols et flavones.

#### **4- Résultats de séparation par papier wathman :**

La séparation des composés contenant dans l'extrait de *Thymus algeriensis* est effectuée par un autre type de chromatographie (sur papier wathman), très connu et appliqué surtout quand il s'agit de petite quantité. Le choix de cette technique était dans le but d'effectuer et de maîtriser plusieurs et différentes méthodes chromatographiques de séparation.

Cette technique a permis d'isoler les molécules majoritaires de l'extrait, dont ces molécules sont dépourvues des impuretés qui peuvent donner naissance aux ambiguïtés lors de l'identification.

En comparant les deux techniques de séparation utilisées, on trouve que la chromatographie sur papier wathman est une technique très fiable, moins coûteuse, peut être réalisée dans une période très courte, et les composés isolés possédant moins d'impuretés. Au contraire, la séparation par colonne consomme beaucoup de

solvants, peut durer plus d'un mois, et les composés isolés doivent subir une filtration pour éliminer ou minimiser les impuretés.

Les deux phases acétate d'éthyle et Mec de *Thymus algeriensis* ont subi une séparation par papier wathman n°3, chaque feuille chromatographique de 39,5 cm de longueur contient une phase déposée verticalement sur le long de la feuille. Après développement du chromatogramme, on a obtenu 8 bandes de différentes couleurs et Rf pour les deux phases.

**Tableau récapitulatif 14 :** Fractions isolées par chromatographie sur papier wattman.

L'extrait	Fraction	Couleur	Rf (cm)
Phase Acétate d'éthyle	F1	Jaune fluorescent	0,52
	F2	Violet ++	0,62
	F3	violet	0,67
	F4	Bleu violet	0,43
Phase Méthyle éthyle cétone (Mec)	F1	Éliminée	
	F2	Violet noir	0,64
	F3	Violet ++	0,75
	F4	Bleu violet	0,87

Les fractions F2 des deux phases sont rassemblées après avoir les identifier, il semblait qu'il s'agit de la même molécule.

Cette plante est riche en flavonoïdes de type flavonol et flavone, ce qui est le cas pour les deux plantes *S.officinalis* et *T.serpyllum*. Cela est expliqué par le fait que ces trois plantes appartiennent à la même famille connue riche en composés flavonoïques.

Le spectre méthanolique de la F1 isolée à partir de la phase Mec ne correspond pas à un composé flavonoïque, cela peut être dû aux impuretés, c'est pourquoi cette fraction était éliminée.

Les autres fractions sont identifiées par spectrophotométrie UV-visible, et testées en présence d'un radical libre DPPH et différentes souches bactériennes pathogènes.

## **5- Identification des composés isolés à partir des plantes :**

Cette identification structurale est effectuée par le biais de différents réactifs, en se basant sur les propriétés physico-chimiques des composés isolés.

L'analyse comporte trois séries différentes, dont les spectres de chaque série sont superposés à fin de bien visualiser les déplacements dus aux réactions avec les différents réactifs utilisés.

**Le spectre méthanol :** informe sur

Le type de flavonoïde possible selon les valeurs des pics correspondent aux deux bandes, ainsi la fluorescence sous UV.

**La première série** informe sur

La présence d'un 4' OH sur le cycle B par un déplacement bathochromique de 45nm à 60nm de la bande I.

L'apparition d'un nouvel pic entre la bande I et II informe qu'il y'a un OH libre sur la position 7 du cycle A.

**La deuxième série :** la comparaison des spectres entre eux informe sur

La présence d'un OH libre en 5 et en 3 sur les cycles A et C respectivement.

La présence d'un ortho di-OH sur le cycle B en position 3' et 4'.

**La troisième série :** elle confirme

La présence ou l'absence d'un OH libre en position 7 sur le cycle A.

La présence ou l'absence de l'ortho di-OH sur le cycle B en position 3' et 4'.

Prenant comme exemple détaillé la fraction F2 de la phase acétate d'éthyle, isolé à partir de *Thymus algeriensis*.

### Clé des images :

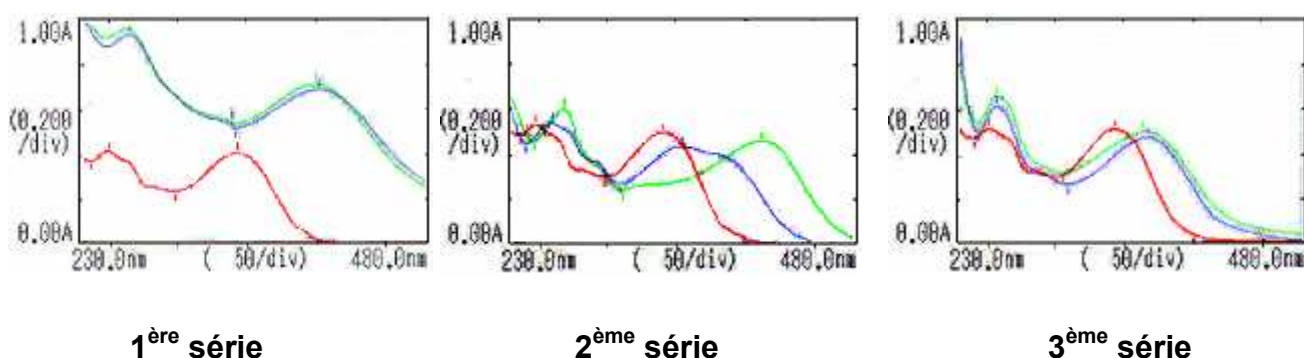
**Rouge** : spectre méthanolique dans toutes les séries.

**Vert** : représente le 2<sup>ème</sup> réactif dans chaque série (NaOH pour la 1<sup>ère</sup> série, AlCl<sub>3</sub> pour la 2<sup>ème</sup> série, et NaOAc pour la 3<sup>ème</sup> série.)

**Bleu** : représente le 3<sup>ème</sup> réactif dans chaque série (NaOH après 5min pour la 1<sup>ère</sup> série, HCl/AlCl<sub>3</sub> pour la 2<sup>ème</sup> série, et H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOAc pour la 3<sup>ème</sup> série.)

### 5-1- Thymus algeriensis :

#### F2A : fraction 2 de la phase Acétate :



**Tableau 15** : valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule F2A	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	344	254	
	S. NaOH	399, 340sh	267	4'-OH
	S. NaOH (5min)	401, 340sh	268	7- OH
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	344	254	
	S. AlCl <sub>3</sub>	415	273	3-OH, 5-OH
	S. HCl/ AlCl <sub>3</sub>	358	264	3'-4' di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	344	254	
	S. NaOAc	364	260	Confirmation 7-OH
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	368	260,5	Confirmation 3'-4'diOH



### Interprétation des données spectrales F2A:

BI : 344, BII : 254, la fluorescence : Jaune violet foncé, Rf = 0,62

D'après ces données, on peut supposer qu'il s'agit d'un flavonol.

#### NaOH/ MeOH :

Effet bathochromique de la BI (55nm) et stabilité du spectre  $\longrightarrow$  4' - OH.

Apparition d'un nouvel pic entre les deux bandes I et II  $\longrightarrow$  7 - OH

#### AlCl<sub>3</sub> / MeOH :

Effet bathochromique de la BI (70nm)  $\longrightarrow$  3 - OH.

#### HCl-AlCl<sub>3</sub> / MeOH :

Effet hypsochromique de la BI (- 57nm)  $\longrightarrow$  ortho di-OH sur le cycle B 3' et 4' di-OH.

#### HCl-AlCl<sub>3</sub>/MeOH :

Effet bathochromique de la BI (13 nm)  $\longrightarrow$  5 - OH.

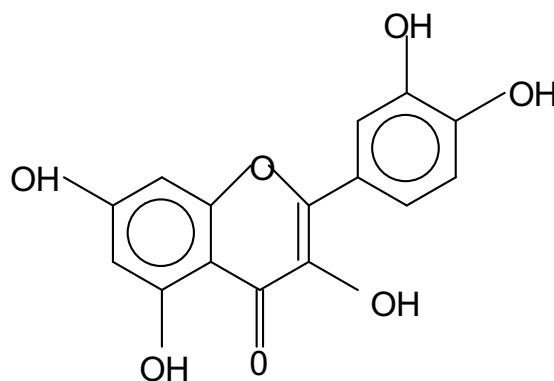
#### NaOAc / MeOH :

Effet bathochromique de la BII (5 nm)  $\longrightarrow$  confirmation de 7 - OH.

#### H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOAc / MeOH :

Effet bathochromique de la BI (24nm)  $\longrightarrow$  confirmation d'ortho di-OH du cycle B 3' et 4' di-OH.

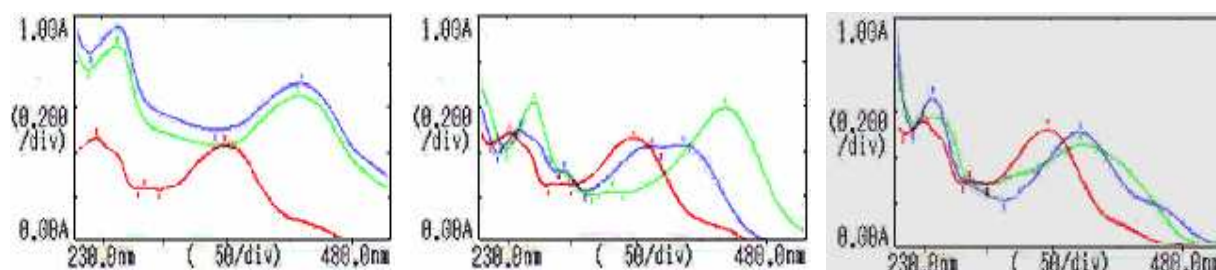
Après interprétation des données spectacles selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Flavonol

Quercétine : heptahydroxy 3, 5, 7, 3',4' flavonol.

## F1A : fraction 1<sup>e</sup> de la phase Acétate



**1<sup>ère</sup> série**

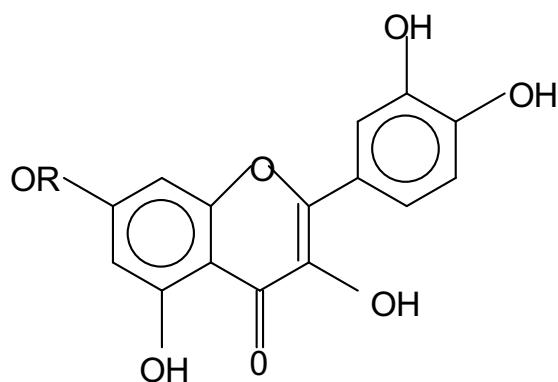
**2<sup>ème</sup> série**

**3<sup>ème</sup> série**

**Tableau 16 :** valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule F1A	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	349	254, 290sh	
	S. NaOH	404	269	4'-OH
	S.NaOH (5min)	404	269	7-OR
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	349	254, 290sh	
	S. AlCl <sub>3</sub>	419, 333sh	272	3-OH, 5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	386, 362sh	262, 296sh	3'-4' di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. methanol	349	254, 290sh	
	S. NaOAc	374	258,5	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	373	260,5	Confiramtion 3'-4'di OH

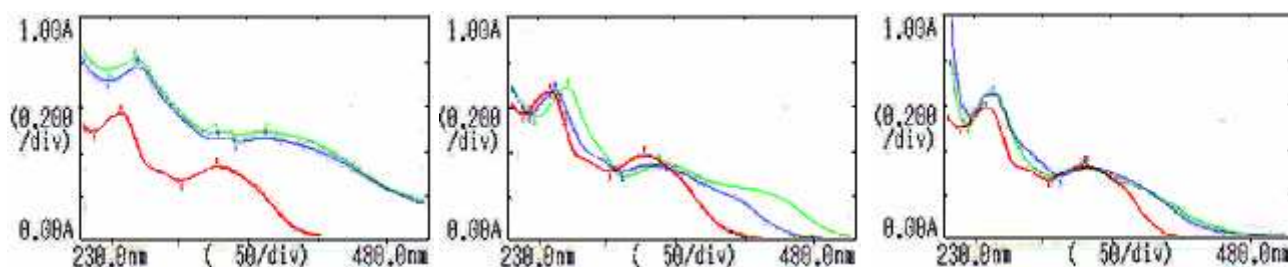
Après l'interprétation des données spectacles selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Flavonol

