



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

Université Ziane Achour –Djelfa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des sciences agronomiques et vétérinaires

## Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Alimentaires.

Option : Qualité des Produits et Sécurité des Aliments.

Thème

**Contribution à l'évaluation de l'activité  
antioxydante des deux plantes médicinales :**  
*Thymus hirtus et Rosmarinus tournefortii*

Présenté par : CHOUIHA Omar

HOUACINE Ali

Devant le jury :

Président : Dr. NAAS O.

Promoteur : Dr. LAHRECHE T.

Examineurs : Dr. BOUGUETAIA Y.

Dr. LOUNIS M.

Année Universitaire : 2017/2018





## *Remerciements*

Nous remercions Dieu de nous avoir donné la capacité d'achever ce travail de mémoire et qui nous a aidés à dépasser toutes les difficultés que nous avons rencontré.

Nous Remercions notre promoteur M. LAHRECHE Talal pour ses encouragements et ses orientations tout au long de la préparation de ce travail.

Au président de jury de notre mémoire, Aux membres du jury,

A tous ceux qui de près ou de loin ont apporté leur contribution à la réalisation de ce travail.

# Table des matières

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Introduction.....	01
<b>Partie synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Les composés phénoliques</b>	
I- Présentation des composés phénoliques.....	03
II- Structure et catégories des composés phénoliques.....	03
III- Principales classes des composés phénoliques.....	04
III-1. Polyphénols monomériques (simples) .....	04
III-1.1. Les acides phénoliques.....	04
a) Acides hydroxybenzoïques.....	04
b) Hydroxycinnamiques.....	05
III-1.2. Les coumarines.....	06
III-1.3. Les stilbènes.....	06
III-1.4. Les flavonoïdes.....	07
III-1.4.1. Généralités.....	07
III-1.4.2. Structure .....	07
III-1.4.3. Classification.....	08
III-2. Polyphénols sous forme de polymères (complexes).....	09
III-2.1. Les tannins.....	09
III-2.1.1. Généralités .....	09
III-2.1.2. Types et structures des tannins.....	09
a) Tannins hydrolysables.....	09
b) Tannins condensés .....	10
III-2.2. Les lignines.....	11
IV- Quelques propriétés des composés phénoliques chez les animaux.....	12
IV-1. Propriétés antiradicalaire.....	12
IV-2. Propriétés chélatrices des ions métalliques .....	13
IV-3. Propriétés antibactériennes.....	14

IV-4. Propriétés anticancéreuses.....	14
IV-5. Propriétés anti inflammatoires.....	15
IV-6. Propriétés antivirales.....	15
IV-7. Propriétés antiallergiques .....	16
V- Quelques propriétés des composés phénoliques chez les végétaux .....	16

## **Chapitre II : Les oxydants et les antioxydants**

I- Les oxydants (radicaux libre) .....	17
I-1. Définition d'un radical libre.....	17
I-2. Origine des radicaux primaires.....	18
I-3. Phases de l'oxydation.....	19
a) Initiation.....	19
b) Propagation .....	19
c) Terminaison (arrêt) .....	19
II- Les antioxydants.....	20
II-1. Définition des antioxydants.....	20
II-2. Défenses enzymatiques.....	20
a) Superoxydes dismutases (SOD) .....	20
b) Catalases.....	20
c) Glutathion peroxydases.....	21
II-3. Défenses non enzymatiques (antioxydants naturels) .....	21
II-3.1. Les antioxydants simples.....	21
II-3.1.1. Les vitamines.....	21
a) Vitamine C .....	21
b) Vitamine E .....	22
II-3.1.2. Les minéraux.....	22
a) Cuivre .....	22
b) Manganèse.....	22
c) Zinc .....	22
d) Sélénium.....	23
II-3.2. Les antioxydants complexes.....	23
II-3.2.1. Polyphénols.....	23
II-3.2.2. Caroténoïdes.....	23

II-4. Mécanismes d'action des antioxydants.....	24
II.5. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant .....	24
II-6. Conséquences du stress oxydatif .....	25
a) Oxydation de l'ADN.....	25
b) Oxydation des protéines.....	26
c) Oxydation des lipides.....	26
d) Oxydation des glucides.....	26

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre I : matériel et méthodes**

I- Matériel végétal .....	28
II- Appareillages utilisés .....	29
III- Produits et réactifs utilisés.....	29
IV- Etapes d'extraction des composés phénoliques.....	30
IV-1. Préparation des plantes.....	30
a) Séchage.....	30
b) Broyage.....	30
IV-2. Macération (extraction solide/liquide).....	31
IV-3. Evaporation .....	32
V- Détermination du rendement .....	33
VI- Analyse qualitatif.....	33
VI-1. Préparation des filtrats.....	33
VI-2. Mise en évidence des polyphénols totaux (réaction au FeCl <sub>3</sub> ).....	34
VI-3. Mise en évidence des flavonoïdes (réaction à la cyanidine).....	34
VII- Dosage quantitatif .....	34
VII-1. Préparation des solutions .....	34
a) Solution de DPPH .....	34
b) Solution de Folin-Ciocalteu diluée (10fois).....	34
c) Solution de chlorure d'Aluminium hexa hydraté (AlCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O à %).....	34
d) Solution de carbonates de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) à 7.5 % .....	35
e) Solution des substrats utilisés dans le test DPPH .....	35
f) Solution des produits utilisés pour l'établissement de la courbe d'étalonnage de référence.....	35

g) Solution des extraits du thym/ romarin.....	35
VII-2. Dosage de polyphénols totaux .....	36
a) Principe.....	36
b) Mode opératoire .....	36
c) Préparation du Blanc.....	36
VII-3. Dosage de flavonoïdes .....	37
a) Principe.....	37
b) Mode opératoire .....	37
c) Préparation du Blanc.....	37
VIII- Evaluation de l'activité antioxydante par le test du DPPH.....	37
a) Principe .....	37
b) Mode opératoire.....	38

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

<b>I- Résultats</b> .....	39
I-1. Rendement .....	39
I-2. Analyse qualitative .....	39
I-2.1. Mise en évidence des polyphénols totaux .....	39
I-2.2. Mise en évidence des flavonoïdes.....	39
I-3. Dosage quantitatif .....	40
I-3.1. Dosage de polyphénols totaux .....	40
I-3.2. Dosage de flavonoïdes .....	41
I-4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits .....	42
<b>II- Discussion</b> .....	43
II-1. Rendement.....	43
II-2. Dosage de polyphénols totaux et des flavonoïdes.....	44
II-3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	45
Conclusion.....	47
Références bibliographiques.....	49
Annexes	
Résumé	

## Liste des abréviations

**AAE** : Equivalent en acide ascorbique.

**AC** : Absorbance du contrôle.

**AE** : Absorbance de l'extrait.

**AMP** : Adénosine monophosphate.

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**AND**: Acide désoxyribonucléique.

**BHT** : Butylhydroxytoluène.

**°C** : Degré Celsius

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

**ERO**: Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species).

**g** : Gramme

**GAE** : Equivalent en acide gallique.

**GSHPx** : Glutathion peroxydase

**GSSG** : Disulfure de glutathion

**IC50** : Concentration inhibitrice 50 %.

**LDL**: Low density lipoprotein (lipoprotéines de basse densité).

**Méch** : Masse sèche de l'échantillon végétal.

**Mext** : Masse de l'extrait.

**mg** : Milligramme

**ml** : Millilitre

**nm** : Nanomètre

**QE** : Equivalent en quercétine.

**R2** : Coefficient de corrélation.

**R** : Rendement.

**VIH**: Virus de l'immunodéficience humaine.

**UV** : Ultraviolet.

**µg** : Microgramme.

**µl** : Microlitre.

**%** : Pourcentage

etc : et cetera

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Structure de base des stilbènes et ses principaux types .....	06
<b>Figure 02:</b> Structure de base d'un flavonoïde.....	07
<b>Figure 03:</b> Structure générale de tanins hydrolysables .....	10
<b>Figure 04:</b> Structure générale de tanins condensés.....	11
<b>Figure 05 :</b> Structures générale de la lignine.....	11
<b>Figure 06 :</b> Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable.....	13
<b>Figure 07:</b> Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me <sup>+n</sup> ).....	13
<b>Figure 08:</b> Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène.....	18
<b>Figure 09:</b> Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant.....	25
<b>Figure 10 :</b> Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	27
<b>Figure 11 :</b> Plantes étudiées [(a) <i>Thymus hirtus</i> , (b) <i>Rosmarinus tournefortii</i> ].....	28
<b>Figure 12 :</b> Broyats des deux échantillons .....	30
<b>Figure 13 :</b> Filtration des macéras .....	31
<b>Figure 14 :</b> Evaporation du filtrat par un rotavapeur sous vide .....	32
<b>Figure 15 :</b> Résultats de mise en évidence positifs, [(a) changement de couleur des extraits vers le vert noirâtre, (b) changement de couleur des extraits vers le rose-orange].....	40
<b>Figure 16.</b> Droite de la courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	40
<b>Figure 17:</b> droite de la courbe d'étalonnage de la quercétine.....	41
<b>Figure 18:</b> Courbes de % d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations.....	42
<b>Figure 19 :</b> Concentrations de chaque substrat lors de l'inhibition de 50% de l'activité du DPPH.....	43

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Quelques classes de composés phénoliques.....	04
<b>Tableau 02</b> : Structure de base et principaux acides hydroxybenzoïques.....	05
<b>Tableau 03</b> : Structure de base et principaux acides hydroxycinnamiques.....	05
<b>Tableau 04</b> : Structure de base de coumarine et ses principaux types .....	06
<b>Tableau 05</b> : Structure de base et principales classes des flavonoïdes .....	08
<b>Tableau 06</b> : Liste de quelques espèces réactives.....	17
<b>Tableau 07</b> : Appareillage utilisé dans notre étude.....	29
<b>Tableau 08</b> : Produits et réactifs utilisés.....	29
<b>Tableau 09</b> : Rendement des différents extraits de plante.....	39
<b>Tableau 10</b> : Teneur des extraits en polyphénols totaux. ....	41
<b>Tableau 11</b> : Teneur des extraits en flavonoïdes.....	42

# **INTRODUCTION**

## **Introduction :**

Depuis l'antiquité, les plantes médicinales jouent un rôle déterminant dans la conservation de la santé des hommes et dans la survie de l'humanité (PIERRE, 2001; MACHIEX *et al.*, 2005).

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles comme remède à diverses maladies humaines. Ces plantes doivent leur pouvoir thérapeutique à des composés, dits alors actifs (principes actifs), qu'elles renferment. Parmi ces composés potentiellement intéressants, les composés phénoliques qui sont particulièrement utilisés comme antioxydants dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé (HIRASA et TAKEMASA, 1998). Notons aussi leurs diverses propriétés biologiques comme les activités antiallergique, anti-arthérogénique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective, vasodilatatoire...etc (MIDDLETON *et al.*, 2000 ; KSOURI *et al.*, 2007; NIJVELDT *et al.*, 2001).

Au continent africain, plus de 90% des plantes médicinales sont utilisées dans la médecine traditionnelle (OMS, 2003). L'Algérie dispose d'une grande diversité floristique en particulier saharienne spontanées à des utilisations thérapeutiques très intéressantes (HAMZAA *et al.*, 2010).

Le thym et le romarin font partie des plantes médicinales largement utilisées en Algérie, surtout en médecine traditionnelle (MAHMOUDI *et al.*, 2013). La valeur thérapeutique de ces plantes est relative à leurs métabolites secondaires, notamment les huiles essentielles et les composés phénoliques, dont la concentration de ces molécules peut varier d'une plante à une autre et d'un organe à un autre de la même plante (BENARIBA *et al.*, 2013; El HACI *et al.*, 2012; ATMANI *et al.*, 2009).

Ce présent travail, consiste en une contribution à la réalisation d'une étude comparative :

- ✓ Du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des deux extraits éthanoliques du thym et du romarin obtenus dans les mêmes conditions de préparation, d'extraction et de dosage.
- ✓ De l'activité antioxydante des deux extraits par évaluation du pouvoir piègeur des extraits vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH).

Notre travail est organisé en deux parties ;

La première est une synthèse bibliographique qui comporte deux (02) chapitres ;

Chapitre I : les composés phénoliques

Chapitre II : les oxydants et les antioxydants naturels

La deuxième partie ; c'est une étude expérimentale aboutissant aux résultats et discussion (interprétation et comparaison des résultats obtenus avec d'autres résultats).

**PARTIE: SYNTHÈSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# CHAPITRE I

Les composés phénoliques

**VI- Présentation des composés phénoliques :**

Les composés phénoliques (ou polyphénols) constituent une famille de molécules largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ils sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (BELKHIRI, 2009).

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toute substance chimique possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées (BOUAYED, 2007).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, ou d'un tissu particulière (NKHILI, 2009).

**VII- 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 (KESKAS, 2011).

La plupart des composés phénoliques sont 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 01 décrit par MAAMRI (2008).

Tableau 01 : Quelques classes de composés phénoliques, (MAAMRI, 2008)

Structure	Classe
C <sub>6</sub>	phénols simples
C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	acides benzoïques et composés voisins
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acétophénones et acides phénylacétique
C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	acides cinnamiques et composés voisins
C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	coumarines, isocoumarines et chromones
C <sub>15</sub>	chalcones, aurones, dihydrochalcones
C <sub>15</sub>	flavanes, flavones, flavanones, flavanols, anthocyanines, anthocyanidines
C <sub>30</sub>	biflavonyles
C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub> , C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	benzophénones, xanthones, stiblènes
C <sub>6</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>14</sub>	benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones
C <sub>18</sub>	betacyanines, betaxanthines
Lignianes, neolignanes	dimères ou oligomères
Lignines	polymères
Tannins	oligomères ou polymères
Phlodaphènes	polymères

### VIII- Principales classes des composés phénoliques :

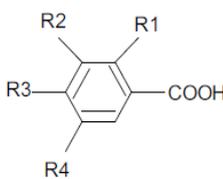
Les différentes classes de polyphénols peuvent être distinguées en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (MACHEIX *et al.*, 2006).

#### III-1. Polyphénols monomériques (simples) :

**III-1.1. Les acides phénoliques :** Cette classe est divisée en deux sous-classes

c) **Acides hydroxybenzoïques :** D'après SARNI-MANCHADO et CHEYNIER (2006), les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque, ils ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) qui est souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau 02.

**Tableau 02:** Structure de base et principaux acides hydroxybenzoïques (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006)

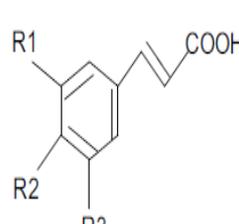
Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

d) **Hydroxycinnamiques :**

Selon SARNI-MANCHADO et CHEYNIER (2006), les Acides hydroxycinnamiques sont des dérivés de l'acide cinnamique, ils ont une structure générale de base de type (C6-C3) et existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau 03 représente les principaux acides hydroxycinnamiques.