Quercétine 7- OR : tétrahydroxy 3, 5, 3',4' flavonol

**F3A : fraction 3 de la phase Acétate :**



**1<sup>ère</sup> série**

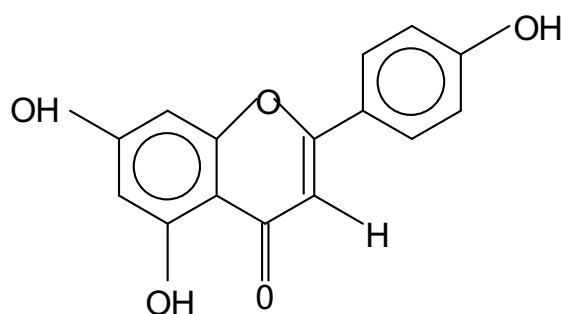
**2<sup>ème</sup> série**

**3<sup>ème</sup> série**

**Tableau 17 :** valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule F3A	Réactif	BI	BII	Observations
<b><u>1<sup>ère</sup> série</u></b>	S. méthanol	329	261	
	S. NaOH	365, 331sh	272	4'- OH
	S.NaOH (5min)	364, 331sh	273	7- OH
<b><u>2<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	330	261	
	S. AlCl <sub>3</sub>	341	273	5- OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	335	263	Absence 3'-4' di-OH
<b><u>3<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	330	261	
	S. NaOAc	328	266	Confirmation 7-OH
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	332	264	Absence 3'-4' di-OH

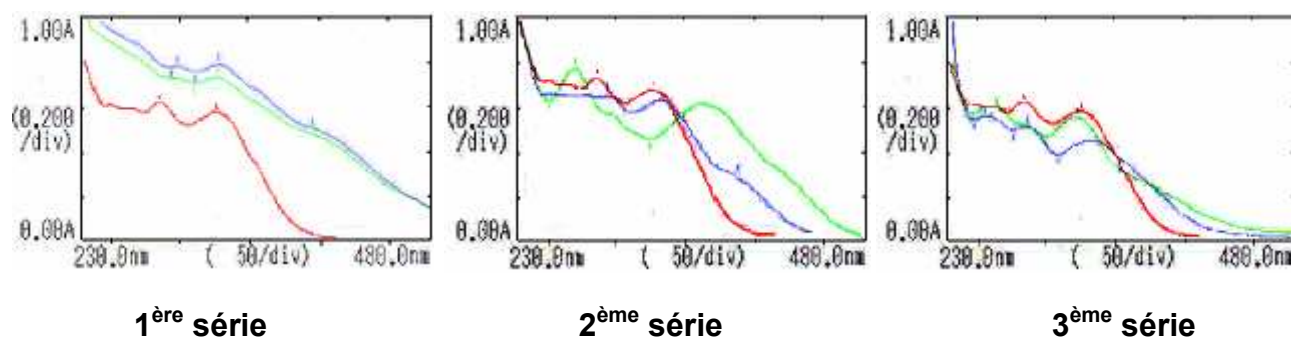
Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



**Flavone :**

**Apigenine : trihydroxy 5, 7, 4' flavone.**

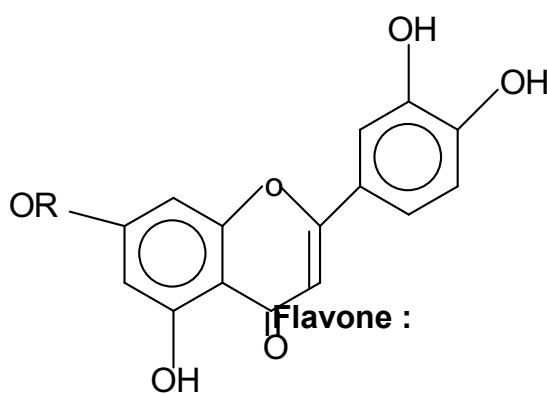
**F4A : fraction 4 de la phase Acétate :**



**Tableau 18 :** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

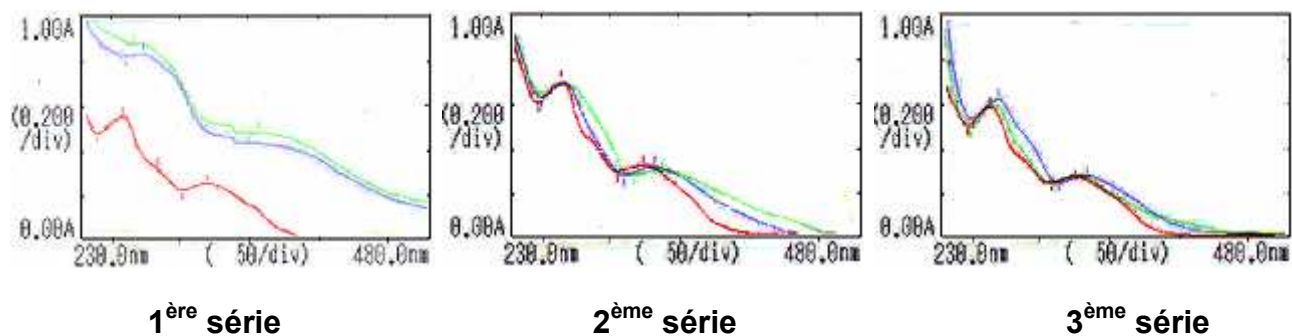
Molécule F4A	Réactif	BI	BII	Observations
<b><u>1ère série</u></b>	S. méthanol	329	288	
	S. NaOH	400	330	4'-OH
	S.NaOH (5min)	329	298	7- OR
<b><u>2ème série</u></b>	S. méthanol	329	288	
	S. AlCl <sub>3</sub>	365	272	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	334	290	3'-4'di-OH
<b><u>3ème série</u></b>	S. methanol	329	289	
	S. NaOAc	324	267, 258sh	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	334	288, 258sh	Confirmation 3'-4'di-OH

Après l'interprétation des données spectacles selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Flavone  
Lutéoline 7-OR : trihydroxy 5, 3', 4' flavone.

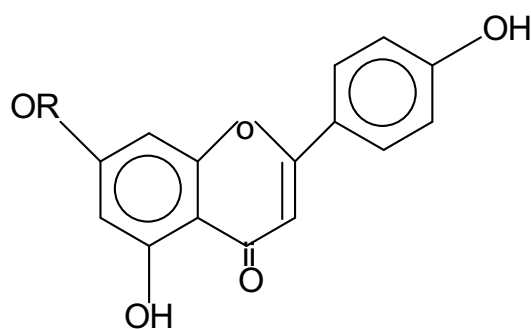
**F3 M : fraction 3 de la phase Mec :**



**Tableau19 :** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

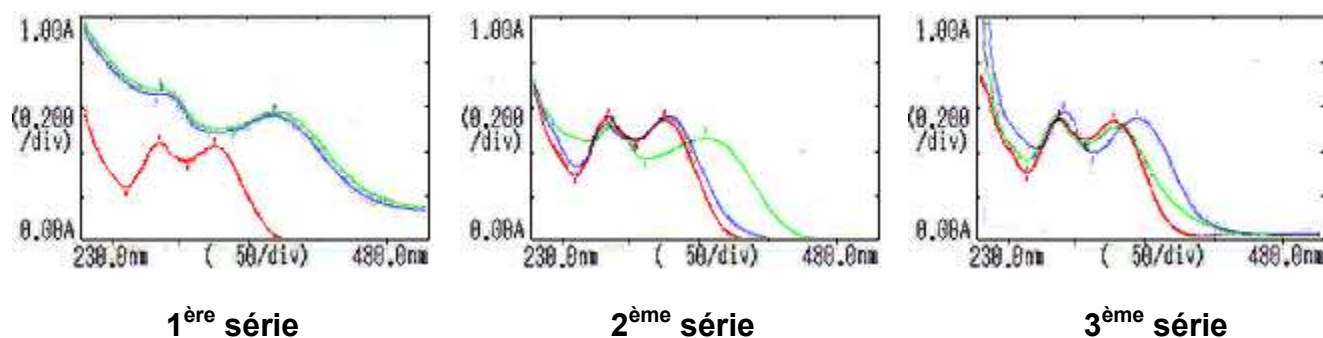
Molécule F3 M	Réactif	BI	BII	Observations
<b><u>1<sup>ère</sup> série</u></b>	S. méthanol	324	264	
	S. NaOH	358	275	4'-OH
	S. NaOH (5min)	356	276	7-OR
<b><u>2<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	324	264	
	S. AlCl <sub>3</sub>	339	267	5-OH
	S. HCl/ AlCl <sub>3</sub>	332	266	Absence 3'-4' di-OH
<b><u>3<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	325	264	
	S. NaOAc	325	268	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	327	269	Absence 3'-4' di-OH

Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose les deux structures suivantes :



Flavone :  
Apigénine 7-OR : 5, 4'dihydroxyflavone

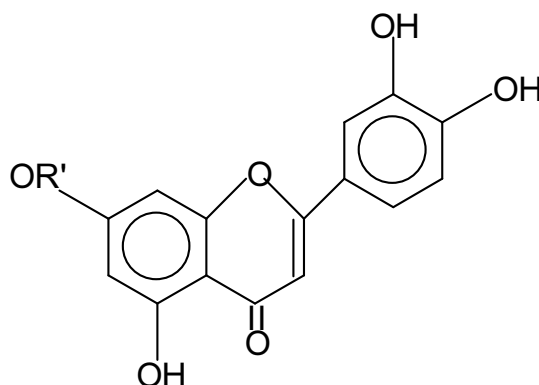
**F4 M : fraction 4 de la phase Mec :**



**Tableau 20 :** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule F4 M	Réactif	BI	BII	Observations
<b><u>1ère série</u></b>	S. méthanol	327	289	
	S. NaOH	373	290	4'-OH
	S. NaOH (5min)	371	291	7-OR
<b><u>2ème série</u></b>	S. méthanol	328	289	
	S. AlCl <sub>3</sub>	359	293	5- OH
	S. HCl/ AlCl <sub>3</sub>	332	289	3'-4' di-OH
<b><u>3ème série</u></b>	S. methanol	328	289	
	S. NaOAc	330	288	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	344	291	Confirmation 3'-4' di-OH

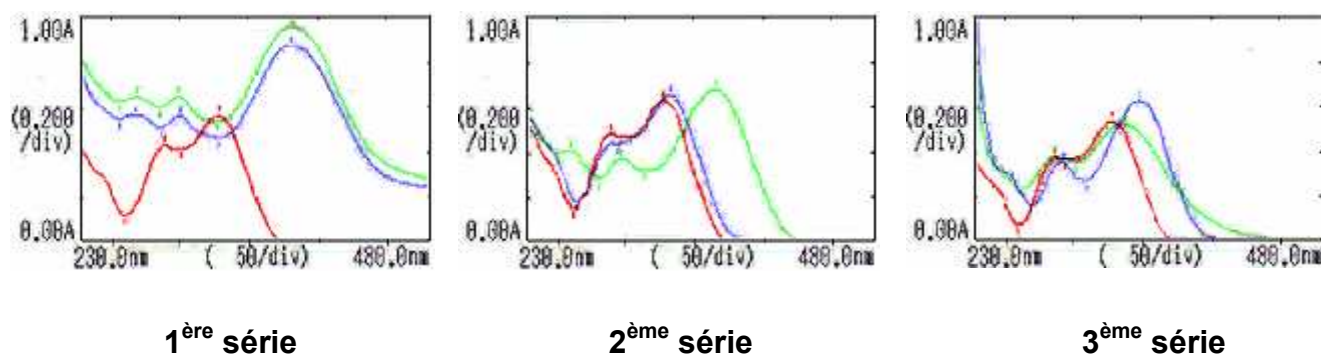
Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



**Flavone :**  
**Lutéoline 7-OR' : trihydroxy 5, 3', 4' flavone.**

## 5-2 Thymus serpyllum :

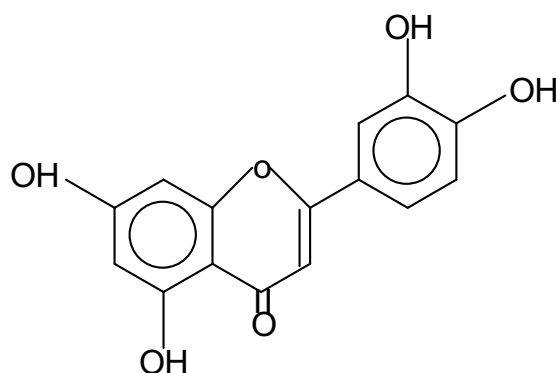
### Fraction 1 : 0% toluène - 100% méthanol (1)



**Tableau 21:** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule (1)	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	330	291	
	S. NaOH	382, 302	272	4'-OH
	S.NaOH (5min)	381, 301	270	7-OH
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	330	291	
	S. AlCl <sub>3</sub>	367, 299	263	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	335	292	3'-4'di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	330	290	
	S. NaOAc	341	297	Confirmation 7-OH
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	350	295	Confirmation 3'-4'di-OH

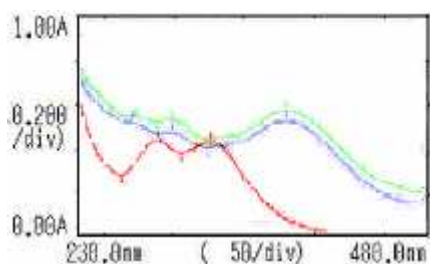
Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



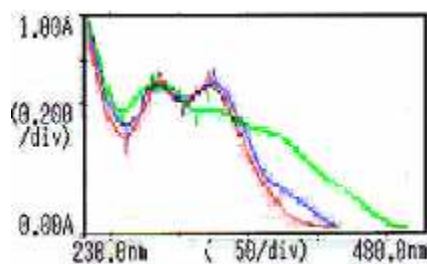
Flavone :

Lutéoline : tetrahydroxy 5, 7, 3', 4' flavone

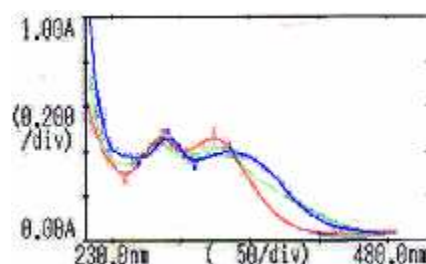
**Fraction 1 : 30% toluène – 70% méthanol (2)**



**1<sup>ère</sup> série**



**2<sup>ème</sup> série**

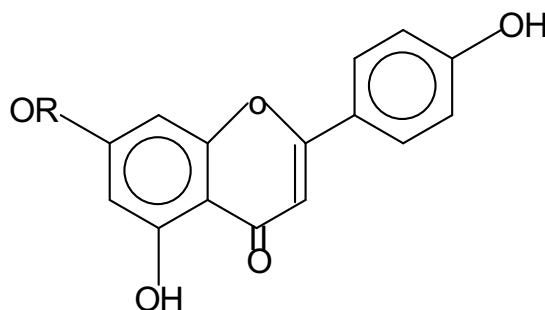


**3<sup>ème</sup> série**

**Tableau 22** : Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule (2)	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	325	288	
	S. NaOH	379	298	4'-OH
	S.NaOH (5min)	379	297	7-OR
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	325	288	
	S. AlCl <sub>3</sub>	328	291, 280sh	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	330	287	Absence 3'-4'di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	325	289	
	S. NaOAc	326	286	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	328	291	Absence 3'-4'di-OH

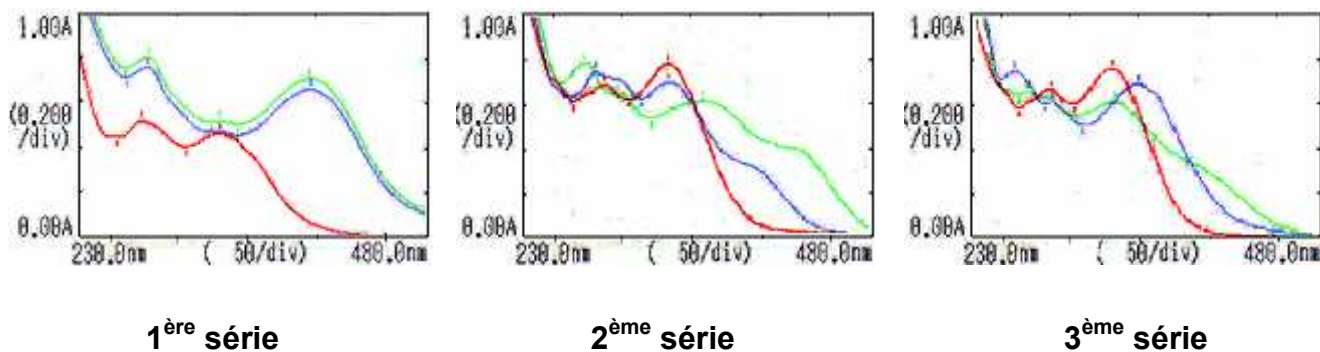
Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



**Flavone :**  
**Apigenine 7-OR : dihydroxy 5, 4' flavone**



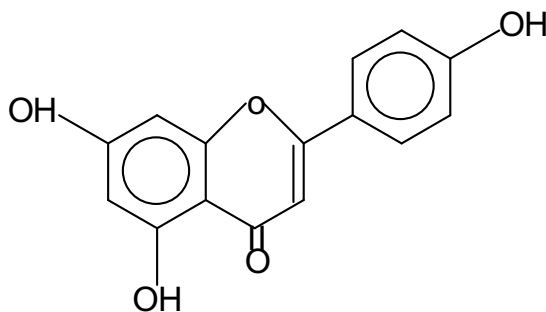
**Fraction 1 : 40% toluène – 60% méthanol (3)**



**Tableau 23 :** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

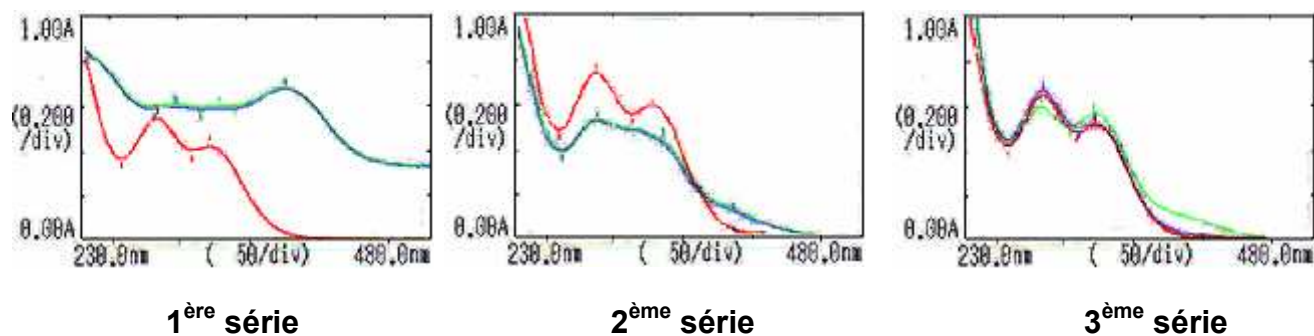
Molécule (3)	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	331	275	
	S. NaOH	396, 331sh	281	4'-OH
	S.NaOH (5min)	397, 331sh	280	7-OH
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	330	277	
	S. AlCl <sub>3</sub>	340	277	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	340	280	Absence 3'-4'di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	330	276	
	S. NaOAc	375	283	Confirmation 7-OH
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	335	273	Absence 3'-4' di-OH

Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Flavone  
Apigenine : trihydroxy 5, 7, 4' flavone

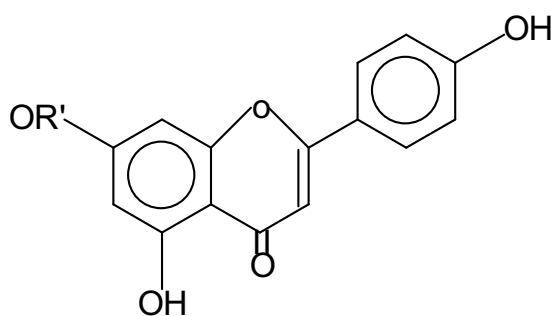
**Fraction 1 : 70% toluène – 30% méthanol (4)**



**Tableau 24** : Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

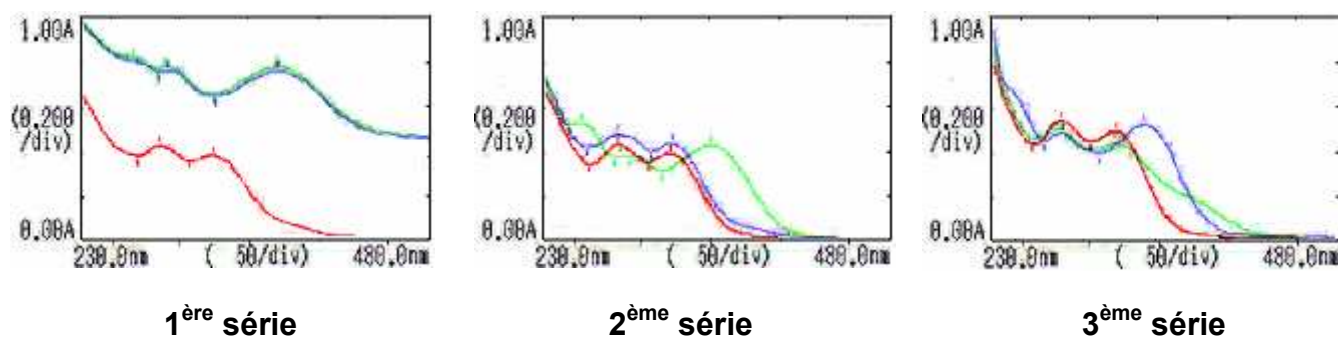
Molécule (4)	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	324	285	
	S. NaOH	377	298	4'-OH
	S.NaOH (5min)	377	299	7-OR
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	324	286	
	S. AlCl <sub>3</sub>	230	287	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	331	286	Absence 3'-4'di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	324	286	
	S. NaOAc	323	284	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	324	286	Absence 3'-4' di-OH

Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Flavone  
Apigenine 7-OR' : dihydroxy 5, 4' flavone.

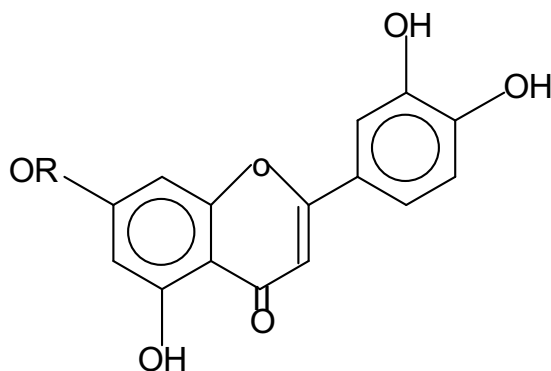
**Fraction 2 : 85% toluène – 15% méthanol (5):**



**Tableau 25 :** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule (5)	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	326	289	
	S. NaOH	374	294	4'-OH
	S.NaOH (5min)	373	295	7-OR
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	326	287	
	S. AlCl <sub>3</sub>	354, 300sh	289, 261sh	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	327	289	3'-4'di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	326	287	
	S. NaOAc	326	289	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	346	289	Confirmation 3'-4' di-OH

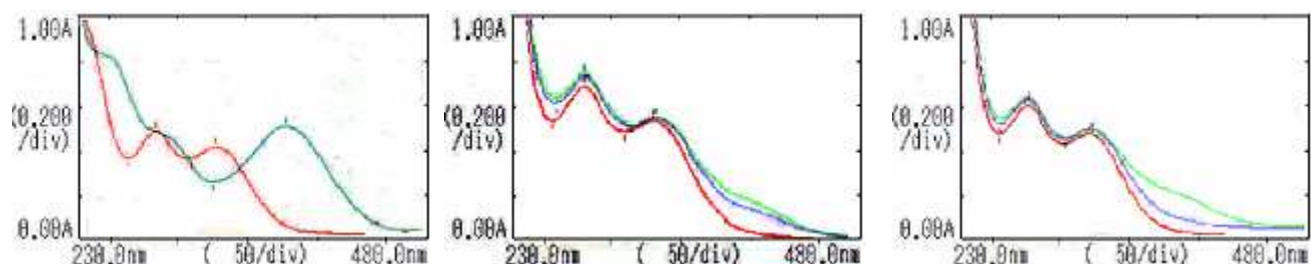
Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