**Tableau 03 :** Structure de base et principaux acides hydroxycinnamiques

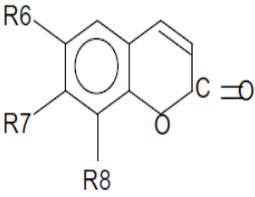
(SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006)

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

III-1.2. Les coumarines :

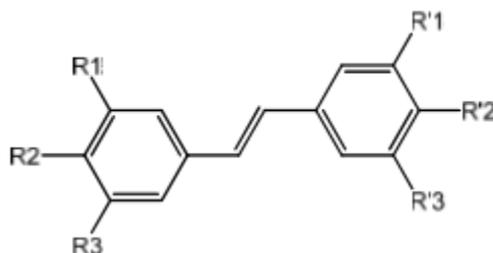
Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2- hydroxy-7-cinnamiques (BENAYACHE, 2005). Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau (BRUNETON, 1999).

Tableau 04 : Structure de base de coumarine et ses principaux types (MACHEIX et al., 2005)

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

III-1.3. Les stilbènes :

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison (figure 01), Le resvératrol et le ptérostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress, Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes oxydase et les peroxydases (PERRET, 2001).



- R1 = R3 = R'2 = OH, R2 = R'1 = R'3 = H : resvératrol
- R1 = R3 = OCH3, R2 = R'1 = R'3 = H, R'2 = OH : ptérostilbène
- R1 = glucose, R2 = R'3 = OH, R2 = R'1 = OH, R'2 = OCH3 : rhapontine
- R1 = glucose, R2 = R'1 = R'3 = H, R3 = R'2 = OH : picéide

Figure 01: Structure de base des stilbènes et ses principaux types (PERRET, 2001).

### III-1.4. Les flavonoïdes :

#### III-1.4.1. Généralités:

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (KARAALI et *al.*, 2004 ; MALESEV et KUNTIC, 2007).

Les flavonoïdes représente une très large gamme de composés phénoliques, plus de 5000 composés ont été décrits (FERGUSON, 2001). Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux (ONO et *al.*, 2006).

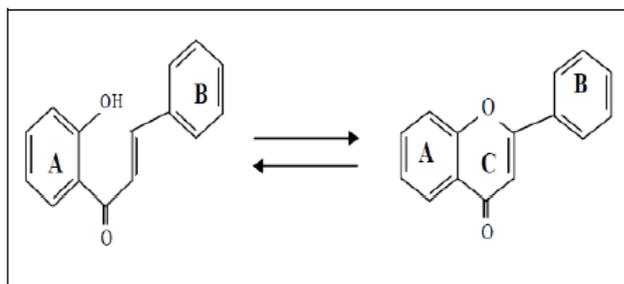
La contribution des flavonoïdes au régime alimentaire humaine sous forme fruits, légumes et boissons est très importante; également ils ont été utilisés en médecine traditionnelle à base de plantes riche en flavonoïdes. Cette importance liée par leur structure chimique à caractère antioxydante (ONO et *al.*, 2006).

#### III-1.4.2. Structure :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones(C15) constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (BENAYACHE, 2005).

Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6, qui forme une structure de base des flavonoïdes appelée le noyau flavone (2-phenyl-benzo- $\gamma$ -pyrane), mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié. (KRISHNA et *al.*, 2001).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane (Figure 02). Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (KRISHNA et *al.*, 2001 ; NARAYANA, 2001; MALESEV et KUNTIC, 2007)

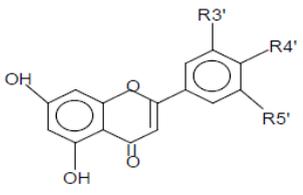
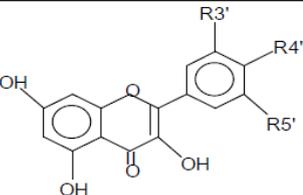
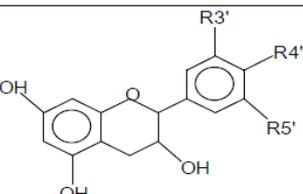
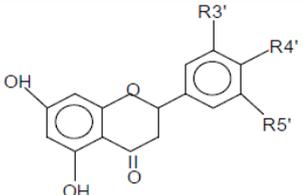
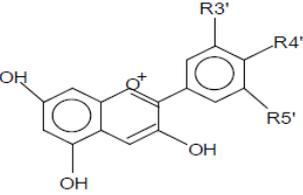
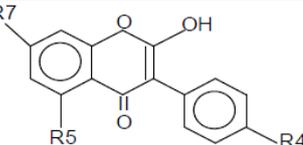


**Figure 02:** Structure de base d'un flavonoïde (HELLER et FORKMANN, 1993).

III-1.4.3. Classification :

Les principales classes des flavonoïdes sont représentées dans le tableau 05.

Tableau 05 : Structure de base et principales classes des flavonoïdes (NARAYANA et al., 2001)

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genistéine
		H	O-Glu	OH	Daïdezine

### III-2. Polyphénols sous forme de polymères (complexes):

#### III-2.1. Les tannins :

##### III-2.1.1. Généralités :

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes) (HAGERMAN et BUTLER, 1981).

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités (HARBORNE et *al.*, 2009).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (LARWENCE et *al.*, 1984).

##### III-2.1.2. Types et structures des tannins:

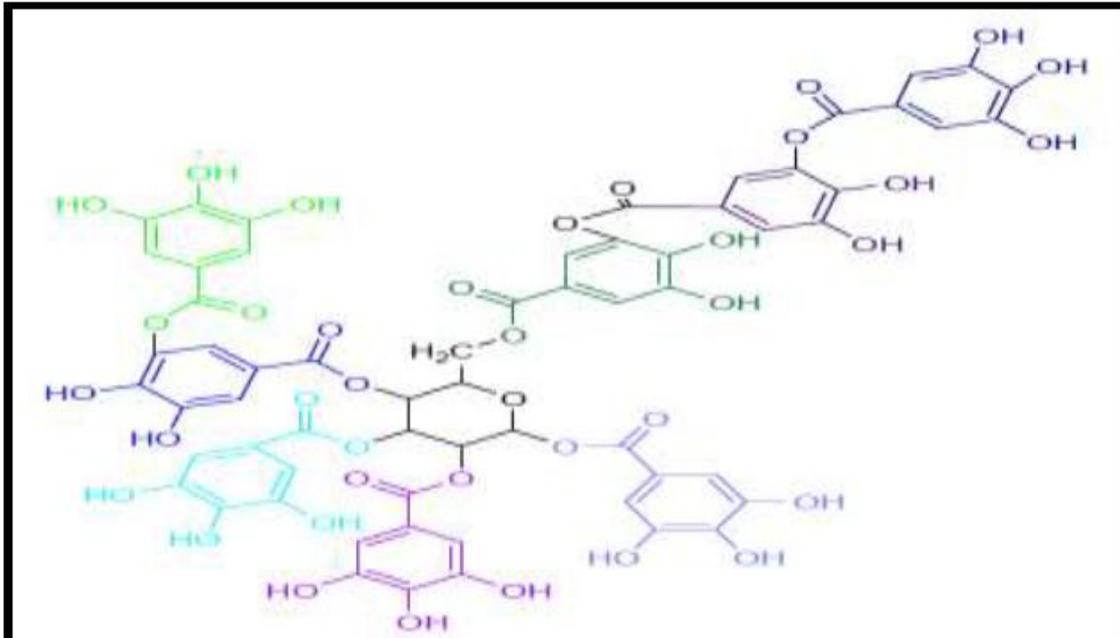
Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

###### c) Tannins hydrolysables :

Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de *gallotannins*. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C3 de l'acide gallique. Les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : *ellagitannins*.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres) (SEIGLER, 1998).

L'acide gallique provient de la  $\beta$ -oxydation des composés C6-C3, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur (SEIGLER, 1998).



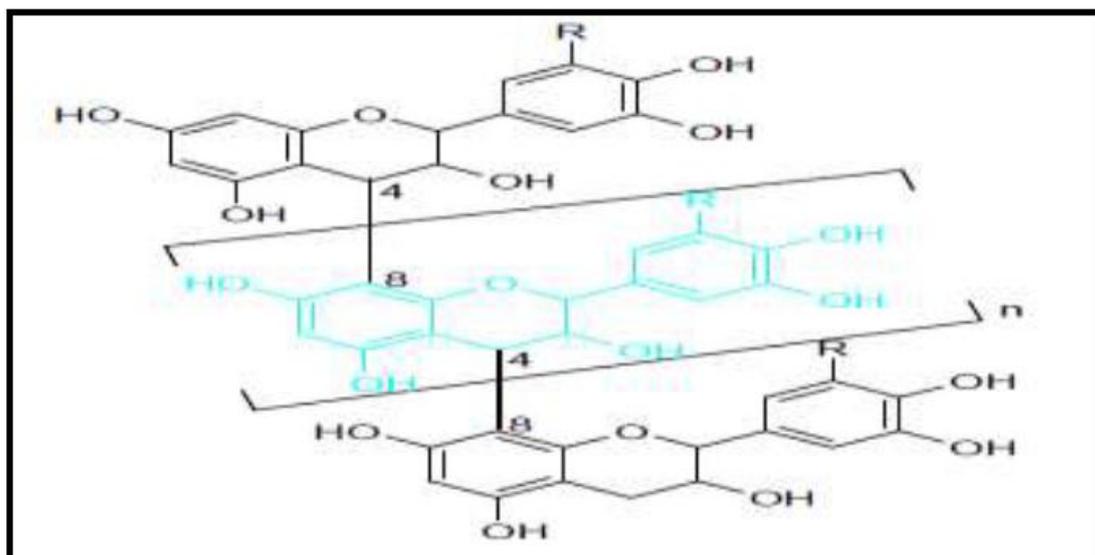
**Figure 03:** Structure générale de tanins hydrolysables (HAGERMAN et BUTLER, 1981).

d) **Tannins condensés :**

Ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (ANDERSEN et MARKHAM, 2006).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénoliques simples comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (ANDERSEN et MARKHAM, 2006).

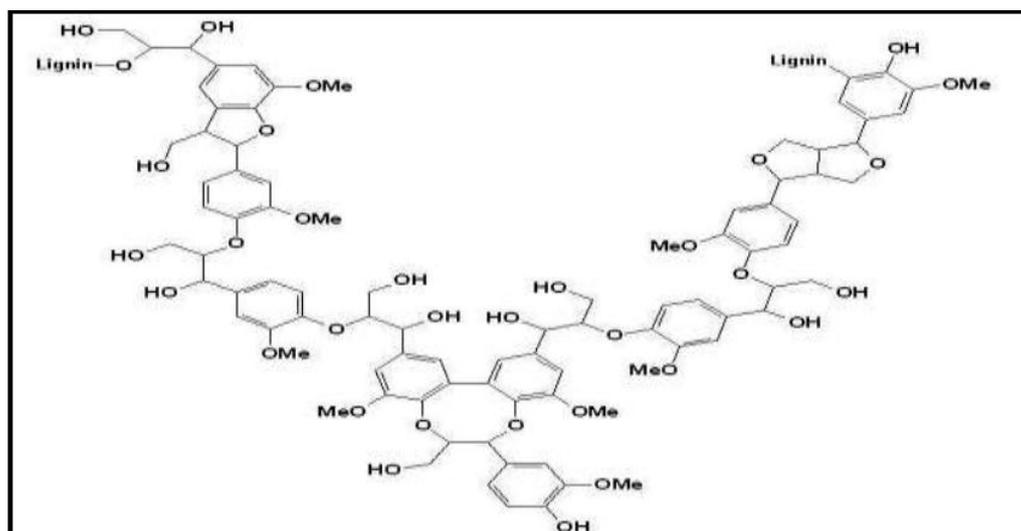


**Figure 04:** Structure générale de tanins condensés (HAGERMAN et BUTLER, 1981).

### III-2.2. Les lignines :

C'est l'un des polymères biosources les plus abondants sur Terre, elle constitue de 15 à 40% de la matière sèche des arbres et de 5 à 20% des tiges des plantes annuelles. C'est également le polymère aromatique naturel le plus abondant (PRIVAS, 2012). Subissant les contraintes de la gravité, la lignine est apparue afin notamment de rigidifier les parois cellulaires (CRUZ *et al.*, 2001).

Le rôle des lignines dans l'évolution des végétaux, ils forment une barrière mécanique, de goût désagréable, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi, les lignines participent à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores, la lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure (MURRY *et al.*, 1982).



**Figure 05 :** Structures générale de la lignine (SCALBERT et WILLIAMSON, 2000).

**IX- Quelques propriétés des composés phénoliques chez les animaux :**

Les polyphénols (spécialement les flavonoïdes) sont des produits nutraceutiques, c'est-à-dire n'ont pas une valeur calorique mais ont un rôle fondamental pour ce qui concerne la prévention de certaines pathologies (TEISSEDRE et *al.*, 2007).

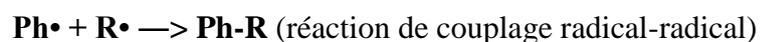
Le rôle nutraceutique des flavonoïdes s'inscrit dans le cadre de ce que l'on appelle la nouvelle pharmacie qui consiste à faire un traitement préventif et non curatif, il vaut mieux que le médicament soit déjà présent dans l'organisme prêt à la défense apporté sous forme des aliments fonctionnels capables de procurer des bienfaits physiologiques démontrés ou de réduire les risques des maladies chroniques, en plus de remplir leurs fonctions nutritionnelles de base dont la consommation des fruits et des légumes riches en composés bioactifs peut être une stratégie de prévention réaliste contre de nombreuses maladies majeures. (TEISSEDRE et *al.*, 2007).

**IV-1. Propriétés antiradicalaire :**

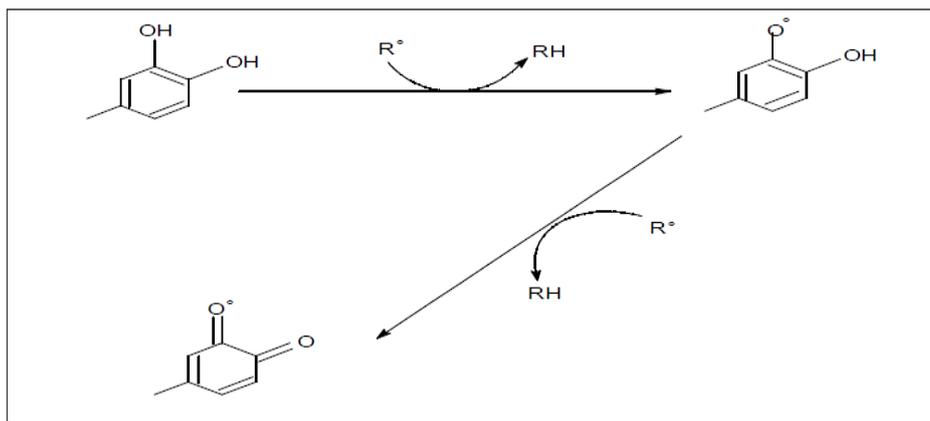
Les composés phénoliques sont capables de piéger les radicaux libres en formant des composés oxydés moins réactifs (figure 06), cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un composé oxydé (Ph•) ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•; en outre les radicaux oxydés peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (AMIC et *al.*, 2003).