**Flavone :**  
**Lutéoline 7-OR : trihydroxy 5, 3', 4' flavone.**

### 5-3 Salvia officinalis :

#### Fraction 4 : 80% toluène – 20% méthanol (6) :



**1<sup>ère</sup> série**

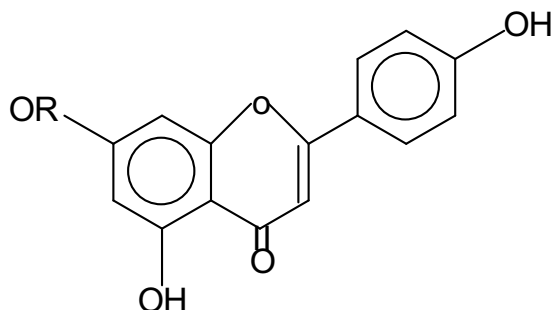
**2<sup>ème</sup> série**

**3<sup>ème</sup> série**

**Tableau 26 :** Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule (6)	Réactif	BI	BII	Observations
<b>1<sup>ère</sup> série</b>	S. méthanol	325	281	
	S. NaOH	377	294	4'-OH
	S.NaOH (5min)	377	294	7-OR
<b>2<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	325	281	
	S. AlCl <sub>3</sub>	335	280	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	327	281	Absence 3'-4'di-OH
<b>3<sup>ème</sup> série</b>	S. méthanol	324	281	
	S. NaOAc	327	281	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	326	281	Absence 3'-4' di-OH

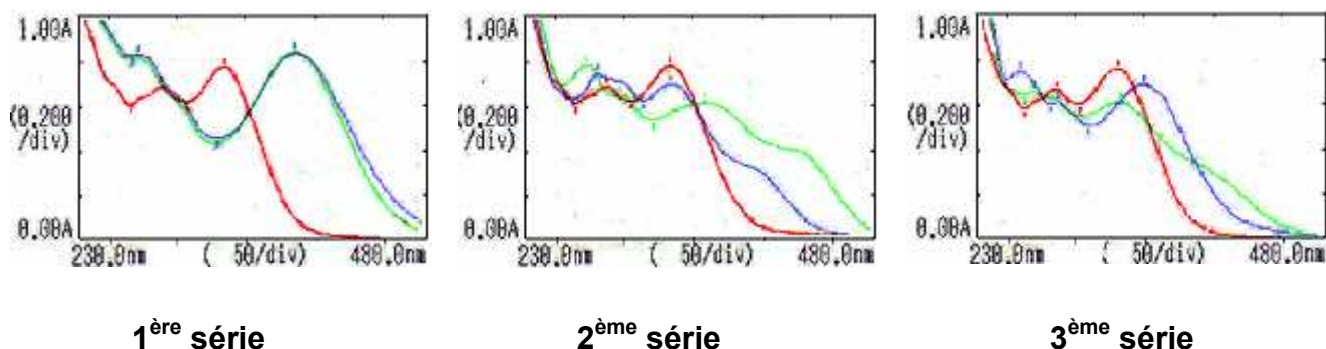
Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



#### Flavone

Apigenine 7-OR : dihydroxy 5, 4' flavone.

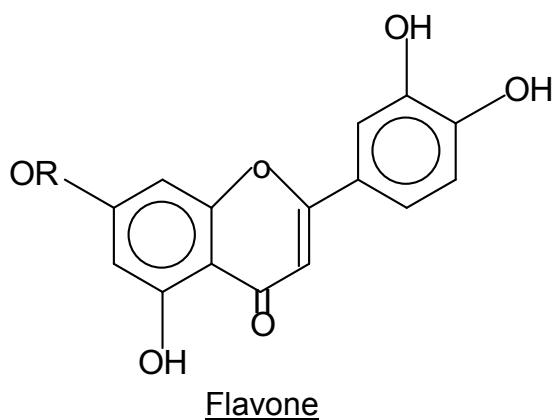
**Fraction 1 : 50% toluène – 50% méthanol (7)**



**Tableau 27** : Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

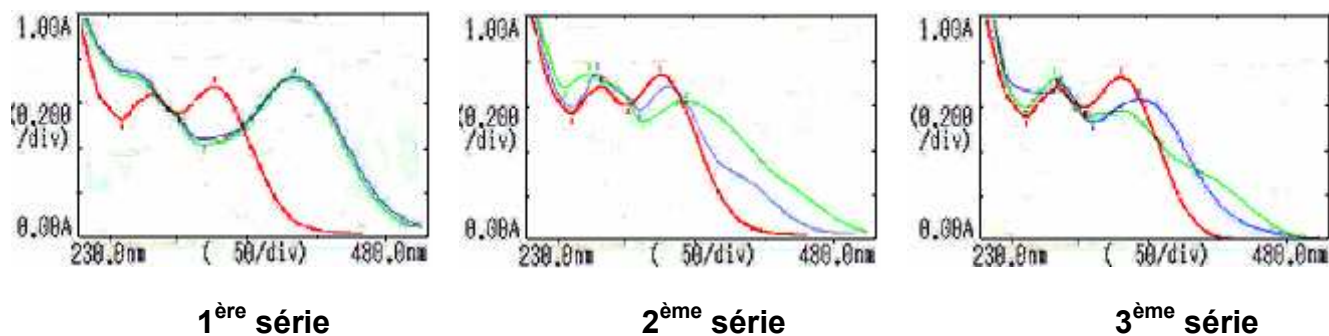
Molécule (7)	Réactif	BI	BII	Observations
<b><u>1<sup>ère</sup> série</u></b>	S. méthanol	332	286	
	S. NaOH	387	269	4'-OH
	S.NaOH (5min)	386	269	7-OR
<b><u>2<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	333	286	
	S. AlCl <sub>3</sub>	357	272	5-OH
	S.HCl/ AlCl <sub>3</sub>	387, 332	280	3'-4'di-OH
<b><u>3<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	332	287	
	S. NaOAc	333	288	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	350	286, 258	Confirmation 3'-4'di-OH

Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Lutéoline 7-OR: trihydroxy 5, 3', 4' flavone.

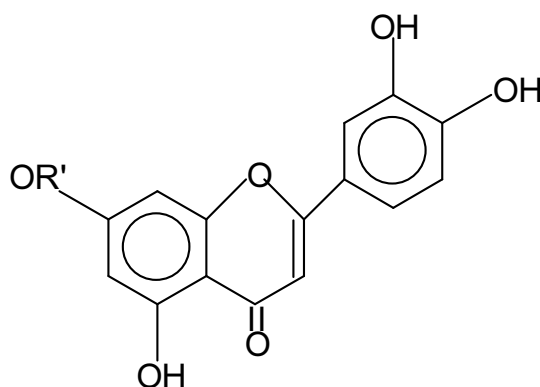
**Fraction 1 : 30% toluène – 70% méthanol (8)**



**Tableau 28** : Valeurs des pics correspondent aux BI et BII

Molécule (8)	Réactif	BI	BII	Observations
<b><u>1<sup>ère</sup> série</u></b>	S. méthanol	330	285	
	S. NaOH	388	255	4'-OH
	S. NaOH (5min)	389	256	7-OR
<b><u>2<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	330	285	
	S. AlCl <sub>3</sub>	346	275	5-OH
	S. HCl/ AlCl <sub>3</sub>	386	282	3'-4' di-OH
<b><u>3<sup>ème</sup> série</u></b>	S. méthanol	331	285	
	S. NaOAc	330	283	Confirmation 7-OR
	S. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / NaOAc	344	287	Confirmation 3'-4'di-OH

Après l'interprétation des données spectrales selon le modèle précédent, on suppose la structure suivante :



Flavone :

Lutéoline 7-OR' : trihydroxy 5, 3', 4' flavone.

#### **5-4 Discussion générale :**

D'après ces résultats, on peut conclure que ces composés identifiés sont les molécules majoritaires des plantes. Parce qu'elles existent en bonne quantité dans les extraits.

Pratiquement les mêmes molécules flavonoïques ont été isolées à partir des trois plantes, cela est logique et juste, vu que le thym et la sauge appartiennent à la même famille « les lamiacées ».

Les flavones et les flavonols sont les deux types de flavonoïdes isolés à partir de ces plantes. Les flavones identifiés sont l'apigénine, et la lutéoline et leurs dérivés. Les flavonols identifiés sont la quercétine à OH libres et la quercétine 7-OR.

Ces résultats sont conformes avec ceux de la littérature, dont plusieurs études ont mis en évidence la présence de ces molécules dans les différentes plantes de cette famille. Les travaux de Merghem et ses collaborateurs (1995) affirment que la majorité des espèces du thym comportent des molécules de type flavone (apigénine, lutéoline) et flavonol (quercétine, kaempférol), qui ont été identifiés par les techniques classiques. Kosar *et al* (2005) ont effectué une analyse qualitative de plusieurs espèces de la famille des lamiacées. Le thym et la sauge font partie de cette étude qui a mené à identifier les produits suivant : lutéoline, lutéoline-glucoside, et apigénine.

A partir de là, on distingue clairement que ce type de plante est riche en flavonoïdes, dont les flavonols et les flavones identifiés constituent les molécules majoritaires dans les extraits de ces plantes.

L'identification complète de la molécule nécessite des analyses plus profondes et plus avancées ; dont la spectrophotométrie de masse est utilisée pour déterminer la masse moléculaire et la RMN (résonance magnétique nucléaire) pour le positionnement exact et précis des hydroxyles sur le squelette moléculaire. Le radical lié à la molécule est l'origine d'une grande variabilité de ces composés polyphénoliques, même quand il s'agit du même squelette moléculaire primaire. Selon le rapport frontale (Rf) et la fluorescence de la molécule sous l'UV, on suppose qu'il ya deux type de radicaux qui peuvent être liés à ces molécules : un groupement méthoxylé CH<sub>3</sub>, et un groupement glycosylé.

On peut supposer que les molécules à Rf élevé possèdent un radical méthoxylé (CH<sub>3</sub>) lié à son squelette. Ce dernier augmente la polarité de la molécule et par conséquent la distance parcourue sera longue. Les molécules possédant un Rf moins important peuvent être liées à un ou plusieurs radicaux glycosylés, sachant que le nombre de radicaux liés à la molécule peut influencer la migration, la détermination, et aussi les propriétés biologiques de la molécule.

## **6- Evaluation de l'activité antioxydante (test du DPPH) :**

Comme on a déjà vu, la surproduction des radicaux libres dans l'organisme et le déficit du système de défense endogène peuvent engendrer de diverses pathologies ; cancer, vieillissement.... Actuellement, La recherche vise à renforcer ces défenses endogènes par des substances naturelles issues des plantes, qui sont douées des propriétés antiradicalaires.

Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante des composés isolés et identifiés. C'est un radical synthétique de couleur violette qui vire vers le jaune quand il est capté par les produits flavonoïques testés. L'intensité de la couleur jaune reflète la capacité antiradicalaire de la molécule, et dépend de la nature, la concentration et la puissance de cette molécule.

La concentration des produits testés est la même, 5mg/ml.

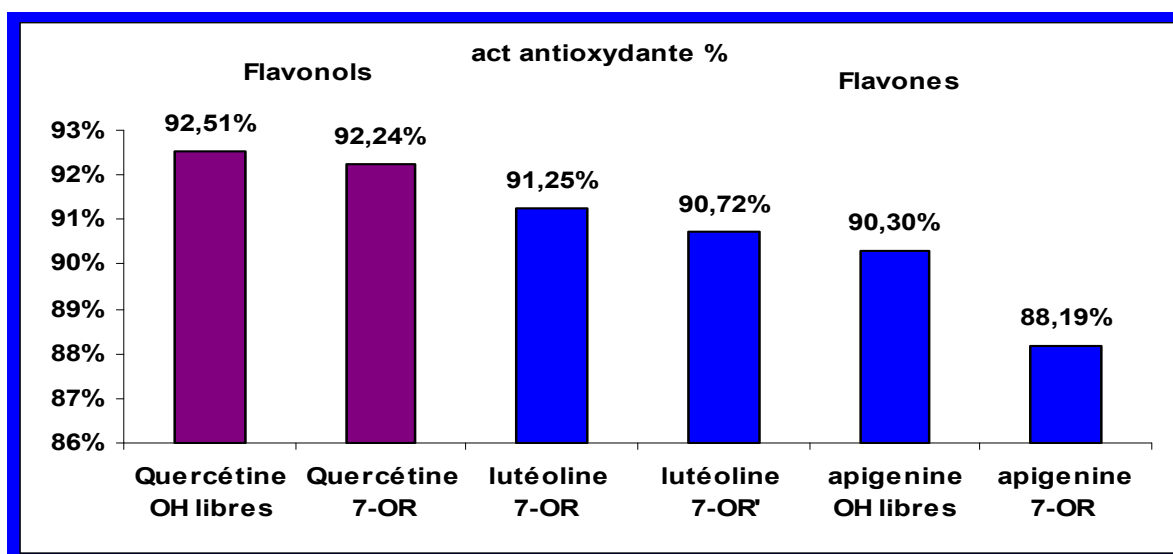
### **6-1 L'activité antioxydante de *Thymus algeriensis* :**

Le tableau suivant présente les six molécules identifiées de *Thymus algeriensis* et leurs pourcentages de l'activité antioxydante vis-à-vis le radical libre DPPH.



**Tableau 29** : pourcentage de l'activité antioxydante.

Fraction	Activité antioxydante %
F2 A Quercétine OH libres	92,51%
F1 A Quercétine 7-OR	92,24%
F4 A Lutéoline 7-OR	91,25%
F4 M Lutéoline 7-OR'	90,72%
F3 A Apigénine OH libres	90,30%
F3 M Apigénine 7-OR	88,19%



**Histogramme 3** : Capacité antioxydante des flavonoïdes de *T.algeriensis*

La quercétine à OH libres présente le pouvoir antiradicalaire le plus élevé (92,51%), suivie par la quercétine substituée en C7 (92,24%).

Concernant les flavones, on remarque que la lutéoline est plus effective que l'apigénine à OH libres (90,30%), ainsi que l'apigénine substituée en C7 (88,19%) qui présente l'effet le plus faible dans cette série.

On peut également supposer que les radicaux liés (R, R') à la lutéoline sont différents, vu que le pouvoir antioxydant de ces deux molécules n'est pas le même. En revenant à l'analyse chromatographique sur couche mince, on trouve que leurs Rf sont : 0,43 pour la lutéoline 7-OR et 0,87 pour la lutéoline 7-OR', cela confirme de quelque sorte que les radicaux liés sont pas de même nature ; dont le 1<sup>er</sup> peut être un glycosyl et le 2<sup>ème</sup> un méthyle.

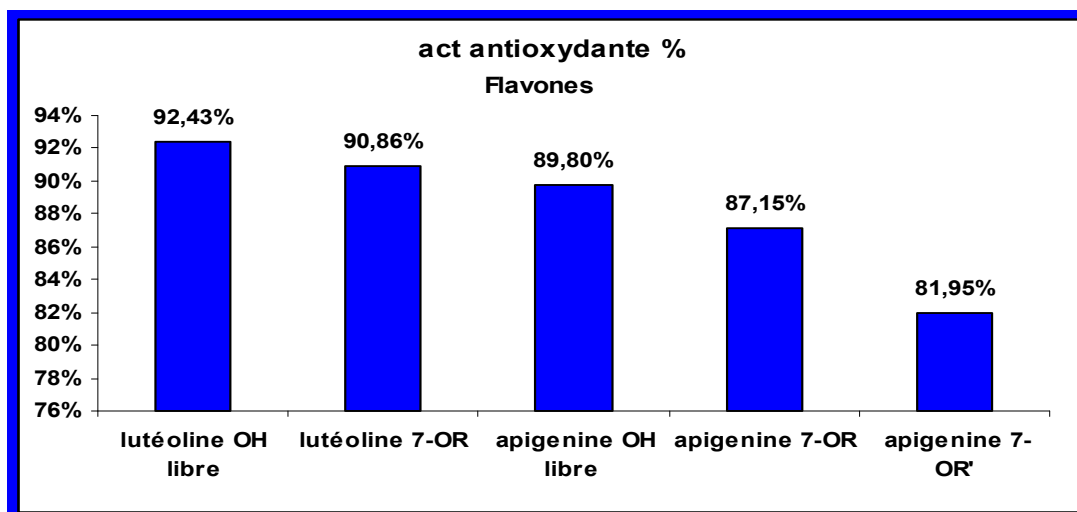
Par conséquent, on peut supposer que le radical CH<sub>3</sub> diminue le pouvoir antiradicalaire plus que le glycosyl.

### **6-2 L'activité antioxydante de *Thymus serpyllum* :**

Les fractions isolées et identifiées à partir des extraits de *Thymus serpyllum* sont illustrées dans le tableau ci-dessous par ordre décroissant de leur activité antioxydante.

**Tableau 30 :** pourcentage de l'activité antioxydante.

<b>Fraction</b>	<b>Activité antioxydante%</b>
100 % MeOH lutéoline OH libres	92,43%
85 % Tol - 15 % MeOH lutéoline 7-OR	90,86%
40 % Tol - 60 % MeOH Apigénine OH libres	89,80%
30 % Tol - 70% MeOH Apigénine 7-OR	87,15%
70 % Tol - 30 % MeOH Apigénine 7-OR'	81,95%



**Histogramme 4:** Capacité antioxydante des flavonoides de *T.serpyllum*

Le même phénomène est remarqué chez le *Thymus serpyllum*. L'évaluation de l'activité antioxydante des flavonoides identifiés informe que la lutéoline à OH libres présente le pouvoir antiradicalaire le plus important qui est de 92,43%, et que la substitution de cette molécule en C7 fait diminuer ce pouvoir à 90,86%. L'apigénine à OH libres ou substituée en C7 est pourvue d'un effet moins important par rapport à celui de la lutéoline.

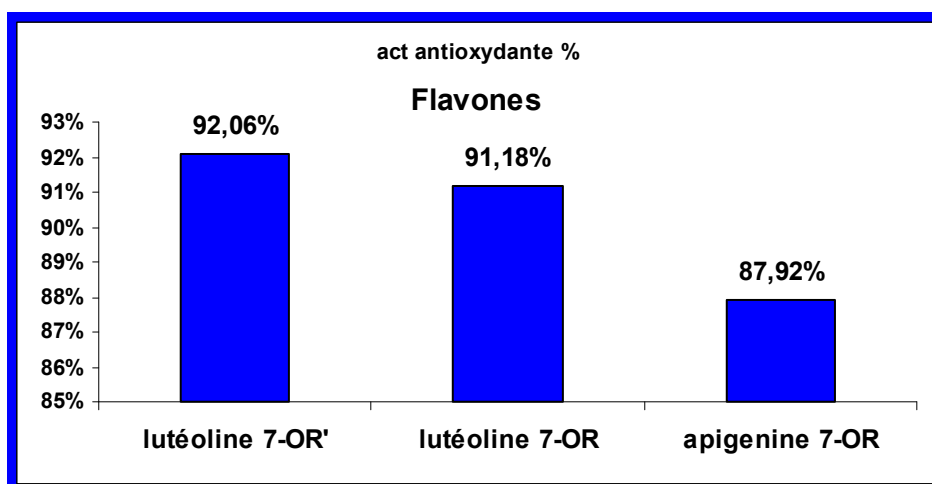
Les Rf des deux apigénines 7-OR et 7-OR' sont 0,12 et 0,80 successivement. On peut déduire que le radical R est un CH<sub>3</sub> et le R' est un glycosyle, ceci explique le faible pourcentage de piégeage de l'apigénine 7-OR' (81,95%) vis-à-vis le DPPH.

### **6-3 L'activité antioxydante de *Salvia officinalis* :**

L'activité antioxydante des fractions identifiées à partir de l'espèce *Salvia officinalis* estimée en pourcentage est présentée dans le tableau ci-dessous

**Tableau 31:** pourcentage de l'activité antioxydante.

Fraction	Activité antioxydante %
F1 30% Tol – 70% MeOH lutéoline 7-OR'	92,06%
F1 50% Tol – 50% MeOH Lutéoline 7-OR	91,18%
F4 80% Tol – 20% MeOH apigénine 7-OR	87,92%



**Histogramme 5:** capacité antioxydante des flavonoïdes de *S. officinalis*

Le même phénomène persiste encore pour les fractions identifiées chez *Salvia officinalis*, dont la lutéoline présente toujours un pouvoir de piégeage plus élevé (92,06%) que l'apigénine (87,92%). Les deux lutéoline se différencient par la substitution en C7.

Le Radical (R) lié à la lutéoline est supposé un méthyle avec un R<sub>f</sub> égale à 0,51, par contre le R' lié à la deuxième lutéoline peut être un glycosyl avec un R<sub>f</sub> égale à 0,15.

#### **6-4 Discussion générale des résultats :**

D'après ces résultats illustrés ci-dessus, on constate que les composés flavonoïques identifiés et isolés à partir des trois plantes, sont doués d'un pouvoir antioxydant élevé et très important, ce qui est rapporté aussi par Dimitrios et Vassiliki (2006).

On a remarqué que les molécules à OH libres (flavonols ou flavones) présentent un effet antioxydant plus important que celles substituées. A partir de là, on peut constater que les radicaux liés aux molécules diminuent d'une façon remarquable leurs capacités antiradicalaires. Nos résultats confirment la relation étroite qui existe entre la structure de la molécule et son pouvoir antioxydant, qui est ainsi reportée par Catherine *et al* (1995), Montoro et son équipe (2005), et Dimitris et Vassiliki (2006).

Soobrattee *et al* (2005), et Cosio *et al* (2006) affirment que l'activité antioxydante dépend essentiellement du nombre des groupements hydroxyles, leur position, et les radicaux liés au squelette moléculaire.

Dimitris et Vassiliki (2006) rapportent que les éléments moléculaires pouvant procurer une activité antioxydante optimale sont :

La présence du groupe ortho-dioxy (3', 4' di-OH) sur le cycle B.

La présence de la double liaison 2-3 sur le cycle C.

La présence du groupement 3-OH sur le cycle C.

Soobrattee *et al* (2005) accordent et confirment que la présence des substitutions (CH<sub>3</sub>, ou groupement glycosyl) diminue le pouvoir antioxydant de la molécule ; ce qui est conforme avec nos résultats.

A partir de ces résultats, on peut classer les molécules identifiées par ordre décroissant selon leurs pouvoirs antioxydants comme suit :

Quercétine et dérivés > lutéoline et dérivés > apigénine et dérivés. Cet ordre est conforme avec celui donné par Dimitris et Vassiliki (2006), et Cosio *et al* (2006).

## 7- Résultats de l'activité antibactérienne :

La méthode de diffusion par des disques a permis la mise en évidence du pouvoir antibactérien de la quercétine, catéchine, acide gallique, et acide tannique, et un témoin négatif qui est le méthanol), ainsi que les molécules isolées à partir des trois plantes. Ces produits naturels et témoins ont été testés vis-à-vis des bactéries pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Entérobacter sp*, *Escherichia coli*).

### 7-1 Effet antibactérien des témoins :

L'utilisation des témoins a favorisé une comparaison juste et fiable de l'effet des polyphénols contre ces bactéries, dont la quercétine est un flavonol, la catéchine qui est un dérivé des flavonols, acide gallique et tannique sont des acides phénols.

Les diamètres des zones d'inhibitions en mm (y compris le diamètre de disque qui de 6 mm) de ces composés sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau32:** Diamètres des zones d'inhibition des témoins.

Espèce Produit	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Entérobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
Quercétine	10 mm	7 mm	10 mm
Catéchine	20 mm	12 mm	20 mm
Acide gallique	28 mm	11 mm	12 mm
Acide tannique	15 mm	8 mm	15 mm
Méthanol	00 mm	11 mm	7 mm

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir antibactérien n'est pas le même, sachant que la même concentration du produit est appliquée pour les trois bactéries. On constate que l'inhibition de croissance bactérienne dépend de deux facteurs ; la bactérie utilisée, et la nature du produit testé.

On remarque que l'acide gallique est pourvu d'un effet inhibiteur très important en présence de *Staphylococcus aureus*, qui a présenté le diamètre le plus élevé par rapport à autres produits pour les trois bactéries, contrairement au méthanol qui n'a

pas d'effet antibactérien sur cette bactérie. La catéchine, l'acide tannique et la quercétine possèdent eux mêmes un effet considérable et important sur cette bactérie. Par conséquent, le *Staphylococcus aureus* est très sensible vis-à-vis les produits polyphénoliques, et très résistant aux produits alcooliques l'exemple du méthanol.

La catéchine a donné un diamètre plus au moins important de 12mm en présence de *l'Entérobacter sp*, c'est le diamètre le plus élevé. La quercétine avec une zone d'inhibition de 7mm présente l'effet antibactérien le plus faible suivi par l'effet de l'acide tannique. L'acide gallique a prouvé aussi un effet important vis-à-vis cette bactérie, équivalent à celui du méthanol. On peut conclure que cette bactérie est moins sensible aux produits polyphénoliques par rapport aux produits alcooliques.