**Ph** : composé phénolique



**Figure 06 :** Piégeage des espèces réactives dérivées de l’oxygène ( $R^\bullet$ ) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (TIQWARI, 2001).

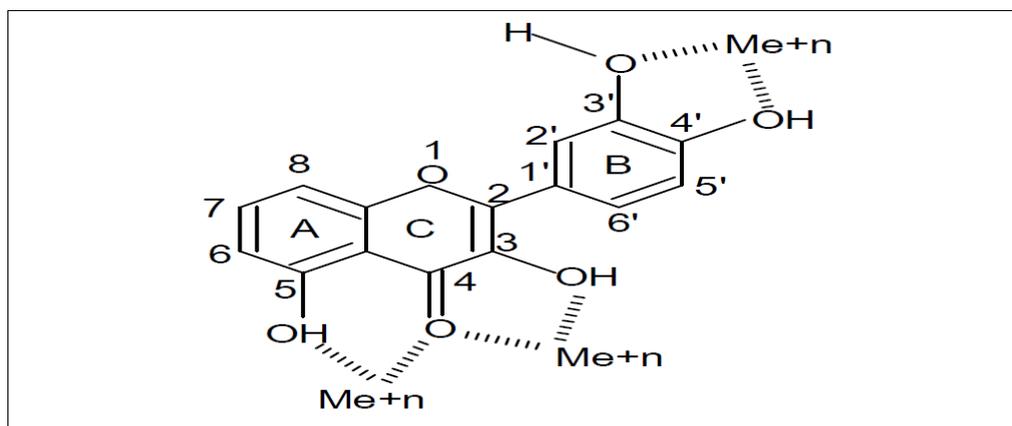
#### IV-2. Propriétés chélatrices des ions métalliques :

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple  $Cu^{+2}$  est un stimulateur de la peroxydation des lipides insaturés ou lipides à double liaison (LDL) (TIQWARI, 2001).

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs (MALESEV et KUNTIC, 2007)

La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C



**Figure 07:** Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques ( $Me^{+n}$ ) (TIQWARI, 2001).

**IV-3. Propriétés antibactériennes :**

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire (COWAN, 1999).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésions microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (COWAN, 1999).

**IV-4. Propriétés anticancéreuses :**

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (PINCEMAI et DEFRAIGNE, 2004).

Des études montrent que certains composés phénoliques particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon remarquable la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose.

Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate, ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques FAS (Fatty Acid Synthase) (BRUSSELMANS *et al.*, 2005).

Les travaux réalisés par Mahmoud *et al* (2000) in (Depeint *et al*, 2002) montraient que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement.

La quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toute fois BRUSSELMANS *et al.* (2005), signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

**IV-5. Propriétés anti inflammatoires :**

Une inflammation par définition est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression (infection, brûlure, allergie...) qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur qui semble pulser ... (MARFAK, 2011).

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS) (MARFAK, 2011), bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs (NIJVELDT et *al.*, 2001), car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion superoxyde conduisant à la formation de peroxynitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer (TSAI, 2004).

De nombreuses études semblent indiquer que certains composés phénoliques possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique (durcissement des artères) en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (GONZALEZ-GALLEGO et *al.*, 2007) Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (TAPAS et *al.*, 2008).

**IV-6. Propriétés antivirales :**

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale des cellules en culture, une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral :

- ✓ Au niveau de l'adsorption du virus sur la cellule hôte
- ✓ Au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte
- ✓ Au niveau de la de réplication du virus et la synthèse des protéines virales
- ✓ Au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (BYLKA et *al.*, 2004). La quercétine, apigénine, catéchine et

hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (TAPAS *et al.*, 2008)

**IV-7. Propriétés antiallergiques :**

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des composés phénoliques sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (MARFAK, 2011).

**X- Quelques propriétés des composés phénoliques chez les végétaux :**

Dans le règne végétal, ces substances sont souvent impliquées dans les mécanismes de défenses élaborés par les végétaux contre la prédation par des insectes, des herbivores (UCCELLA, 2001). Outre, les composés phénoliques seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation... (OZKAYA et CELIK, 1999 ; MALIK et BRADFORD, 2006). Les composés phénoliques sont aussi responsable des propriétés sensoriels des plantes tel que la couleur, le goût et parfois l'odeur (PARK et CHA, 2003; SUBSAMANIAN *et al.*, 2007 ; YANG *et al.*, 2008).

Selon SUBRAMANIAN *et al.* (2007), ils sont également impliqués dans

- ✓ Les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales,
- ✓ Protègent les plantes contre les radiations UV ;
- ✓ Agissent comme des pigments ou des co-pigments ;
- ✓ Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire ;
- ✓ Agissent sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits ;
- ✓ Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores

# CHAPITRE II

Les oxydants et les antioxydants

**I- Les oxydants (radicaux libre) :**

**I-1. Définition d'un radical libre :**

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (DACOSTA, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, qui se forment suite à une réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule (NKHILI, 2009).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive ; elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$ , radical hydroxyl  $OH^{\bullet}$ , monoxyde d'azote  $NO^{\bullet}$ , (Tableau 06) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulier  $1O_2$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , peroxyde nitrite  $ONOO^-$  (FAVIER, 2003).

**Tableau 06:** Liste de quelques espèces réactives (AROCKIARAJ *et al.*, 1997)

Espèces Réactives d'Oxygène (radicaux primaires)	Espèces non radicalaires (radicaux secondaires)
$O_2^{\bullet}$ Superoxyde	$H_2O_2$ Peroxyde d'hydrogène
$OH^{\bullet}$ Hydroxyle	$ROOH$ Peroxide organique
$ROO^{\bullet}$ Peroxyle	$ONOO^-$ Peroxynitrite
$RO^{\bullet}$ Alkoxyde	$O_2NOO^-$ Peroxynitrate
$NO^{\bullet}$ Oxyde nitrique	$NO_2Cl$ Chlorure de nitrile
$NOO^{\bullet}$ Dioxyde de nitrogène	$HNO_2$ Acide nitreux
$NO_3^{\bullet}$ Nitrate	$ClO_2$ Dioxyde de chlore
$CO_3^{\bullet}$ Carbone	

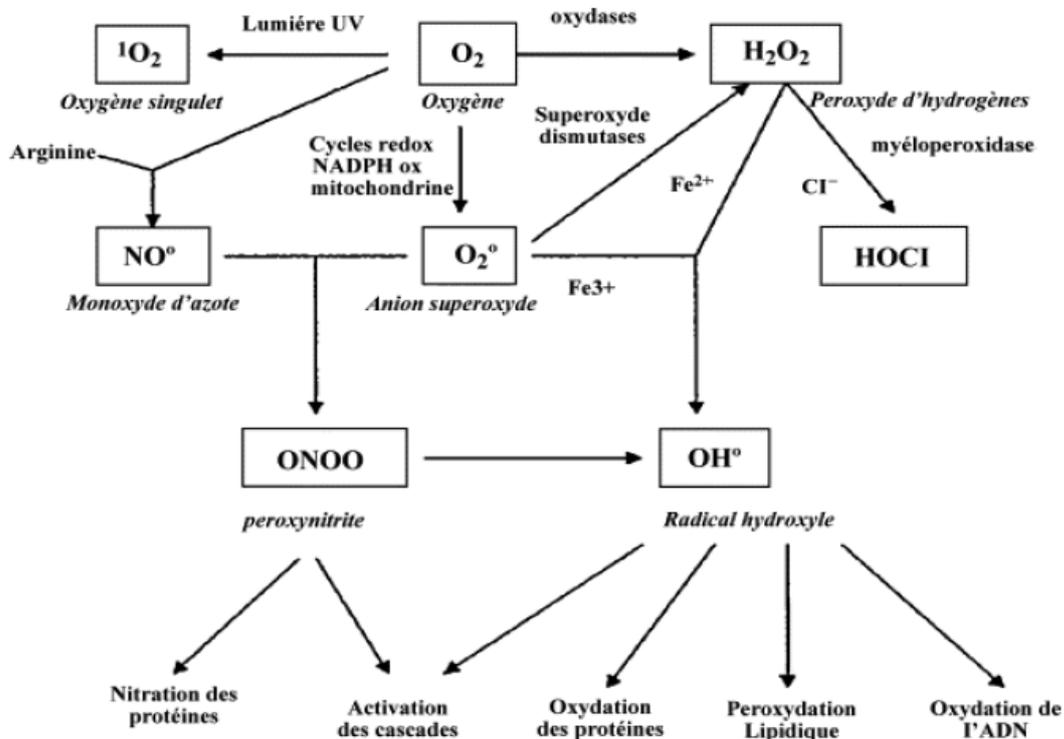
**I-2. Origine des radicaux primaires :**

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques (Figure 08) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée (apoptose) (GAUTHURET, 2004).

Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (GAUTHURET, 2004).

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres (GAUTHURET, 2004).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux. L'infection au VIH a pour effet d'accroître la production de radicaux libres dans l'organisme (CILLARD, 2006).



**Figure 08 :** Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène (CILLARD, 2006 ).

**I-3. Phases de l'oxydation :**

Traditionnellement, on décrit l'oxydation en trois phases distinctes, mais pratiquement simultanées (CAVERO et *al.*, 2005):

**a) Initiation** (formations d'hydroperoxydes) :

L'oxygène n'oxyde pas directement les molécules. Le mécanisme réactionnel initial peut être initié par la chaleur, les UV ou les ions métalliques. De même, l'oxygène triplet, stable, peut être activé en oxygène singulet, réactif, par l'intermédiaire d'un photosensibilisateur. La phase d'initiation aboutit donc à la formation d'espèces très réactives.

**b) Propagation :**

- Destruction des hydroperoxydes et apparition des composés responsables des goûts et odeur de rance.
- La liaison O-O dans un hydroperoxyde est faible et peut être facilement rompue.
- Les deux dernières réactions sont en boucles, ce qui explique que des traces d'ions métalliques suffisent à générer une grande quantité de radicaux libres.
- Les espèces radicalaires produites par les premières réactions sont hautement réactives et vont à leur tour arracher un hydrogène à une autre molécule ou réagir avec un oxygène triplet.

**c) Terminaison** (arrêt) :

- Apparition de nouvelles espèces moléculaires anarchiques.
- La chaîne de propagation peut s'arrêter par la formation de polymères ou au contact avec un autre radical. Les molécules créées n'ont plus de fonction biologique.

## II- Les antioxydants :

### II-1. Définition des antioxydants :

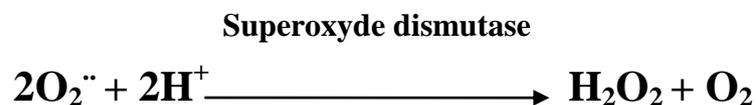
Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (FAVIER, 2003).

Les défenses antioxydantes reposent sur des systèmes enzymatiques : superoxyde dismutases (SOD), catalases et glutathion peroxydases ; et non enzymatiques comme les vitamines, les caroténoïdes, les polyphénols,...etc(JACOTOT, 1997). Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments : cuivre, manganèse, zinc et sélénium en particulier (JACOTOT, 1997).

### II-2. Défenses enzymatiques :

#### a) Superoxydes dismutases (SOD) :

La SOD catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en dioxygène et  $H_2O_2$  selon la réaction :



Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées de façon biochimique et moléculaire. La Cu/Zn-SOD ou SOD1cytosolique, et la EC-SOD ou SOD3 extracellulaire, qui utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, alors que la SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (AFONSOet *al.*, 2007).

#### b) Catalases :

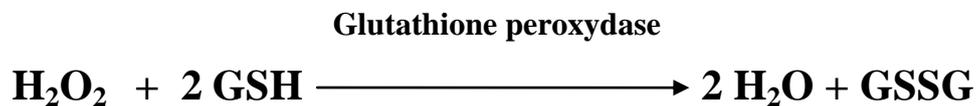
La catalase est l'une des principales enzymes du système antioxydant biologique. Elle joue un rôle important dans les voies de défense antioxydantes. Le site actif de la catalase est l'hémoglobine, et il agit en tant que catalyseur dans la décomposition de  $H_2O_2$  en eau et oxygène moléculaire (AROCKIARAJetal., 1997).



**c) Glutathion peroxydases:**

Les GSHPx, enzymes antioxydantes, constituent l'une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène. Les glutathions peroxydases sont chimiquement différentes mais partagent le même rôle de détoxifiant des espèces réactives de l'oxygène (peroxyde d'hydrogène et hydroperoxydes organiques). Leur activité enzymatique est directement proportionnelle à l'apport en sélénium et il existe donc un lien étroit entre la carence en sélénium et le stress oxydatif (DUCROS et FAVIER, 2004).

Les GSHPx réduisent le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel elles transfèrent l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (GOUDABLE et FAVIER, 1997).

**II-3. Défenses non enzymatiques (antioxydants naturels)**

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les vitamines, les minéraux et autres substances complexes (LOPEZ *et al.*, 2005).

**II-3.1. Les antioxydants simples :****II-3.1.1. Les vitamines :****a) Vitamine C :**

La vitamine C, ou l'acide ascorbique, est un excellent piègeur des DROs et inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de sa forme radicalaire. Ses principales fonctions sont la contribution au fonctionnement du système immunitaire, l'implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges, la protection des composés situés dans les compartiments cellulaires et tissulaires hydrosolubles et la participation dans les mécanismes liés à la métabolisation du fer (HANIFI, 1991).

Cette vitamine est particulièrement sensible à la chaleur, à la lumière, et elle est soluble dans l'eau. Elle est présente dans tous les fruits et les légumes frais, et particulièrement dans l'acérola, les agrumes, le poivron rouge...etc(CHOLEWA *et al.*, 2008).

**b) Vitamine E :**

La vitamine E englobe de nombreux composés y compris les  $\alpha$ -tocophérols,  $\beta$ -tocophérols,  $\gamma$ -tocophérols,  $\delta$ -tocophérol et les tocotriénols. Ces composés visent la protection des lipoprotéines et des membranes cellulaires lorsqu'elles sont transportées par les LDL (lipoprotéines de basse densité), et ensuite distribuées aux cellules par les récepteurs du cholestérol. Les LDL sont un groupe de lipoprotéines qui transportent le cholestérol aux cellules sanguines (CHOLEWA *et al.*, 2008).

La vitamine E constitue l'antioxydant liposoluble le plus abondant du corps et joue un rôle protecteur en neutralisant les radicaux libres. La vitamine E oxydée devient elle-même un radical tocophéroxyyl non toxique lorsqu'elle neutralise un radical peroxyyle (TLILI, 2015).

Les huiles végétales sont les plus riches en vitamine E. Les noisettes et les légumes verts à feuilles (salades, épinards...) sont également de bonnes sources de vitamine E. Cet antioxydant résiste à la chaleur (JACOTOT, 1997).

### II-3.1.2. Les minéraux :

Ils sont indispensables pour le fonctionnement du processus d'antioxydation, ils interviennent comme coenzymes.

**a) Cuivre :** Le cuivre est un oligo-élément indispensable, essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans la synthèse de neurotransmetteurs. Son manque ou son excès a des conséquences sur de nombreux organes, en particulier sur le foie et le cerveau (DOBSON *et al.*, 2010).