La catéchine est douée d'un pouvoir antibactérien marquant en présence de *l'Escherichia coli* avec un diamètre de 20 mm, suivi par celui de l'acide tannique, l'acide gallique et la quercétine. Le méthanol a donné une zone d'inhibition pratiquement faible.

A partir de ces résultats, on peut déduire et confirmer le pouvoir antibactérien des polyphénols, dont les acides phénols sont plus puissants par rapport aux flavonoïdes (quercétine).



**Photos** : L'activité antibactérienne des témoins vis-à-vis les 3 espèces bactériennes.



## 7-2 Effet antibactérien des produits naturels extraits :

Les mêmes étapes sont appliquées pour testés les composés flavoniques identifiés. Chaque boîte de pétri contient 4 disques y compris le disque témoin qui contient de la quercétine.

### A- *Thymus algeriensis* :

**Tableau33** : diamètres des zones d'inhibition des produits extraits de *Thymus algeriensis*

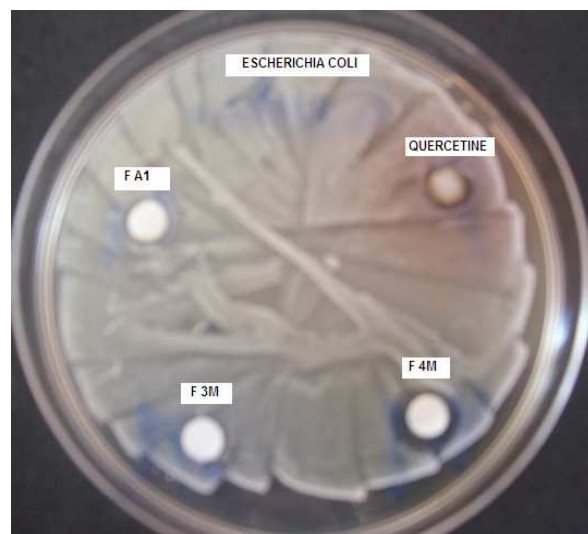
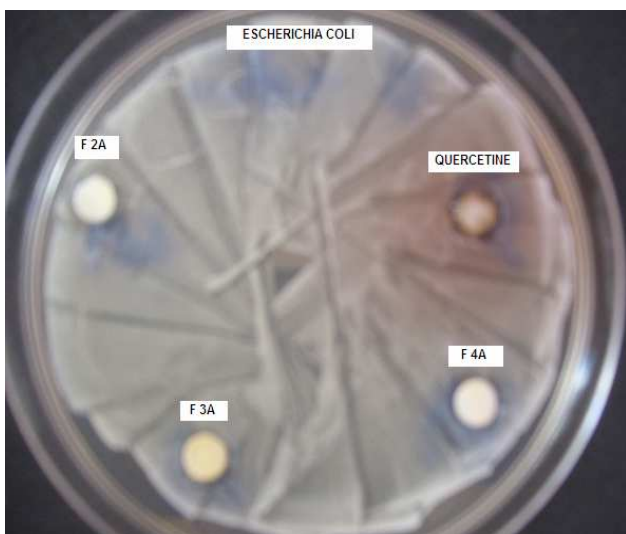
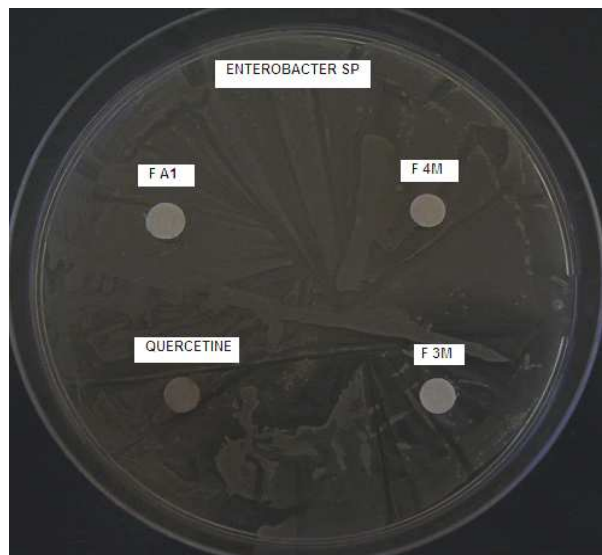
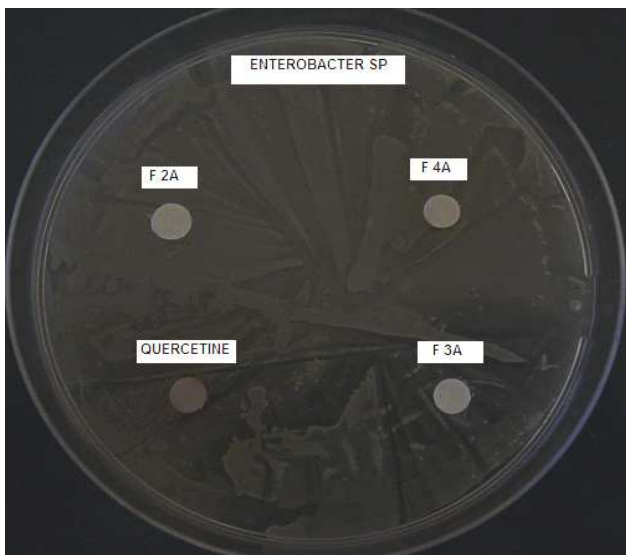
Espèce produits	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Entérobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
F2A	8 mm	7 mm	8 mm
F3A	8 mm	7 mm	8 mm
F4A	8 mm	7 mm	9 mm
<b>Quercétine témoin</b>	<b>9</b> mm	<b>8</b> mm	<b>9</b> mm
F1A	8 mm	7 mm	8 mm
F3M	8 mm	7 mm	8 mm
F4M	8 mm	7 mm	<b>12 mm</b>
<b>Quercétine témoin</b>	<b>8</b> mm	<b>8</b> mm	<b>9</b> mm

Remarque : une zone de 7 et 8 mm est un petit cercle autour de disque.

Le tableau ci-dessus montre que les trois espèces bactériennes sont résistantes vis-à-vis les produits testés, à l'exception de la fraction F 4M (flavone) qui a présenté une zone d'inhibition de 12 mm en présence de l'*Escherichia coli*.

La quercétine extraite (F2A) possède pratiquement le même effet que celui de la quercétine témoin en présence des trois bactéries.

D'après ces résultats, on remarque que les composés flavoniques (flavonols et flavone) sont pourvus d'un effet antibactérien moins important que celui prouvé par les acides phénols témoins.



**Photos** : L'activité antibactérienne des extraits de *Thymus algeriensis*.

## **B- Thymus serpyllum :**

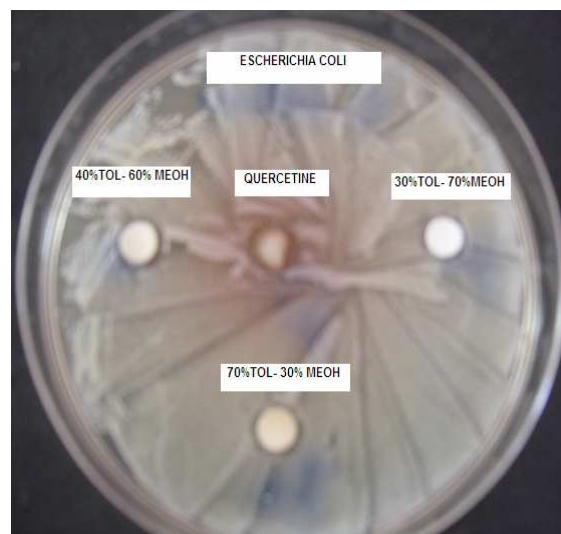
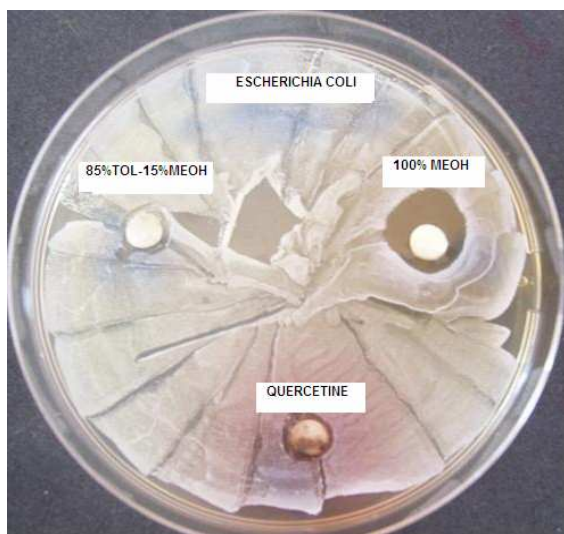
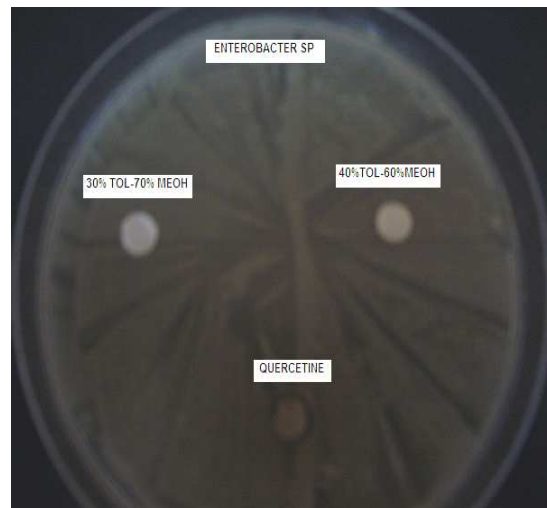
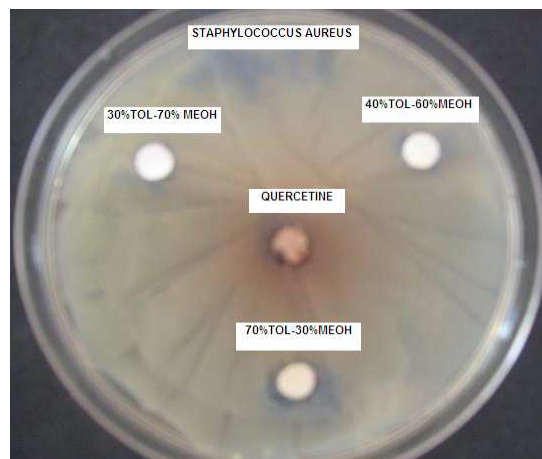
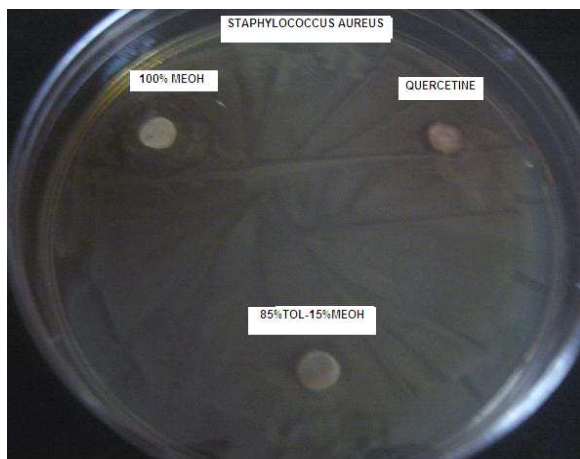
**Tableau 34** : diamètres des zones d'inhibition des produits extraits.

Espèce Produits	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Entérobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
100 % MeOH	18 mm	11 mm	14 mm
85 % Tol - 15 %MeOH	9 mm	9 mm	10 mm
<b>Quercétine témoin</b>	<b>8 mm</b>	<b>8 mm</b>	<b>8 mm</b>
70 % Tol - 30 %MeOH	10 mm	8 mm	9 mm
30 % Tol - 70% MeOH	9 mm	8 mm	8 mm
40 % Tol - 60 %MeOH	8 mm	8 mm	8 mm
<b>Quercétine témoin</b>	<b>8 mm</b>	<b>8 mm</b>	<b>9 mm</b>

La fraction 100% MeOH (flavone) présente un effet marquant sur les trois types de bactéries en particulier le *Staphylococcus aureus*, avec une zone d'inhibition de 18 mm, 11 mm avec l'*Entérobacter sp* et de 14 mm avec l'*Escherichia coli*. Ce pouvoir est très important et plus élevé que celui de la quercétine témoin, dont les zones d'inhibition sont de 8 mm et 9 mm.

La fraction 85 % Tol - 15 % MeOH (flavone) présente de petites zones d'inhibition, moins importante que la première fraction.

Les autres fractions issues du serpolet présentent un effet antibactérien faible avec des zones d'inhibitions qui varient de 8 mm à 10 mm.



**Photos :** L'activité antibactérienne des produits extraits de *Thymus serpyllum*

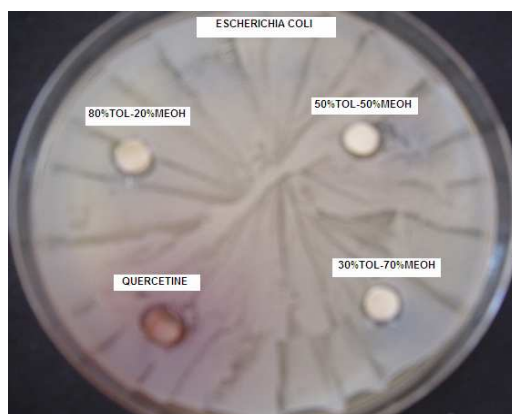
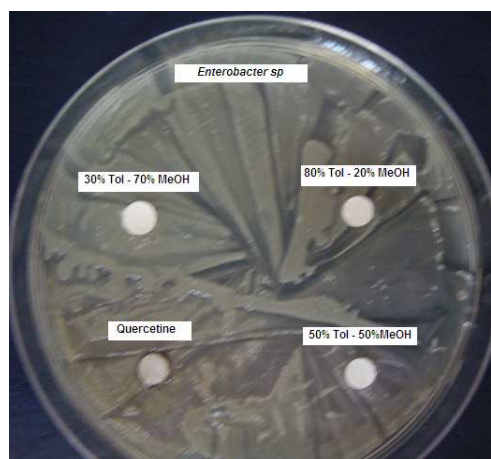
## C-Salvia officinalis :

**Tableau 35** : diamètres des zones d'inhibition des produits extraits

Espèce produits	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Entérobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>
F1 30% Tol – 70% MeOH	11 mm	8 mm	9 mm
F1 50% Tol – 50% MeOH	9 mm	8 mm	8 mm
F4 80% Tol – 20% MeOH	9 mm	8 mm	8 mm
<b>Quercétine témoin</b>	<b>9</b> mm	<b>8</b> mm	<b>8</b> mm

La fraction 30% Tol-70% MeOH (flavone) a donné le diamètre le plus élevé (11 mm) avec le *Staphylococcus aureus*.

Les autres bactéries sont résistantes vis-à-vis les produits testés, dont les diamètres des zones varient de 8 mm à 9 mm.



**Photos :** L'activité antibactérienne des produits identifiés chez *Salvia officinalis*



### **7-3 Discussion générale :**

La méthode des disques nous a permis la mise en évidence du pouvoir antibactérien des composés flavonoïques vis-à-vis ces bactéries : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Enterobacter sp*,

Les résultats obtenus révèlent une résistance de l'*Enterobacter sp* aux différents types de flavonoïdes testés (flavonols et flavones), contrairement aux deux autres bactéries qui apparaissent sensibles à quelques flavonoïdes.

Les molécules qui sont douées d'un pouvoir antibactérien sont de type flavone (lutéoline et ses dérivés). La fraction 100% MeOH est une lutéoline à OH libres, la fraction F4M est une lutéoline 7-OR (R= CH<sub>3</sub>), et la F1 30% Tol-70% MeOH est aussi une lutéoline 7-OR (R=glycosyl).

La lutéoline à OH libres est pourvue d'un effet inhibiteur très important sur les trois espèces bactériennes par rapport aux autres lutéoline substituées en C7, commençant par le *Staphylococcus aureus* qui est le plus sensible, l' *Echerichia coli*, et enfin l'*Enterobacter sp* qui présente une petite sensibilité. Les travaux de Sato *et al* (2000) affirment l'effet antibactérien de la lutéoline.

Ces résultats confirment que la présence des radicaux (CH<sub>3</sub>, ou glycosyl) liés à la molécule fait diminuer son pouvoir antibactérien. Ceci est en accord avec les rapports de Tim et Lamb (2005), Shiming *et al* (2007), et Zhibiao *et al* (2008).

Ce travail a démontré l'effet antibactérien des polyphénols (flavonoïdes et acides phénols) vis-à-vis les bactéries pathogènes, ce pouvoir est appréciable et mérite d'être mieux développé et étudié. D'autres tests antibactériens plus avancés sont nécessaires pour l'évaluation de cet effet antibactérien des polyphénols, afin de valoriser ces produits naturels et les utilisés en phytothérapie et la pharmacologie

## **Conclusion générale et perspectives :**

Deux aspects principaux sont visés par ce travail, le premier est l'aspect phytochimique des plantes *Thymus sepyllum*, *Thymus algeriensis* et *Salvia officinallis* qui consiste à diagnostiquer les phases Acétate d'éthyle, Mec et phase eau par chromatographie couche mince sur polyamide. Ces phases ont subi une purification pour extraire les principaux flavonoïdes par les différentes techniques chromatographiques (chromatographie colonne ouverte, chromatographie sur papier wathman).

L'identification des molécules collectées était effectuée par spectrophotométrie UV-visible (analyse spectrale) en utilisant différents réactifs qui provoquent des déplacements du spectre méthanolique, et en coopération avec les résultats de la CCM analytique ; on peut supposer le positionnement des groupements hydroxyles sur le squelette moléculaire flavonoïque. Les molécules supposées sont : quercétine et dérivés, lutéoline, apigénine et leurs dérivés.

Le deuxième aspect est de nature biologique, qui a été mis en évidence par deux tests biologiques différents ; un test antioxydant et antibactérien.

L'activité antioxydante des molécules isolées est évaluée par le test antiradicalaire qui consiste à estimer la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats obtenus ont montré que les flavonoïdes extraits sont doués d'un pouvoir antioxydant très important, dont l'ordre décroissant du pouvoir antiradicalaire est comme suit : quercétine et dérivés > lutéoline et dérivés > apigénine et dérivés.

L'effet antibactérien de ces molécules est mis en évidence par la méthode des disques, en présence de trois espèces bactériennes pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Enterobacter sp.* Ce dernier est résistant aux différents types de flavonoïdes testés. L'agent antibactérien le plus actif parmi les flavonoïdes extraits est de type flavone, c'est une lutéoline à OH libre. Les lutéoline substituées en C7 présentent un pouvoir antibactérien moins important.

Partant de ces résultats, il est nécessaire d'approfondir l'étude phytochimique en utilisant des techniques plus performantes (HPLC, RMN...) pour une identification fiable et certaine des molécules isolées. Etablir des tests antibactériens, antioxydants et autres plus détaillés et plus avancés. Appliquer les techniques biotechnologiques dans le domaine des métabolites secondaires à fin de tirer le maximum de ces molécules, et les utilisées pour l'intérêt de la santé humaine.



## **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques :

Abadie J. 2007. La traite des plantes. *La recherche.*, **51** (411) : 50-52.

Akroum S. 2006. Etude des propriétés biochimiques des polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* Mémoire de magistère de l'université de Constantine.

Alzoreky N.S., et Nakahara K. 2002. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food microbiology.*, **80** (3) : 223-230.

Angela M., Laur V., Daniela H., Dragulescu C., Iuliana A. et Olah N.K. 2008. Polyphenolic analyses from *Thymus* species. Production romany academy., **2007** (3) : 117-121.

Anonyme 1 : fiche plante le thym à l'abri des l'infections de l'hiver (en ligne) : [http://www.ponroy.com/ml/images/content/conseils\\_sante/pdf\\_conseils\\_sante/le\\_thym.pdf](http://www.ponroy.com/ml/images/content/conseils_sante/pdf_conseils_sante/le_thym.pdf).

Anonyme 2 (en ligne) : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Thymus\\_serpyllum](http://fr.wikipedia.org/wiki/Thymus_serpyllum).

Anonyme 3 (en ligne) : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Salvia\\_officinalis](http://fr.wikipedia.org/wiki/Salvia_officinalis).

Anonyme 4 (en ligne) : [http://www.inra.fr/la\\_sciences\\_et\\_vous/apprendre\\_experimenter/questions\\_d\\_actu/couleur\\_des\\_fleurs](http://www.inra.fr/la_sciences_et_vous/apprendre_experimenter/questions_d_actu/couleur_des_fleurs).

Anonyme 5 (en ligne) : <http://test.larousse.fr/encyclopedie/ehm/les-flavonoides/182118>.

Anonyme 6 (en ligne) :

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Systeme\\_detox\\_ROS.GIF](http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Systeme_detox_ROS.GIF).

Barringer T.A., Hatcher L. et Sasser H.C. 2008. Potential Benefits on Impairment of Endothelial Function after a High-fat Meal of 4 weeks of Flavonoid Supplementation. *Evidence –based complementary and alternative medicine*.

Bérubé-Gagnon J. 2006. Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire de l'université de Québec.

Besseau S. 2007. Caractérisation fonctionnelle d'HCT, une acyltransférase impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur.

Bouheroum M. 2007. Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherim adpressum* et *Ononis anfastissima*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine.

Boutabet K. 2007. Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Thèse de Magistère de l'université de Jijel.

Brieskorn, C.H. et Biechele W. 1971. The flavones from *Salvia officinalis* L. *Archiv der Pharmazie.*, **304** : 557–561.

Catherine A., Rice E., Nicholas J.M., et George P. 1996. Structure-Antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology & medicine.*, **20** : 933-956.

Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L., et Zhao J.W. 2008. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience lettres.*, **448** (2) : 175- 179.

Cosio M.S., Buratti S., Mannino S., et Benedetti S. 2006. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food chemistry.*, **97** : 725-731.

Cristovao L.F., Valentao Patricia C.R., Andrade P.B., Seabra R.M., Fernandes-Ferreira M., et Pereira-Wilson C. 2007. Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-biological Interactions.*, **167** : 107-115.

Cuvelier M.E., Richard H., et Berset C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society.*, **73** : 645–652.

Damintoti K., Mamoudou H.D., Jacques S., Saydou Y., Souleymane S., et Alfred S.T. 2005. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Mémoire de l'université de Burkina Faso.

Debete Judith M. 2005. Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.

Delgado M.E., Haza A.I., Arranz N., Garcia A., et Morales P. 2008. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *European journal of nutrition.*, **47** (8) : 479- 490.

Dimitrios I.T., et Vassiliki O. 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for 3' 4' hydroxyl substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **7** :140-146.

Djerroumi A., et Nacef M. 2004. 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed *Palais du livre.* P 135 -131.

- Domenico T., Francesco C., Maria G.S., Vincenza V., Mariateresa C.D., Antonella S., Gabriela M., et Giuseppe B. 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, **49** : 2474-2478.
- Duling E.N., Owen J.C., John B.G., Rosmary F.W., Kevin A.M., Yeap L.F., et Nigel B.P. 2007. Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. *Food chemistry.*, **101** : 1417- 1424.
- Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., et Yousefzadi M. 2008. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry.*, **110** : 927-931.
- Ekoumou C. 2003. Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse de doctorat de l'université de Bamako.
- El Ajjouri M., Badr S., Mohamed G., Abderrahman A., Abdellah F., Mohamed R., Fatiha A., et Mohamed A. 2008. Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* L contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.* **12** (4) : 345- 351.
- Ferrari J. 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat de l'université de Lausanne.
- Fuorucci S. 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat de l'université de Nice Sophia Antipolis.
- Girotti chanu C. 2006. Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon.
- Greet V. 2004. Radicaux libres et antioxydants : Principe de base (en ligne) : [http://www.danoneinstitute.be/files/pdf/symposium/antioxydant/gvansant-resume\\_fr.pdf](http://www.danoneinstitute.be/files/pdf/symposium/antioxydant/gvansant-resume_fr.pdf).
- Guggenbühl N. 2003. Les polyphénols sont à la fête (en ligne) : <http://www.healthandfood.be/html/fr/article/62/polyphenol.htm>.
- Hadi M. 2004. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur.
- Hans W.K. 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. *Terre édition*.

Katarzyna U., Anna M., Marta M., Joanna J.B., et Grzegorz W. 2007. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia.*, 62 (2) : 132-135.

Kechkar M. 2008. Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Thèse de Magistère de l'université de Constantine.

Kenjeric D., Monschein V., Riederer P., et schreir P. 2003. Flavonoids pattern of sage (*Salvia officinalis*) unifloral honey. *Food chemistry.*, 110 : 187-192.