**b) Manganèse :** Le manganèse un oligo-élément essentiel, et est nécessaire pour de nombreuses réactions enzymatiques ubiquitaires (se trouvant partout) (PASQUIER, 1995).

**c) Zinc :** Le zinc intervient en tant que cofacteur enzymatique au niveau de la plupart des métabolismes, il contribue à la stabilisation des membranes lipidiques, les tissus en formation étant particulièrement sensibles au stress oxydatif. Il se concentre dans les muscles et les os, mais un apport quotidien est indispensable car l'organisme ne parvient pas à le stocker comme le sélénium, cet oligo-élément est un constituant indispensable à la synthèse d'un antioxydant enzymatique ( la superoxyde dismutase) (FAVIER, 2003).

Les viandes, poissons et fruits de mer contiennent des quantités importantes de zinc. Il est également présent dans les œufs, les fruits et les légumes secs (FAVIER, 2003).

**d) Sélénium:** Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif

des glutathions peroxydases séléno-dépendantes (constituant indispensable des glutathion-peroxydases), et à l'activité biologique antiradicalaire des séléno-protéines (NEVE *et al.*, 1989)

Les sources de sélénium sont les fruits de mer, les abats, les volailles, et les noix du Brésil. Les végétaux en contiennent également, mais les teneurs sont très variables en fonction du sol dans lequel ils ont été cultivés (NEVE *et al.*, 1989)

### II-3.2. Les antioxydants complexes :

#### II-3.2.1. Polyphénols :

Les polyphénols sont des antioxydants complexes avec une importance croissante de la santé publique, en particulier dans les domaines de la nutrition, et de l'épidémiologie. En fonction de leur structure et les caractéristiques physico-chimiques, leurs effets bénéfiques (par exemple, anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-tumoraux) peuvent varier (BRUNETON, 1993). (Voir le chapitre I).

Les polyphénols sont naturellement présents dans les fruits et légumes et plus particulièrement dans le soja, le raisin, la pomme, la myrtille ainsi que dans les plantes médicinales (thé vert. Le thym, le romarin,..) (BRUNETON, 1993).

#### II-3.2.2. Caroténoïdes :

Plus de 600 différents caroténoïdes existent à partir de sources naturelles. Toutefois, la pertinence des caroténoïdes a été historiquement limitée à ceux qui possèdent une activité provitaminique A. L'activité provitaminique A reflète la capacité d'agir en tant que précurseur de la vitamine A comme l'alpha-carotène et le bêta-carotène. La vitamine A est essentielle pour assurer le bon fonctionnement immunitaire et le maintien de la peau, des yeux, des os, des dents et des cheveux (BRUNETON, 1993). Les caroténoïdes, comme le bêta-carotène, le lycopène, la lutéine et la zéaxanthine, forment un groupe d'antioxydants liposolubles qui sont principalement connus comme les pigments colorés des plantes et des microorganismes (Rahman *et coll.*, 2007; Kaur *et Kapoor*, 2001).

Les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydants selon plusieurs mécanismes, ils sont capables de bloquer les chaînes de réactions radicalaires, selon les équations suivantes:

$$BC + ROO \cdot \rightarrow BC-OO \cdot + ROO \cdot \text{ (Produits inactifs) (LOPEZ et al, 2005).}$$

**BC** : βcarotène

Les caroténoïdes sont particulièrement présents dans les carottes, les abricots, le melon, le potiron, les tomates, les œufs et les tagètes (LOPEZ *et al.*, 2005).

**II-4. Mécanismes d'action des antioxydants :**

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (FAVIER, 2006).

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire (FAVIER, 2006).

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur (FAVIER, 2006).

**II.5. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant :**

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (FAVIER, 2003).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (SOHAL et *al.*, 2002).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (KOHEN et NYSKA, 2002).

Selon GAMMOUDI et *al.* (2013), Le stress oxydatif est une circonstance anormale que traversent parfois nos cellules ou un de nos tissus lorsqu'ils sont soumis à un déséquilibre

entre la production des radicaux libres ou pro-oxydants et les systèmes de défenses antioxydantes (Figure 09), ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires.

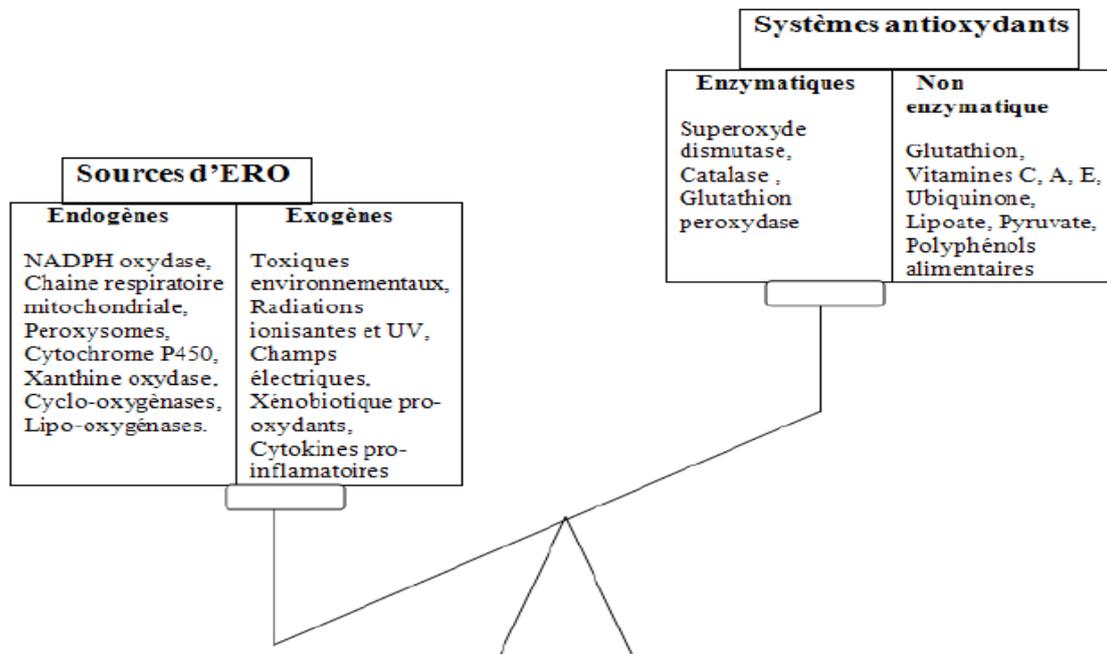


Figure 09: Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant (NKHILI, 2009).

### II-6. Conséquences du stress oxydatif :

Le stress oxydatif est susceptible d’entraîner des dégâts cellulaires qui pourraient être à l’origine de certaines pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson et la maladie d’Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde et le vieillissement accéléré (VALKO et *al.*, 2007; MARTINEZ-CAYUELA, 1995).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l’âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (MOHAMMEDI, 2013).

**a) Oxydation de l'ADN :** Le radical hydroxyle est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN, d'endommager à la fois les bases puriques et pyrimidiques et aussi le squelette désoxyribose. Les modifications permanentes du matériel génétique résultant de ces incidents de "dommages oxydatifs" représentent la première étape impliquée dans la mutagenèse et la cancérogenèse (VALKO et *al.*, 2007; MARTINEZ-CAYUELA, 1995). L’ADN mitochondrial est la cible privilégiée des oxydations par les ERO car il est

dépourvu d'histones et ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire, mais aussi du fait de sa proximité directe de l'une des principales sources d'ERO cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale (SERVAIS, 2004).

**b) Oxydation des protéines :** Les radicaux libres peuvent réagir avec les acides aminés contenant des groupes insaturés ou de soufre tels que la phénylalanine et la cystéine. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport. Ces réactions donnent lieu à des perturbations structurelles dans les protéines, tels que les phénomènes d'agrégation qui sont favorisées par la formation de liaisons disulfures inter et intramoléculaire.

L'oxydation des protéines ainsi, inactive les protéines, augmentent leur hydrophobicité et leur sensibilité à la protéolyse (MARTINEZ-CAYUELA, 1995).

**c) Oxydation des lipides :** Les radicaux, hydroxyle et hydroperoxyde, sont capables d'attaquer les acides gras insaturés des phospholipides et d'autres molécules lipidiques de la membrane, initiant de cette façon, la peroxydation lipidique. Dans ce processus, le radical libre primaire arrache un atome d'hydrogène à partir d'une liaison méthylène de la chaîne de carbone. Le radical produit réagit facilement avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde, qui peut à son tour enlever un atome d'hydrogène d'une autre molécule de lipide permettant la propagation de la chaîne de peroxydation. La peroxydation lipidique provoque de graves dommages à la structure membranaire et, par conséquent, modifie sa fluidité et sa capacité de fonctionner correctement (MARTINEZ-CAYUELA, 1995).

**d) Oxydation des glucides :** Les radicaux peuvent oxyder les monosaccharides, mais ils peuvent également réagir avec des polysaccharides et induire leur dépolymérisation (MARTINEZ-CAYUELA, 1995). Le radical OH. est capable de couper les molécules de sucres (désoxyribose, mannose, glucose) et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant des épaissements membranaires. La cataracte diabétique serait une conséquence de cette liaison. Les radicaux libres de l'oxygène provoquent aussi une fragmentation des polymères comme l'acide hyaluronique, glycosaminoglycane constitué de répétitions d'unités d'acide glucuronique-N-acetylglucosamine et qui maintient la viscosité élevée du liquide synovial. Cependant, dans la polyarthrite rhumatoïde, il est dépolymérisé, sous l'effet des ERO générés par les neutrophiles (PASQUIER, 1995).

**PARTIE :**  
**EXPERIMENTALE**

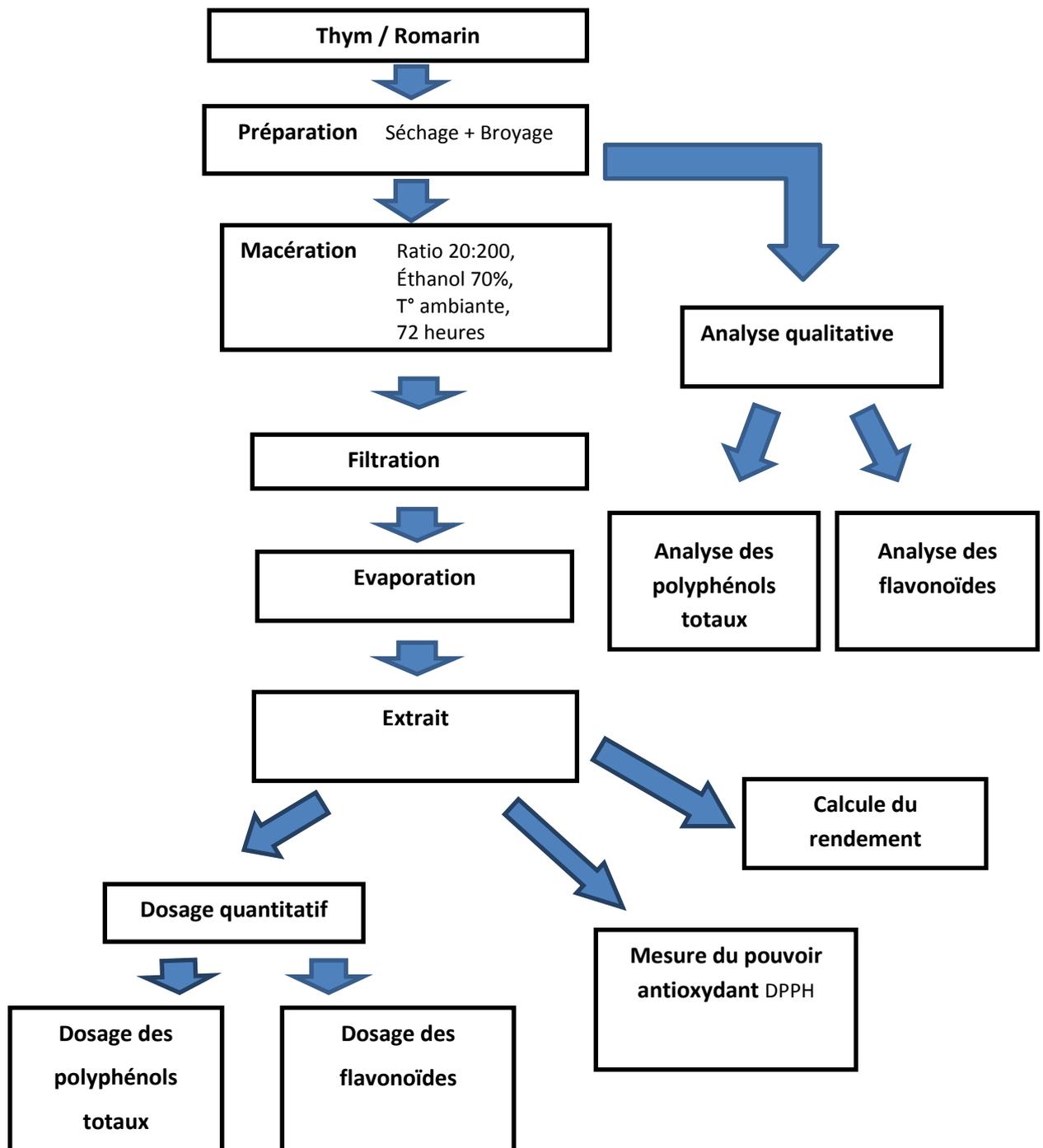
# **CHAPITRE I :**

## **Matériel et méthodes**

L'objectif de notre travail consistait à tester une technique d'extraction des composés phénoliques contenus dans les parties aériennes des plantes (thym et romarin) par macération solide/liquide, en utilisant l'éthanol 70% comme diluant, à température ambiante, pendant 72h.

Notre étude a été réalisée entre la période s'étalant du début Avril à la fin du mois de Mai 2018 au sein du laboratoire Physico- Chimie du département de biologie, Université Ziane Achour – Djelfa.

La réalisation de cette étude s'est déroulée en plusieurs étapes représentées dans la figure 10.



**Figure 10** : Schéma récapitulatif du protocole expérimental (schéma originale).

**I- Matériel végétal :**

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de thym (*Thymus hirtus*) et du romarin (*Rosmarinus tournefortii*) (figure 11).

L'identification botanique de la plante a été réalisée par Dr. GUIT. B. spécialiste en botanique Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie - Université de Ziane Achour, Djelfa.

L'acquisition des plantes nouvellement récoltées a été effectuée au mois de mars 2018 au niveau de du marché de la Wilaya de Djelfa.



**Figure 11 :** Plantes étudiées [(a) *Thymus hirtus*, (b) *Rosmarinus tournefortii*]

(Photos personnelles).

**II- Appareillages utilisés :**

En plus du matériel régulièrement utilisé dans le laboratoire (verrerie, balance électronique, agitateur, ..... ) nous avons utilisé un appareillage résumé dans le tableau suivant.

**Tableau 07 :** Appareillage utilisé dans notre étude

Appareillage utilisé	Marque
Moulin	Moulinex
Rotavapeur	Heidolph
Etuve	Wisd
Bain marie	Julabo
Spectrophotomètre UV-Visible	BECKMAN
Réfrigérateur	Iris

**III- Produits et réactifs utilisés :**

L'ensemble des produits et réactifs utilisés lors des expériences est récapitulé dans le ci-dessus.

**Tableau 08 :** Produits et réactifs utilisés

Produit ou réactif	Formule chimique
Eau distillée	H <sub>2</sub> O
Méthanol	CH <sub>3</sub> OH
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Acétone,	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O
Chlorure d'hydrogène	HCl
Magnésium	Mg
Chlorure de fer	FeCl <sub>3</sub>
Chlorure d'Aluminium	AlCl <sub>3</sub>
Carbonate de sodium	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle)	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Réactif de Folin-Ciocalteu	/
Acide ascorbique	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
Acide gallique	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
Quercétine	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>

#### IV- Etapes d'extraction des composés phénoliques :

##### IV-1. Préparation des plantes:

###### c) Séchage:

Après lavage des parties aériennes des plantes (thym et romarin), afin de les débarrasser de la poussière et d'autres impuretés, elles sont aussitôt séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante, dans le but de préserver au maximum leur intégrité moléculaire (CATIER et ROUX, 2007; HAMMOUDI *et al.*, 2009).

###### d) Broyage:

Une fois séchées, les deux plantes subissent un broyage à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène (Figure 12).

La poudre de chaque plante a été conservée soigneusement dans un endroit sec et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation (HAMMOUDI *et al.*, 2009).



**Figure 12 :** Broyats des deux échantillons (photo personnelle).

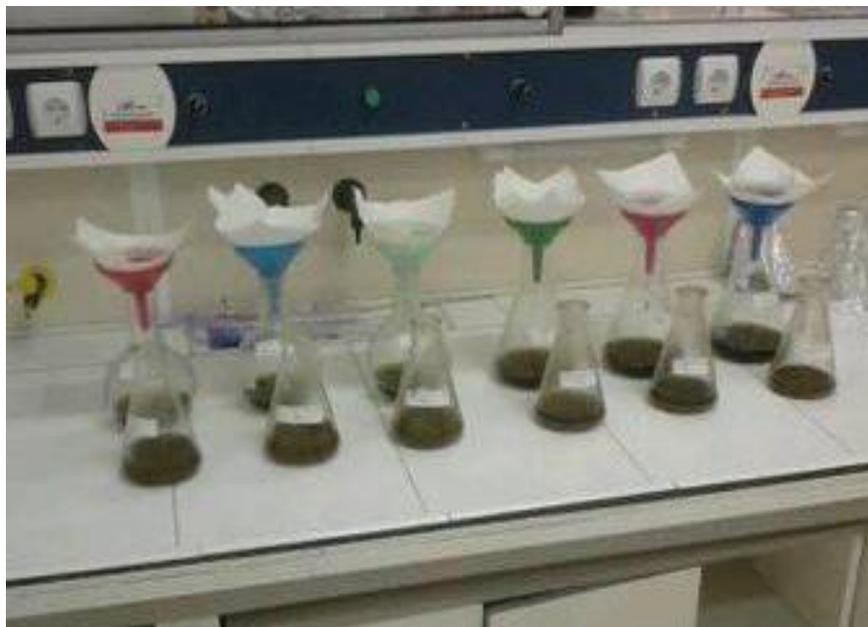
#### IV-2. Macération (extraction solide/liquide) :

La macération (extraction solide-liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans un solvant pendant une période donnée, pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes) (HAMIA *et al.*, 2014).

Le protocole utilisé pour la macération des deux plantes est celui de HAMIA *et al.*, (2014), avec quelques modifications dans le ratio et le solvant.

##### Mode opératoire :

- ✓ Peser 20 gramme de la matière végétale (broyat);
- ✓ Mélanger la poudre avec 200ml d'éthanol 70% dans un Erlenmeyer ;
- ✓ Laisser le mélange macérer pendant 24h avec agitation de temps en temps ;
- ✓ Après 24h, le mélange est filtré sur un papier Wattman (n°1) (Figue 13) ;
- ✓ Récupérer le filtrat dans un récipient, et conserver au froid et à l'abri de la lumière ;
- ✓ Répéter la procédure trois fois (fraction retenue par le filtre dans 200 ml d'éthanol 70%);
- ✓ Les filtrats hydroalcooliques de 3 jours sont placés dans un seul récipient ;
- ✓ Trois répétitions ont été réalisées pour chaque plante.



**Figure 13** : Filtration des macéras (photo personnelle).

### IV-3. Evaporation :

Les six (06) filtrats obtenus ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif, (figure 14) qui permet d'éliminer le solvant sous vide.

Le protocole utilisé pour l'évaporation des filtrats est celui décrit par MOHAMMEDI (2005).

#### Mode opératoire :

- ✓ Placer le filtrat dans le ballon d'évaporation ;
- ✓ Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant ( $T^{\circ} = 45^{\circ}\text{C}$ ) ;
- ✓ Retirer le ballon du rota-vapeur et attendre qu'il soit froid ;
- ✓ Peser le ballon afin de calculer le rendement d'extraction ;
- ✓ Recueillir les extraits de chaque échantillon dans un flacon en verre marron hermétiquement fermé et conserver dans au froid ( $4^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'à leurs analyses.



**Figure 14** : Evaporation du filtrat par un rotavapeur sous vide(photo personnelle)

**V- Détermination du rendement :**

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) (MOHAMMEDI, 2013).

$$R (\%) = (M_{\text{ext}} / M_{\text{éch}}) \times 100$$

Où :

R : le rendement en (%);

M<sub>ext</sub> : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en (g) ;

M<sub>éch</sub> : la masse sèche de l'échantillon végétal en (g).

**VI- Analyse qualitative (test phytochimique) :**

L'étude phytochimique permet de mettre en évidence la présence ou l'absence des métabolites secondaires (polyphénols) des deux extraits par des réactions de changement de coloration ( dosage qualitatif) visible à l'œil nu avant d'effectuer le dosage composés phénoliques totaux et des flavonoïdes (dosage quantitatif).

**VI-1. Préparation des filtrats :**

Avant la réalisation des tests de détection de la présence ou l'absence des composés phénoliques, une préparation des filtrats à partir des broyats de chaque plante (thym et romarin) est réalisée selon la méthode de BOUQUET ET FOURET (1975).

**Mode opératoire :**

- ✓ Peser 400 mg de broyat dans un bécher 250 ml ;
- ✓ Additionner 4 ml de l'eau distillée et 12 ml d'acétone ;
- ✓ Chauffer le mélange dans un bain marie à température 60°C pendant 5 min avec agitation de temps en temps ;
- ✓ Filtrer sur un papier filtre «Type Wathman N°1», et recueillir le filtrat pour les tests phytochimiques.

**VI-2. Mise en évidence des polyphénols totaux (réaction au  $\text{FeCl}_3$ ) :**

Ce test a été réalisé sur les deux filtrats du thym et romarin selon le protocole décrit par BÉKRO et *al.*, (2007).

**Mode opératoire :**

- ✓ Placer 2 ml du filtrat obtenu dans un tube à essai ;
- ✓ Ajouter 1 à 2 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  10%.

La présence des composés phénoliques dans les filtrats est indiquée par l'apparition d'une couleur vert noirâtre.

**VI-3. Mise en évidence des flavonoïdes (réaction à la cyanidine) :**

Ce test a été réalisé sur les deux filtrats du thym et romarin selon le protocole décrit par BÉKRO et *al.*, (2007):

**Mode opératoire :**

- ✓ Placer 2 ml du filtrat obtenu dans un tube à essai contenant de l'alcool chlorhydrique (4 ml éthanol + 1ml HCl concentré) ;
- ✓ Ajouter 2 ou 3 morceaux de magnésium.

La présence des différents types des flavonoïdes dans les filtrats est indiquée par l'apparition d'une couleur rose-orange ou violacée.

**VII- Dosage quantitatif :****VII-1. Préparation des solutions :****h) Solution de DPPH :**

Sous la hotte, dans une fiole de verre marron de 250 ml, une masse 1.9mg (pesée à l'aide d'une balance précise à 0.1 mg près) de DPPH, est mélangée avec une quantité de méthanol suivi d'une agitation jusqu'à sa dissolution totale, ensuite la fiole est rempli jusqu'au trait de jauge (250ml), stocké à l'abri de la lumière et au réfrigérateur en attendant son utilisation.

**i) Solution de Folin-Ciocalteu diluée (10fois):**

Un volume du réactif Folin-Ciocalteu de 1ml est dilué avec 9 ml d'eau distillée. Stocké à l'abri de la lumière dans le réfrigérateur en attendant son utilisation.

**j) Solution de chlorure d'Aluminium hexa hydraté ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 2 % :**

Sous la hotte, dans une fiole de 10 ml une masse de 0.2g (pesée à l'aide d'une balance précise à 1mg près) de chlorure d'aluminium, est mélangée avec une quantité de méthanol suivi d'une agitation jusqu'à sa dissolution totale, ensuite la fiole est rempli jusqu'au trait de jauge (10ml).

**k) Solution de carbonates de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 7.5 % :**

Dans une fiole de 10 ml une masse de 0.75g est pesée à l'aide d'une balance précise (à 1 mg près) de carbonate de sodium, puis mélangé avec une quantité d'eau distillée suivi d'une agitation jusqu'à sa dissolution totale, ensuite la fiole est rempli jusqu'au trait de jauge (10ml).

**l) Solution des substrats utilisés dans le test DPPH:**

La première étape consistait à préparer la solution mère d'une concentration (100µg/ml), pour les produits de référence (l'acide ascorbique comme antioxydant naturel et le Butylhydroxytoluene (BHT) comme antioxydant de synthèse) et pour les extraits du thym et romarin en utilisant le méthanol comme diluant.

La deuxième étape consistait à préparer les dilutions à partir de la solution mère dans des tubes à essai à différentes concentrations (20, 40, 60, 80 et 100µg/ml).

**m) Solution des produits d'établissement de la courbe d'étalonnage de référence:**

- Lors du dosage des polyphénols totaux en utilisant l'acide gallique comme produit de référence et l'eau distillée comme diluant.
- Lors du dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine comme produit de référence et le méthanol comme diluant.

**Mode opératoire :**

La première étape consistait à préparer la solution mère d'une concentration (1mg/ ml), pour chaque produits avec différents diluants (eau ou méthanol) selon le protocole.

La deuxième étape consistait à préparer les dilutions à partir de la solution mère dans des tubes à essai à différentes concentrations (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 et 1mg/ml).

**n) Solution des extraits du thym/ romarin :**

Pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes, des solutions mères d'une concentration de (1g/ml) sont préparés à partir des extraits de thym/ de romarin par différents diluants (eau/ méthanol) selon le protocole, répété trois (03) fois pour chaque extrait.

**Remarque :** chaque solution est fraîchement préparée, au moment de la réalisation du protocole.

## **VII-2. Dosage des polyphénols totaux :**

**d) Principe**

Le réactif Folin Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximal est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (SINGLETON et *al.*, 1999).

**e) Mode opératoire :**

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans des extraits est réalisée par la méthode de (SINGLETON et *al.*, 1999).

200 µl de la solution d'extrait [1g/ml], sont mélangés avec 1000 µl du réactif FC et 800 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5 %. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant dix (10) minutes et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV.

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de thym et de romarin sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard, et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait.

**f) Préparation du Blanc:**

200 µl d'eau distillée sont mélangés avec 1000 µl du réactif FC et 800 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant dix minutes.

**VII-3. Dosage des flavonoïdes :**

**d) Principe :**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (BAHORUN et *al.*, 1996).

**e) Mode opératoire :**

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans des extraits est réalisée par la méthode de (BAHORUN et *al.*, 1996).

1000µl de la solution d'extrait [1g/ml], sont mélangés avec 1000µl chlorure d'Aluminium AlCl<sub>3</sub> à 2%, le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15min. l'absorbance est mesurée à 430nm en utilisant un spectrophotomètre UV visible.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de thym et de romarin sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard, et les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine /g d'extrait.

**f) Préparation du Blanc**

1000µl de méthanol sont mélangés avec 1000µl chlorure d'Aluminium AlCl<sub>3</sub> à 2%. le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15min.

**VIII- Evaluation de l'activité antioxydante par le test du DPPH :**

**c) Principe :**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH<sup>°</sup>) est réalisé par la méthode décrite par AMMAR et *al.* (2009), qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de l'IC50 des substances antioxydantes contenues dans les deux extraits. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H<sup>+</sup>.



Où AH est un composé capable de céder un H<sup>+</sup> au radical DPPH.

C'est une méthode largement utilisée dans l'étude de l'activité antioxydante. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) se caractérise par sa capacité de former des radicaux libres stables. La présence de ces radicaux (DPPH) donne lieu à une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. La réduction des radicaux DPPH par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution (AMMAR et *al.*, 2009).

#### **d) Mode opératoire :**

1950µl d'une solution méthanolique de DPPH (1,9mg/250ml de méthanol) préparée fraîchement dans le méthanol est ajouté à 50µl des extraits à différentes concentrations (20 – 100µg/ml). Le contrôle négatif est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1950µl de la solution méthanolique de DPPH. Après agitation et incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm (ATOUI et *al.*, 2005).

Le pourcentage d'inhibition PI est calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI \%} = \frac{\text{AC} - \text{AE}}{\text{AC}} \times 100$$

Avec : AC : absorbance du contrôle ; AE : absorbance de l'extrait.

# **CHAPITRE II**

Résultats et discussion



### III- Résultats :

#### I-1. Rendement :

Les extraits obtenus à partir de la macération des deux plantes étaient de couleur vert foncé avec une consistance pâteuse pour le thym et marron noirâtre avec une consistance gélatineuse pour le romarin.

Pour chaque plante, nous avons calculé le rendement moyen des extractions. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau 09** : Rendement des différents extraits de plante

Matériel végétal \ Rendement	<b>Thym</b> ( <i>Thymus hirtus</i> )	<b>Romarin</b> ( <i>Rosmarinus tournefortii</i> )
Rendement moyen (g)	3,36 ± 0.18	3,84 ± 0.09
Rendement (%)	16,82 ± 0,88	19,18 ± 0,46

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type, n= 3.

#### I-2. Analyse qualitative :

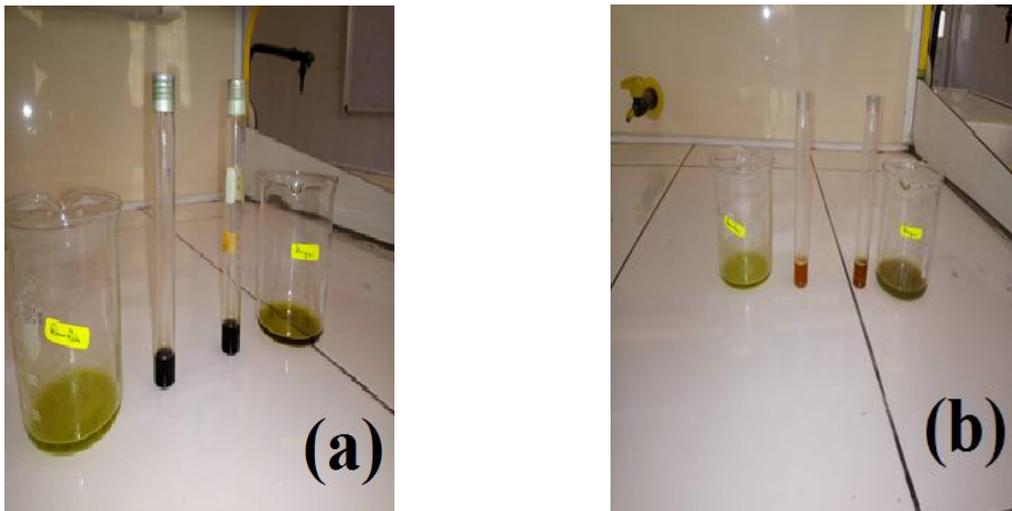
Les tests phytochimiques réalisés sur le thym et le romarin pour la mise en évidence des polyphénols totaux et des flavonoïdes sont présentés ci-dessous.