Kessemi N. 2006. Relation entre un insecte phytophage et sa principale plante hôte : cas de la bruche du haricot (*Acanthoscelides obtectus*), (*Coleoptera Bruchidae*). Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

Kosar M., Dorman H.J.D., et Hiltunen R. 2005. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected lamiaceae species. *Food chemistry.*, 91 : 525-533.

Kumaran A., et karunakaran R.J. 2005. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry.*, 97 : 109-114.

Lahlah F.Z. 2008. Extraction des flavonoides par le butanol, chloroforme à partir de *Silybum marianum*, et étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de magistère de l'université de Constantine.

Lahoual M. 2004. Intéraction flavonoides mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat d'état de l'université de Constantine.

Lavigne J.P., Bourg G., et Sotto A. 2007. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) et infections urinaires : étude et revue de la littérature. *Pathologie Biologie.*, 55 : 460-464.

Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., et Lee C.Y. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry.*, 51 : 7292-7295.

Lepoivre P. 2003. Phytopathologie. Ed De Boeck université. P 154.

Lima C.F., Patricia C., Valentao R., Andrade P.B., Seabra.R.M., Fernandes-Ferreira.M., et pereira-Wilson C. 2007. Water and méthanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG<sub>2</sub> cells from t-BHP induce oxidative damage. *Chemio-biological interaction.*, 167 : 107-115.

Longaray Delmare A.P., Ivete T.M.P., Liane A., Luciana A.S., et Sergio E. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south brazil. *Food chemistry.*, 100 : 603-608.

Loo A.Y., Jain K., Darah I. 2008. Antioxydant activity of compound isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food chemistry.*, 107 : 1151-1160.

Macheix J.J., Fleuriet A., et Jay- Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed presses polytechnologiques et universitaires Romande. P67.

Maksimovic M., DAnijela V., Mladen M., Marija E.S., Sabaheta A., et Sonja S.Y. 2007. Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia* species : *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis* L. *Biochemical Systematics and Ecology*. **35** : 473-478.

Marc C., Antoine B., Jean C., Christine B., Alex S., et Bernard V. 2000. Free flavonoid aglycones from *Thymus herba barona* and its monoterpenoid chemotypes. *Phytochemistry*. **40** : 115-120.

Marfak A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides. Thèse de doctorat de l'université de limoges

Markham K.R. 1982. Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press. P 6-10.

María J. J., Rosa M.M., Martínez.C., Moñino L., et Jose A.S. 2008. Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial Crops and Products*., **29** : 145-153.

Mariana P., et Laurian V. 2007. Study of polyphenols from the species *Thymus pulegioides* L (Lamiaceae). *Farmacia- Bucuresti*., **55** (3) : 297- 302.

Masterova I., Uhrin D., Kettmann V., et Suchy V. 1989. Phytochemical study of *Salvia officinalis* L. *Chemical Papers*., **43** : 797–803.

Meda A., Euloge L.C., Romito M., Millogo J., et Germaine N.O. 2005. Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*., **91** : 571-577.

Merghem R., Jay M., Viricel M.R., Bayet C., et Voirin B. 1995. Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiataea). *Phytochemistry*., **38** : 637-640.

Miliauskas. G., Venskutonis P.R., et Van Beek T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry*., **85** : 231-237.

Mohammedi Z. 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentiels et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemecen. Thèse de Magistère de l'université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.

Montoro P., Braca A., Pizza C., et De Tommasi N. 2005. Structure-antioxydant activity relation ships of flavonoids isolated from different plant species. *Food chemistry*., **92** : 349-355.

Moroh J.L.A., Bahi C., Dje K., Loukou Y.G., et Guede-Guina F. 2008. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.*, **77** : 44 – 61.

Nagendran B., Kalyana S., et Samir S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry.*, **99** : 191–203.

Park H.H., Lee S., Son H.Y., Park S.B., Kim M.S., Choi E.J., Singh T.S., Ha JH Lee M.G., Kim J.E., Hyun M.C., Kwon T.K., Kim Y.H., et Kim S.H. 2008. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research.* **31** (10) : 1303- 1311.

Philip M. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *Journal Science Technology.*, **26** (2) : 211-219.

Pieroni A., Janiak V., Duřr M.C., Luđeke S., Trachsel E., et Heinrich M. 2002. *In vitro* Antioxidant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanians in Southern Italy. *Phytotherapy research.*, **16** : 467- 473.

Piquemal G. 2008. Les flavonoides (en ligne) : [http://www.detoursante.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=166:les-flavonoides&catid=41:phyto-aromatherapie&Itemid=215](http://www.detoursante.com/index.php?option=com_content&view=article&id=166:les-flavonoides&catid=41:phyto-aromatherapie&Itemid=215).

Quezel P., et Santa S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed Centre National de la recherche scientifique.

Radulescu V., Silvia C., et Eliza O. 2004. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A.*, **1027** : 121-126.

Rania A. A. 2007. Complexation des proteines laitieres par les extraits de gousses vertes de caroubier : Proprietes technologiques des coagulums obtenus. Thèse de doctorat de l'université de Paris.

Sato Y., Suzaki S., Nishikawa T., Kihara M., Shibata H., et Higuti T. 2000. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Ethnopharmacol.*, **72** : 483–488.

Scalbert A. 2004. *Fruits et légumes, polyphénols et santé (en ligne)* : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-FruitsPolyphenol.html#d0e17>.

Shiming L., Lambros T., Zhenyu W., Goodnow R., et Chi-Tang H. 2007. Efficient and scalable method in isolation of polymethoxyflavones from orange peel extract by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography.*, **846** : 291–297.

Sarmi M.P., et Cheymer V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Lavoisier*. P 2 -10.

Servais S. 2002. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3. Thèse de doctorat de l'université de Claude Bernard.

Soobrattee M. A., Neerghen V. S., Luximon-Ramma A., Aruoma O. I., Bahorun T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : mechanism and actions. *Mutation Research.*, **579** : 200-213.

Tim T. P. C., et Lamb A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents.*, **26** : 343-356.

Treki A. 2002. Effets biologiques de polyphénols extraits de plantes médicinales *Ranunculus repens* et *Thymus hirtus* sur l'activité de microorganismes responsables de certaines pathologies. Thèse de magistère de l'université de Constantine.

Ulanowska K., Tkaczyk A., Konopa G., Wegrzyn G. 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Archives of microbiology.*, **184** (5) : 271-278.

Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., La Voie E.J., Huang T.C., et Ho C.T. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **46** : 4869–4873.

Wang M., Kikuzaki H., Zhu N., Sang S., Nakatani N., Ho C.T. 2000. Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **48** : 235–238.

William G., Hopkins C. M. E. 2003. Physiologie végétale. Ed De Boeck université. P 140.

Waridel P. 2003. Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (Potamogetonaceae). Thèse de doctorat de l'université de Lausanne.

Yango K., Oumar K., Abdoul K.L., et Vesa H. 2004. Etude chimique et de l'activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *Comptes Rendus Chimie.*, **7** (10-11) : 1095-1100.



Yinrong L., Yeap L. 2000. Flavonoids and phenolic glycoside from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry.*, **55** : 263-267.

Zhang H.J., et Li L.N. 1994. Salvianolic acid : a new depside from *Salvia cavaleriei*. *Planta Medica.*, **60** : 70–72.

ZhiBiao Y., Yan Y., YiZeng L., et Bao Z. 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT.*, **41** : 597–603.

## ملخص:

تعتبر النباتات الطبية مصدر هام للجزيئات الحيوية المعروفة بنشاطاتها البيولوجية المتعددة.

يتضمن هذا العمل دراسة فيتو كيميائية لأهم الفلافونيدات المستخلصة *Thymus serpyllum, Thymus algeriensis*

*Salvia officinalis*, من: و دراسة خصائصها المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا

نسبة الفينولات الكلية لهذه النباتات تتراوح بين:

(16.64 – 25.47 mg EAG/g) بينما نسبة الفلافونيدات فقد كانت بين (1.7 – 2.4 mg EQ/g)

أظهرت هذه الدراسة أن الفلافونيدات المدروسة لها نشاط مضاد للأكسدة جد مهم, حيث كانت النتائج كالتالي:

(88% -92%), (81% -92%), (87% - 92%) على التوالي مع:

*Salvia officinalis, Thymus serpyllum, Thymus algeriensis*

نتائج النشاط المضاد للبكتيريا بين أن *lutéoline* و مشتقاتها لها تأثير مثبت معتبر اتجاه أنواع البكتيريا التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاح: *Salvia officinalis, Thymus serpyllum, Thymus algeriensis*

الفلافونيدات, المضاد للأكسدة, المضاد للبكتيريا.

## **Abstract**

The medicinal plants represent an immense source of bioactive molecules, endowed with numerous biological activities. The present work concerns of photochemistry study of flavonoids isolated from *Thymus serpyllum*, *Thymus algeriensis*, and *Salvia officinalis*, and an evaluation of their antioxidant and antibacterial activities.

The rate of total phenols ranged from 16, 64 to 25,47 mg GAE / g extract, whereas the rate of flavonoids is 1,7 to 2,4 mg QE/ g extract. The antioxidant activity is seems very important, whose the results vary from 88% to 92% for *T. algeriensis*, 81% to 92% for *T. serpyllum*, and 87% to 92% for *S. officinalis*.

The results of antibacterial activity showed that luteolin and its derivatives have significant inhibitory effect against the bacterial species tested.

## **Keyword:**

*Thymus serpyllum* , *Thymus algeriensis* , *Salvia officinalis* , flavonoids , antioxidant activity , antibacterial activity.

Nom : Madi Prénom : Aicha	date de soutenance : <b>26/01/2010</b>												
<b>Caractérisation et comparaison de contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (<i>Thym et Sauge</i>) et la mise en évidence de leurs activités biologiques.</b>													
Diplôme : Magistère	Option : Biotechnologie végétale												
<p><b><u>Résumé:</u></b></p> <p>Les plantes médicinales constituent une source immense de molécules bioactives, dotées de nombreuses activités.</p> <p>Le présent travail porte sur une étude phytochimique de principaux flavonoides isolés de <i>Thymus serpyllum</i>, <i>Thymus algeriensis</i>, et <i>Salvia officinalis</i>. Une évaluation de leur activité antioxydante et antibactérienne a été réalisée.</p> <p>Le taux des phénols totaux varie de 16,64 à 25,47 mg EAG/g d'extrait, tandis que le taux des flavonoides est de 1,7 à 2,4 mg EQ/ g d'extrait. Le pouvoir antioxydant des flavonoides testés est apparaît très important, dont les résultats varient de 88% à 92% pour le <i>Thymus algeriensis</i>, 81% à 92% pour le <i>Thymus serpyllum</i>, et de 87% à 92% pour <i>Salvia officinalis</i>. Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que la lutéoline et ses dérivées possèdent un effet inhibiteur considérable sur la croissance bactérienne.</p> <p><b><u>Mots clés :</u></b> <i>Thymus serpyllum</i>, <i>Thymus algeriensis</i>, <i>Salvia officinalis</i>, flavonoides, activités antioxydante, activité antibactérienne</p>													
Laboratoire de développement et de valorisation des ressources phytogénétiques. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri de Constantine.													
<p><b><u>Membre de jurés :</u></b></p> <table data-bbox="177 1664 1332 1921"> <tr> <td>M. BENLARIBI M.</td> <td>Président</td> <td>Prof Univ. Constantine</td> </tr> <tr> <td>M. MERGHEM R.</td> <td>Promoteur</td> <td>Prof Univ. Constantine</td> </tr> <tr> <td>M. BENGUADOUAR A.</td> <td>Examineur</td> <td>Prof Univ. Constantine</td> </tr> <tr> <td>M. KHELIFI D.</td> <td>Examineur</td> <td>Prof Univ. Constantine</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">2009 - 2010</p>		M. BENLARIBI M.	Président	Prof Univ. Constantine	M. MERGHEM R.	Promoteur	Prof Univ. Constantine	M. BENGUADOUAR A.	Examineur	Prof Univ. Constantine	M. KHELIFI D.	Examineur	Prof Univ. Constantine
M. BENLARIBI M.	Président	Prof Univ. Constantine											
M. MERGHEM R.	Promoteur	Prof Univ. Constantine											
M. BENGUADOUAR A.	Examineur	Prof Univ. Constantine											
M. KHELIFI D.	Examineur	Prof Univ. Constantine											