##### I-2.1. Mise en évidence des polyphénols totaux:

Le test de détection des polyphénols par la réaction au FeCl<sub>3</sub> s'est avéré positif suite à un changement de couleur des extraits du thym et romarin du vert / vert foncé à un vert noirâtre [figure 15 (a)].

##### I-2.2. Mise en évidence des flavonoïdes :

Le test de mise en évidence des flavonoïdes par la réaction à la cyanidine s'est avéré aussi positif, suite à un changement de couleur des extraits du thym et de romarin du vert/ vert foncé à une couleur rose-orange [figure 15 (b)].

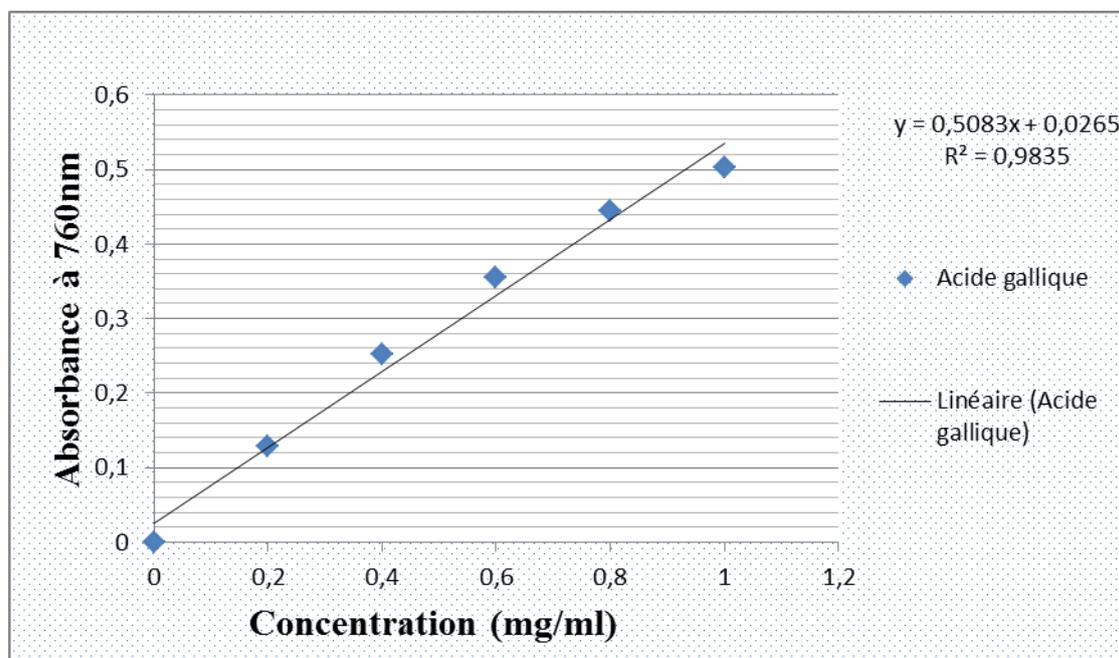


**Figure 15** : Résultats de mise en évidence positifs, [(a) changement de couleur des extraits vers le vert noirâtre, (b) changement de couleur des extraits vers le rose-orange].

### I-3. Dosage quantitatif :

#### I-3.1. Dosage de polyphénols totaux :

La mesure des taux de polyphénols totaux contenus dans les deux extraits a été synthétisée à partir de la droite de la courbe d'étalonnage d'acide gallique à différents concentration (figure 16).



**Figure 16** : Droite de la courbe d'étalonnage d'acide gallique.

La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 760 nm. Les teneurs en polyphénols totaux pour les deux extraits ont été calculés à l'aide de l'équation :

$y = 0,5083 x + 0,265$  avec  $R^2 = 0,9835$  issue de la droite de la courbe d'étalonnage d'acide gallique. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

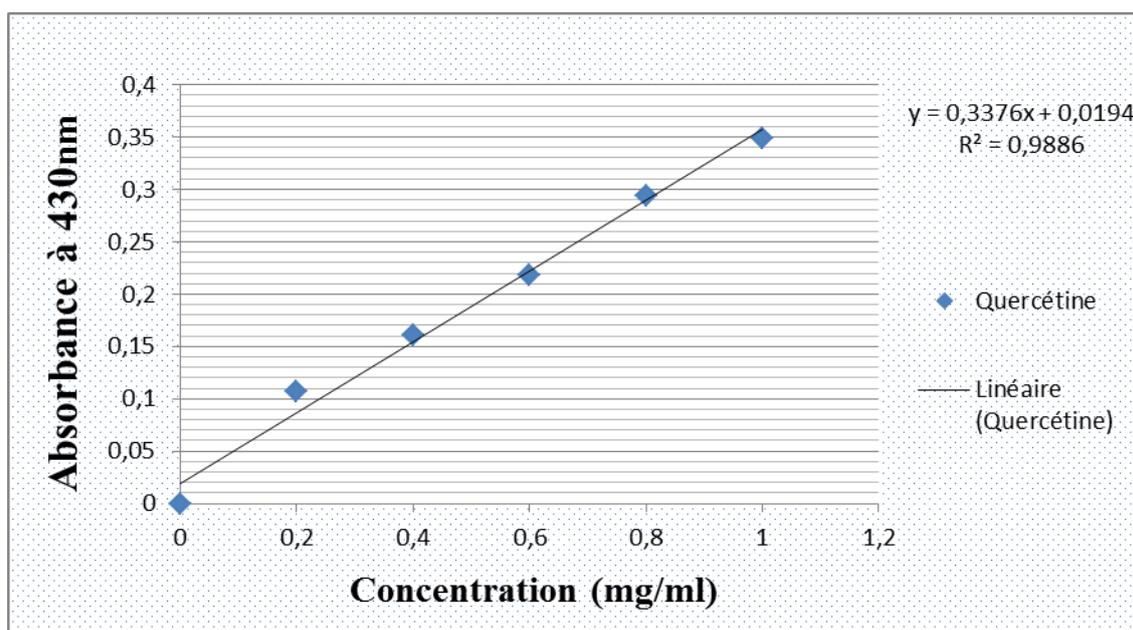
**Tableau 10 :** Teneur des extraits en polyphénols totaux

Matériel végétal	Teneur en polyphénols (mg GAE /g d'extrait)
Thym ( <i>Thymus hirtus</i> )	74,67 ± 13,61
Romarin ( <i>Rosmarinus tournefortii</i> )	182,67 ± 24,11

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type, n= 3.

**I-3.2. Dosage de flavonoïdes :**

La mesure des taux de flavonoïdes contenus dans les deux extraits a été synthétisée à partir de la droite de la courbe d'étalonnage de la quercétine à différents concentration (figure 17).



**Figure 17:** droite de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

La mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 430nm. Les teneurs en flavonoïdes pour les deux extraits ont été calculés à l'aide de l'équation :

$y = 0,3376x + 0,0194$  avec  $R^2 = 0,9886$  issue de la droite de la courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

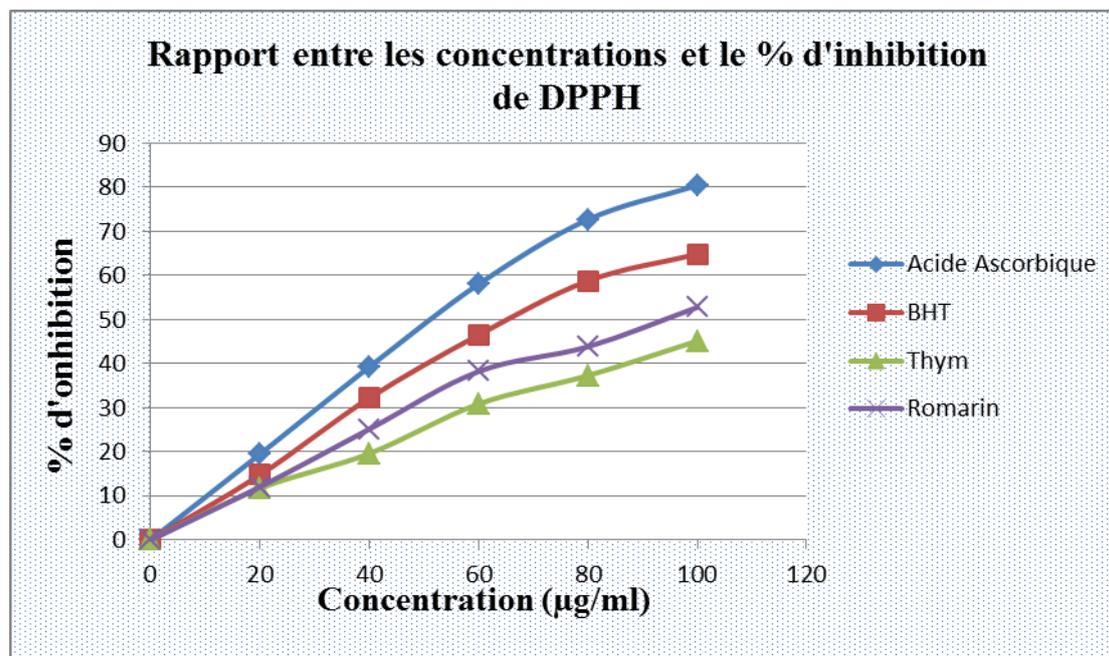
**Tableau 11** : Teneur des extraits en flavonoïdes

Matériel végétal	Teneur en polyphénols (mg QE/g d'extrait)
Thym ( <i>Thymus hirtus</i> )	8 ± 1,00
Romarin ( <i>Rosmarinus tournefortii</i> )	13 ± 2,08

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type, n= 3.

#### I-4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :

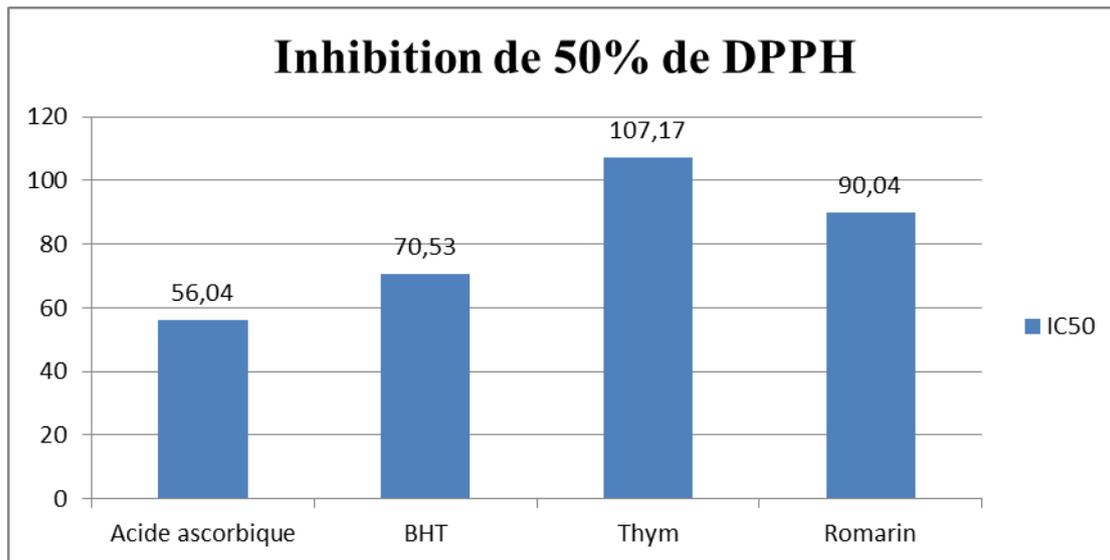
L'inhibition (ou la décoloration de la solution méthanolique de DPPH) du radical DPPH est en fonction des concentrations des différents extraits utilisés (thym et romarin) et des témoins (acide ascorbique et BHT) (20, 40, 60, 80 et 100µg/ml) (figure 18).



**Figure 18:** Courbes de % d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations.

L'activité antioxydante des extraits et des témoins est exprimée en IC50, qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH (figure 19).

Plus la valeur de l'IC50 est petite plus le substrat est considéré comme un antioxydant puissant.



**Figure 19** : Concentrations de chaque substrat lors de l'inhibition de 50% de l'activité du DPPH.

## IV- Discussion :

### II-1. Rendement :

Les résultats obtenus (tableau 09), montrent une différence entre le rendement d'extraction des deux plantes. Le romarin possède un rendement d'extraction plus élevé que le thym avec des valeurs enregistrées de 16,82% et 19,18 pour le thym et le romarin, respectivement.

Nos résultats sont inférieurs à ceux reportés par YAKHLEF (2009) et EL-AZRAK (2017) qui ont obtenus un rendement d'extraction de 20,05 et de 34,36 % pour le thym et le romarin respectivement. Cependant, nos résultats sont supérieurs à ceux reportés par FADILI *et al.* (2015) et KAHOULI (2010) qui ont obtenus un rendement d'extraction de 13,60 et de 13,90% pour le thym et le romarin, respectivement.

Les différences des résultats de rendement (entre les deux plantes étudiées elles-mêmes, ainsi que ceux retrouvés par d'autres auteurs) sont dues à plusieurs facteurs liés essentiellement à deux acteurs principaux:

✓ **La plante** : l'origine des plantes et leurs variétés, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante et la durée de conservation (PARK et CHA, 2003).

✓ **Les conditions de préparation et d'extraction de ces composés** : solvant, diluant, épuisement, température, la pression,...etc (EBRAHIMZADEH *et al.*, 2008).

## II-2. Dosage de polyphénols totaux et de flavonoïdes :

La teneur moyenne en polyphénol du *R. tournefortii* est largement supérieure à celle de *T. hirtus*, qui sont respectivement de  $182.67 \pm 24.11$  et de  $74.67 \pm 13.61$  mg GAE/g d'extrait (tableau 10).

Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés par FADILI et al. (2015), qui ont reportés une teneur en polyphénols totaux pour le romarin de 185.71 mg GAE /g d'extrait méthanolique à 80%. Cependant, nos résultats sont largement supérieur aux résultats retrouvés par HARRAR (2012) et ZEGHAD (2008), et qui ont reportés une teneur en polyphénols totaux pour le romarin de 36mg GAE /g d'extrait aqueux de *R. alaterus* , et de 10.42mg GAE /g d'extrait éthanolique de *R. officinalis*, respectivement.

Concernant la teneur en polyphénols du thym, YAKHLEF (2009) a reporté une valeur proche de nos résultat avec une teneur en polyphénols de 67.63 mg GAE /g d'extrait aqueux de *T. vulgaris*. Par contre, FADILI et al. (2015) a trouvé un résultat nettement supérieur au nôtre et qui est de 99.16 mg GAE /g d'extrait méthanolique à 80% de *T. satureioides*. En revanche notre résultat est supérieur à celui trouvé par ZEGHAD (2008), qui est de 09.07 mg GAE /g d'extrait éthanolique de *T. vulagaris*.

La teneur moyenne de *R. tournefortii* en flavonoïdes est supérieure à celle de *T. hirtus* qui sont respectivement de 13 et 8 mg QE /g d'extrait (tableau 11).

Le résultat obtenu concernant la teneur en flavonoïdes de *R. tournefortii* est nettement supérieur au résultat trouvé par HARRAR (2012), qui est de 6mg QE /g d'extrait méthanolique de *R.alaternus* et celui trouvé par ZEGHAD (2008), qui est de 8.33mg QE /g d'extrait éthanolique de *R.officinalis*.

Pour la teneur de *T. hirtus* en flavonoïdes ZEGHAD (2008), a trouvé une valeur assez proche de la nôtre qui est de 8.56 mg QE /g d'extrait éthanolique de *T. vulgaris*.

D'un autre côté, nôtre résultat est supérieur à ceux trouvés par YAKHLEF (2009), qui sont respectivement de 7.68 et 1.20mg QE /g d'extrait méthanolique et aqueux de *T. vulgaris*.

Les différences de quantités de composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) contenues dans les extraits des plantes étudiées elles-mêmes, ainsi que celles retrouvées par d'autres auteurs sont dues :

En plus des facteurs liés à la plante (origine des plantes et leur variétés, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique,...etc) PARK et CHA (2003), et les conditions de préparation, et d'extraction de ces composés (solvant, diluant, épuisement, température, la pression,...etc) (EBRAHIMZADEH et al. (2008), il est nécessaire de signaler l'interférence du composé recherché avec d'autres produits utilisés lors du dosage, ce qui influe sur les résultats finaux, à titre d'exemple la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique.

Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines... etc (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006; VUORELA, 2005).

Le solvant d'extraction élu des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (DJERIDANE et al., 2007). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (TAWAHA et al., 2007).

### II-3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits :

A des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés à savoir ; l'acide ascorbique et le BHT et qui ont montrés une meilleure activité antiradicalaire par rapport à nos deux extraits. Nos résultats montrent d'une part que l'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique est plus puissante que celle du BHT avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 56.04 et 70,53 µg/ml, respectivement. Alors que l'activité antiradicalaire du romarin est importante que celle du thym avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 90,04 et 107.17 µg/ml, respectivement (figure 19).

En comparant nos résultats avec d'autres résultats, on constate que FADIL et al. (2015), a trouvé des valeurs de IC<sub>50</sub> très proches des nôtres, avec un IC<sub>50</sub> égale à 109.98 et 103.85 µg/ml des extraits méthanoliques à 80% du *T. vulgaris* et *R. officinalis* respectivement.

En revanche, le IC<sub>50</sub> de notre extrait du thym est très supérieur à ceux trouvés par BELHADJ (2015) et qui correspondent à (69, 74 et 78µg/ml) d'huile essentielle de *T. capitatus*, *T. ciliatus* et *T. bleicherianus* respectivement après extraction par hydrodistillation.

Il est difficile de comparer les résultats obtenus (entre les deux plantes étudiées elles-mêmes, ainsi que celles retrouvées par d'autres auteurs), à cause de l'influence et la diversité

de plusieurs facteurs qui interfèrent dans le processus des analyses, qui sont principalement relatifs à la matière première (matières végétales) et aux techniques suivies dans l'analyse (préparation, extraction et évaluation).

En revanche, quel que soit la marge d'erreur issue de ces différents facteurs, les extraits de nos plantes (thym et romarin) soumises au test DPPH, montrent de bonnes activités antioxydantes relativement proches de celles de produits standards utilisés (l'acide ascorbique et le BHT).



# Conclusion

## Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Le thym et le romarin sont des plantes qui appartiennent à la famille des lamiaceae utilisés en Algérie dans divers domaines pour leurs propriétés thérapeutiques (antioxydantes).

Nous nous sommes intéressés dans notre travail à l'étude phytochimique, l'évaluation des taux de composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de différents extraits du thym (*Thymus hirtus*) et du romarin (*Rosmarinus tournefortii*).

La première étape qui consistait à l'extraction des composés phénoliques nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait et de conclure que le romarin possède un rendement élevé d'extraction par macération éthanolique (70%) avec épuisement et à température ambiante.

Quantitativement, l'évaluation des taux de polyphénols totaux et de flavonoïdes en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu et la méthode de trichlorure d'aluminium respectivement, révèle la présence des quantités relativement importantes en ces composés par comparaison à d'autres résultats.

Il ressort de ces analyses que le romarin est riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport au thym.

Le potentiel antioxydant des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que les extraits des deux plantes possèdent une bonne activité antioxydante, et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Notre pays possède une biodiversité absolue dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées.

A cet effet, et en perspective, plusieurs travaux peuvent être envisagés dans la continuité des travaux entamés à savoir ;

✚ Elargir le cadre de l'optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques par l'utilisation d'autres méthodes d'extraction et d'autres parties de ces plantes (les racines, les fleurs, les fruits,...etc) ;

✚ Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques: anti tumorale, anti cancéreux, anti inflammatoire, anti diabétique, anti coagulant et autres ;

✚ Identification des principes actifs responsables de ces activités pharmacologiques, avec la détermination des conditions optimales pour l'extraction de ces principes actifs ;

✚ Utilisation de ces composés naturels dans le secteur alimentaire en remplaçant les composés de synthèse pour la complémentation et la conservation des aliments.

**Références**

**bibliographiques**

- 1- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A., 2007- *Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales*, Ed. Science et Nature, Paris, 2251p.
- 2- El Azrak H., 2017- *Extraction et distillation d'une plante aromatique et médicinale : Rosmarinus officinalis*. Thèse de magister, Uni. Sidi Mohamed ben Abdellah, Maroc, 131p.
- 3- Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. et Trinajstić N. 2003- Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, Vol. 76 (1): 55-61.
- 4- Ammar R.B., Bhourri W., Sghaier M.B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Bouhlel I., Kilani S., Mariotte A.M., Chekir-Ghedira L., Dijoux-Franca M.G. et Ghedira K., 2009- Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem.*; Vol. 116 (98): 258-264.
- 5- Andersen Y.M. et Markham K.R., 2006- *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, 1226p.
- 6- Armelle J., 2004- *Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique, mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications*. Ed. Rue Monge, Parc Industriel Bersol, Paris, 418 p.
- 7- Arockiaraj J., Easwaran S., Vanaraja P., Singh A., Goudable J. et Favier A., 1997- *Radicaux libres oxygénés et antioxydants*. Ed. Nutr Clin, Métabol, 330 p.
- 8- Atmani D, Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H. et Debbache N., 2009- Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, Vol. 112 (8): 303–309.
- 9- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G. et Kefalas P., 2005- Tea and herbal infusions : Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, Vol. 89: 27–36.
- 10- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. and Pinkas M., 1996- Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung*, Vol. 46: 1086-1089.
- 11- Békro Y.A., Janat A., békro M , Boua B.B., trabi F.H et Éhilé E., 2007- Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *caesalpinia benthamiana* (baill.) *herend et zarucchi* (caesalpinaceae). *Sciences & nature*. Vol. 4 (2): 217-225.

- 12- Belhadj H., 2015-** *Activité antioxydante et l'effet hémolytique des huiles essentielles de Thymus ciliatus ssp-eu-ciliatus et d'Ammodendron Verticillata*. Thèse de magister, Univ. BELKAID Abou Beker, Tlemcen, 85p.
- 13- Belkhiri F., 2009-** *Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du Thymus communis et Carthamus caeruleus*. Mémoire de Magister, Université de Setif, Algérie, 110 p.
- 14- Benariba N., Djaziri R., Bellakhdar W., Belkacem N., Kadiata M., Malaisse W.J., Sener A. et Abdelkrim C., 2013-** Phytochemical screening and free radical scavenging activity of Citrullus colocynthis seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.*, Vol. **3** (1): 35-40.
- 15- Benayache F., 2005-** *Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre Genista (Fabaceae) : G. saharae, G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri- Constantine, Algérie, 199p.
- 16- Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R. et Pizzariello A., 2007-** Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*, Vol. **100**: 1481-1489.
- 17- Bouayed J., 2007-** *Etude de la corrélation anxiété / statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants / neuroactifs des polyphénols extraits de Prunus domestica et Prunus domestica*. Thèse de doctorat, Université de Paul Verlaine-Metz. 246p.
- 18- Bouquet A. et Fouret A., 1975-** Recherches chimiques préliminaires sur les plantes médicinales du Congo-Brazzaville. *FITOTERAPIA*. Vol. **46** (4) : 28-34.
- 19- Bruneton, J., 1993-** *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*, Ed. Tec. & Doc. – Lavoisier, France, 462p.
- 20- Bruneton J., 1999-** *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*. 3<sup>ème</sup> éd. Tech. & Doc. – Lavoisier, France, 433 p.
- 21- Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J.V., 2005-** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry*, Vol. **280** (7): 5636-5645.
- 22- Bylka W., Mathawska I. et Pilewski N.A., 2004-** Natural flavonoid as antimicrobial agents.

*Journal of the American Nutraceutical Association.*, Vol. 7 (2): 24-26 pp.

- 23- **Catier O., Roux D. 2007-** *Botanique pharmacognosie phytothérapie*. 3<sup>ème</sup> Ed. Wolters Kluwar, Londres, 146p.
- 24- **Cholewa J., Poprzeczki S., Zajac A. et Waskiewicz Z., 2008-** Impact de la supplémentation en vitamine C sur les paramètres du stress oxydatif dans le sang des basketteurs d'élite lors d'un effort maximal, *Science & Sports*, Vol. 23 : 176-182.
- 25- **Cillard J., 2006-** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. Laboratoire de biologie cellulaire et végétale. *Faculté de pharmacie*, Vol. 12 : 24-29.
- 26- **Cruz J.M., Dominguez J.M., Dominguez H. et Parajo J.C., 2001-** Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49(5): 2459-2464.
- 27- **Dacosta Y., 2003-** *Les phytonutriments bioactifs*. Ed. Yves Dacosta, Paris, 317p.
- 28- **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F. et Stocker P., 2007-** Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.*, Vol. 224: 801-809.
- 29- **Ducros V., Favier A., 2004-** Métabolisme du sélénium, EMC-Endocrinologie 1. 19–28.
- 30- **Ebrahimzadeh M.A., Pourmmorad F. et Hafezi S., 2008-** Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology.*, Vol. 32: 43-49.
- 31- **El-Haci I.A., Atik-Bekkara F., Didi A., Gherib M. et Didi M.A., 2012-** Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie. Bioscience*, Vol. 10 : 280-285.
- 32- **Fadili K., Amalich S., N'dedianhoua K., Bouachrine M., Mahjoubi M., El Hilali F. et Zair T., 2015-** Teneur en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc : *Rosmarinus officinalis* et *thymus satureioides*. *International journal of innovation and Scientific Recherche.*, Vol 17 (1) : 24-33.
- 33- **Favier A., 2003-** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique*, Vol. 39: 108-117.
- 34- **Favier A., 2006-** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. France*. Vol. 64: 390-396.
- 35- **Ferguson L., 2001-** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, Vol. 475: 89- 111.

- 36- Gammoudia, A., Dandanaa, H., Chaheda, S., Ferchichia S., Ernez B., et Mileda A., 2013-** Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* : Vol. **28** : 39–42.
- 37- Gauthuret R.J., 2004-** *Les composés phénoliques des végétaux*. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux, Paris, 289 p.
- 38- Gomez-Caravaca A.M., Gomez-Romero M., Arreez-Romen D., Segura-Carretero A. et Fernandez-Gutierrez A., 2006-** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Vol. **41**: 1220-1234.
- 39- González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M.J., 2007-** Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, Vol. **22** (3) : 287-293.
- 40- Goudable J. et Favier A., 1997-** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Metabol.*, Vol. **11**: 115-20.
- 41- Hagerman A.E. et Butler L.G., 1981-** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.*, Vol. **256**: 4494-4497.
- 42- Hamia C., Guergab A., Rennane N.E., Birache M., Haddad M., Saidi M. et Yousfi M., 2014-** Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressum*. *Annales des Sciences et Technologie*, Vol. **47**: 33-38.
- 43- Hammoudi R., 2009-** *Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plante Teucrium polium geyrii provenant de la région Tamanrasset*. Diplôme de magister .Université d'Ouargla. 130p.
- 44- Hamzaa N., Berkea B., Chezea C., Aglib A.N., Robinsona P., Ginc H. et Moorea N. 2010-** Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. **128**: 513–518.
- 45- Hanifi N., 1991-** Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. *Publication des Actes éditions*, Vol **16** : 47-49.
- 46- Harbourne N., Marete E., Jacquier J.C. et O'riordan D., 2009-** Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT- Food Science and Technology*, Vol. **42**: 1468-1473.
- 47- Harborne J.B., 1980-** Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology. *New series*. Vol. **8**: 329-402.

- 48- Harrar A.E.N., 2012-** *Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L.* Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 113p.
- 49- Heller W. et Forkmann G., 1993-** Biosynthesis of flavonoids. *In: The Flavonoids: Advances in research since. Chapman and Hall.* London, Vol. **22**: 499-535.
- 50- Hirasa K. et Takemasa M., 1998-** *Spice science and technology.* Ed. Marcel Dekker, New York, 1184p.
- 51- Jacotot B., 1997-** Vitamine E et athérosclérose. *Rev. Méd. Interne.* Vol. **15**: 627-629.
- 52- Kahouli I., 2010-** *Effets antioxydants d'extraits de plantes (Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis, Origanum majorana, Oléa Europea L.) dans l'huile de canola chauffée.* Thèse de doctorat, Univ. Laval, Quebec, 111p.
- 53- Karaali A., Boyacioğlu D., Gönez G. et Özçelik B., 2004-** Flavonoids in fruit and vegetables; their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. *European commission's the 6th framework programme for research.* Istanbul technical university. Turkey. 156-168.
- 54- Keskas N., 2011-** *Effet scavenger des radicaux oxygénés et inhibiteur de la xanthine Oxydoreductase des extraits de Cachrys libanotis L.,* Mémoire de Master, Université de Setif, 153p.
- 55- Kohen R. et Nyska A., 2002-** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.,* Vol. **30**: 620-650.
- 56- Krishna D., Chaluvadi M., Raj N., et Sripal R., 2001-** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.,* Vol. **33**: 2-16.
- 57- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. et Abdely C., 2007-** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima.* *Plant Physiol. Biochem.,* Vol. **45**: 244-249.
- 58- Larwence A., Hammouda F., Salah A., Abada S. et Ouchan N., 1984-** Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton : effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000. *Ann. Zootech.,* Vol. **33**: 533-543.

- 59- 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. *J. Agric. Food Chem.* Vol. **51**: 7292-7295.
- 60- Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C. et Ayuso M., J. 2000-** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poison. *Z Naturforsch.*, Vol **55** (11-12): 898- 902.
- 61- Maamri S., 2008-** *Etude de Pistacia atlantica de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais anti-leishmaniens.* Mémoire de Magister Université de Boumerdes. 186p.
- 62- Machiex J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. 2005-** *Composés phénoliques des végétaux.* Presses polytechniques et universitaires Romandes, 256p.
- 63- Macheix J-J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006-** *Les Polyphénols en agroalimentaire.* Ed. Tec. & Doc., Paris. France. 223p.
- 64- Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N. 2013-** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie*, Vol. **2**: 35-40.
- 65- Malešev D. et Kuntić V. 2007-** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian chemical society*, Vol. **72** (10) : 921-939.
- 66- Malik N.S.A. et Bradford J.M., 2006-** Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in "Arbequina"olives. *Scientia Horticulturae*, Vol. **110** : 274-278.
- 67- Martinez-Cayuela M., 1995-** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.*, Vol. **77**: 147- 161.
- 68- Middleton E., Kandaswami C. et Theoharides T., 2000-** The effects of plants flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, Vol **52**: 673-751.
- 69- Mohammedi Z., 2005-** *Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen.* Thèse de Magistère. Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen, 116p.
- 70- Mohammedi Z., 2013-** *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie.* Thèse de doctorat." *Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses*", Université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen, 152p.

- 71- Murry R.D.H., Mendez J. et Brown S.A., 1982-** *the natural coumarins Occurrence Chemistry and Biochemistry*. Ed. Chichester John Wiley and Sons, UK. New York. England. 702p.
- 72- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. et Krishna D.R., 2001-** Bioflavonoids, classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, Vol. **33** : 2-16.
- 73- Neve J., Vermongen F., Carpentier Y-A. 1989-** Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge, *Ann. Biol. Clin.*, Vol **47**: 43-138.
- 74- Nijveldt J., Van Nood E., Van Hoorn D., Boelens P., Van Norren K. et Van Leeuwen P. 2001-** Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition*, Vol. **74**: 418-425.
- 75- Nkhili E.Z., 2009-** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad, Marrakech. Maroc. 327 p.
- 76- Organisation Mondiale de la Santé, 2003-** *Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle*, Ed. Science & Bio. Paris, 142p.
- 77- Ono E., Fukuchi-Mizutani M., Nakamura N., Fukui Y., Yonekura-Sakakibara K., Yamaguchi M., Nakayama T., Tanaka T., Kusumi T. et Tanaka Y. 2006-** Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol. **103**: 11075-11080.
- 78- Ozkaya, M.T, et Celik, M., 1999-** Quantitative analysis of phenolic compounds in olive cuttings. *Acta Horticulturae*, Vol. **26**: 477-480.
- 79- Park H. J. et Cha H. C., 2003-** Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society.*, Vol. **7** : 327-330.
- 80- Pasquier C., 1995-** stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, Vol. **276** : 87-92.
- 81- Perret C., 2001-** *Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat .Université de Neuchâtel.Suisse. 184 p.
- 82- Pincemai L., Defraigne J., 2004-** *Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène*. Symposium « Antioxydants et alimentation » Institut Danone, 35p.

- 83- Priya R., Prathapan A., Raghu K.G. et Menon A.N. 2012-** Chemical composition and *in vitro* antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. **24**: 695-699.
- 84- Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006-** *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed. Tec & Doc, Paris, 130p.
- 85- Scalbert A. et Williamson G., 2000-** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. Vol. **130**: 2073-2085.
- 86- Seigler D. S., 1998-** *Plant secondary metabolism*. Ed. Kluwer Academic, Boston, 295p.
- 87- Servais S., 2004-** *Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en repense à l'ozone*. Thèse de Doctorat, université Claude Bernard, Paris, 152p.
- 88- Singleton V.L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos M., 1999-** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymol.*, Vol. **41**: 152-177.
- 89- Sohal R.S., Mockett R.J. et Orr W.C., 2002-** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.*, Vol. **33**: 575-586.
- 90- Subramanian S., Stacey G. et Yu O., 2007-** Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.*; Vol. **12**: 282-285.
- 91- Tapas A.R., Sakarkar D.M. et Kakde R.B., 2008-** Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research.*, Vol. **7** (3) : 1089-1099.
- 92- Tawaha K., Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M. et El-Elimat T., 2007-** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*; Vol. **104**: 1372-1378.
- 93- Teissedre P.L., Vizzini M.I., Di Mago D., La Neve I., Giammanco S., La Guardia M. et Ginmanco M., 2007-** Composition de vins rouges siliciens et leurs propriétés nutraceutiques. *8th international enology symposium*. June 25, 26 and 27. Bordeaux.
- 94- Tiqwari, A.K., 2001-** Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science.*, Vol. **81** (9) : 1179-1181.
- 95- Tlili M. L., 2015-** *Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de Pergularia tomentosa issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional)*. Thèse de Magister. Université Kasdi Merbah-Ouargla. 92p.
- 96- Tsai T. H., Tsai P. G. et Ho S. C., 2004-** Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used species. *Journal of food science.*, Vol. **70** (1) : C93-C97.

- 97- Uccella N., 2001-** Olive biophenols : biomolecular characterization, distribution and phytoalexin histochemical localization in the drupes. *Trends Food Science and Technology.*, Vol. **11**: 315-327.
- 98- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. et Telser J., 2007-** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol. 39: 44-84.
- 99- Yakhlef G., 2009-** *Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de Thymus Vulgaris L. et Laurus nobilis L.*, Thèse de magister, Univ. EL HADJ Lakhdar, Batna, 78p.

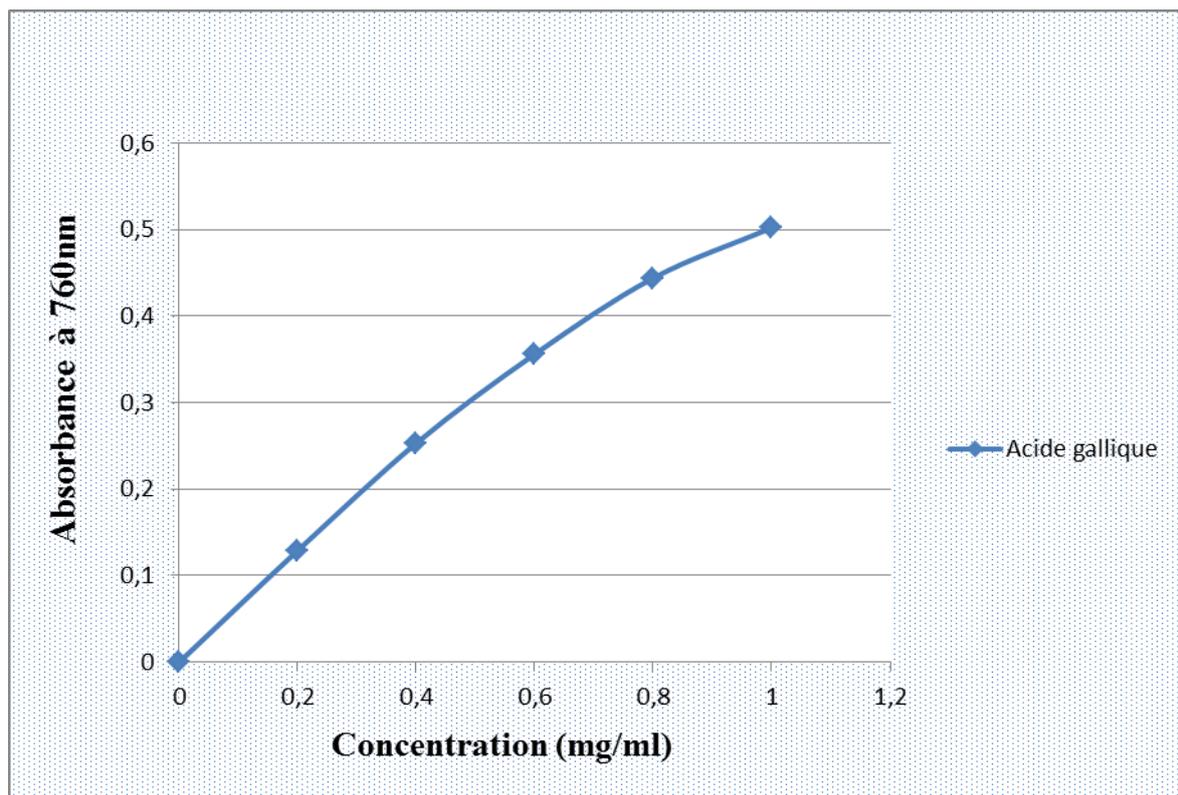
# **Annexes**

Matériel végétal Rendement	Thym ( <i>Thymus hirtus</i> )	Romarin ( <i>Rosmarinus tournefortii</i> )
1 <sup>ère</sup> extraction (g)	3,56	3,94
2 <sup>ème</sup> extraction (g)	3,31	3,76
3 <sup>ème</sup> extraction (g)	3,22	3,81

**Annexe 01** : Rendement des plantes étudiées après chaque extraction.

Répétitions	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>
Teneur en polyphénols totaux (mg GAE/g d'extrait)			
Thym ( <i>Thymus hirtus</i> )	70	90	64
Romarin ( <i>Rosmarinus tournefortii</i> ).	160	180	208

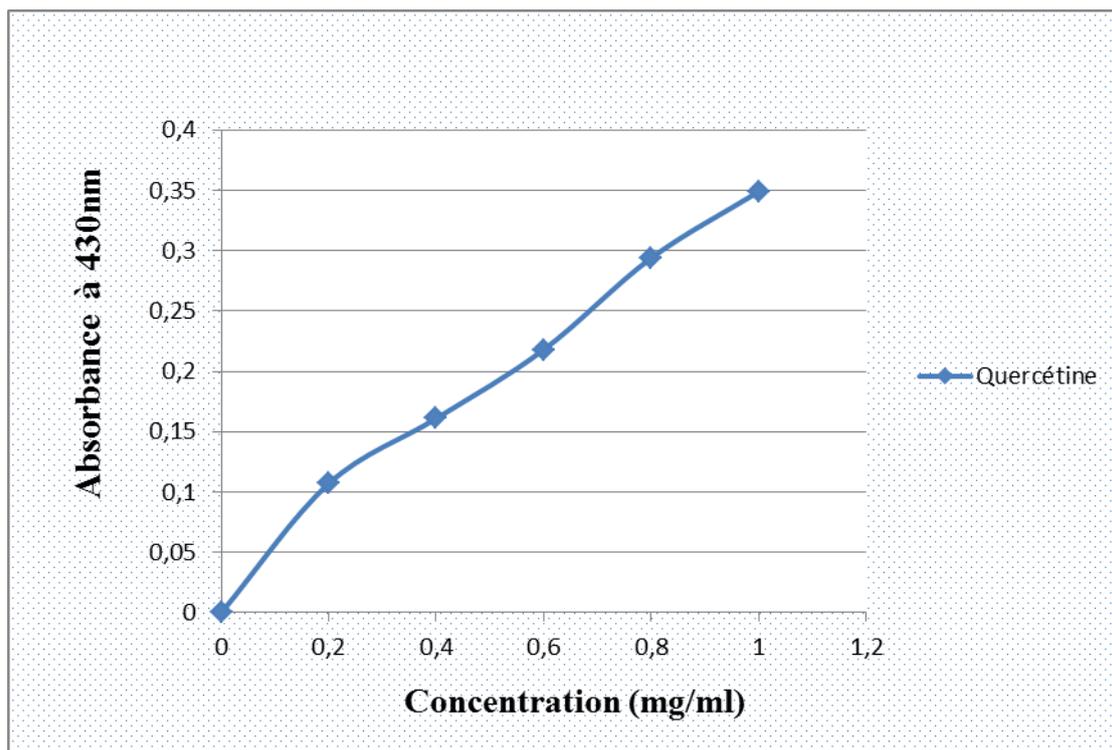
**Annexe 02** : Teneur des extraits des plantes en polyphénols totaux.



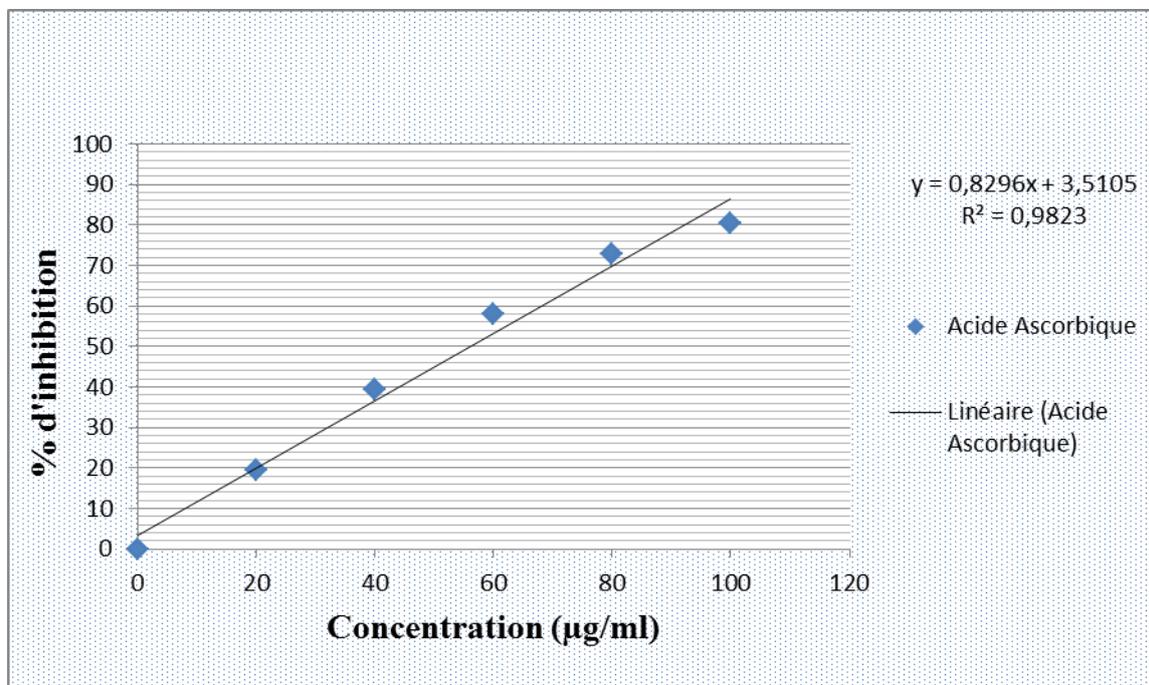
**Annexe 03 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Teneur en flavonoïdes (mg QE/g d'extrait)	Répétitions		
	1 <sup>ère</sup>	2 <sup>ème</sup>	3 <sup>ème</sup>
Thym ( <i>Thymus hirtus</i> )	9	7	8
Romarin ( <i>Rosmarinus tournefortii</i> ).	15	14	11

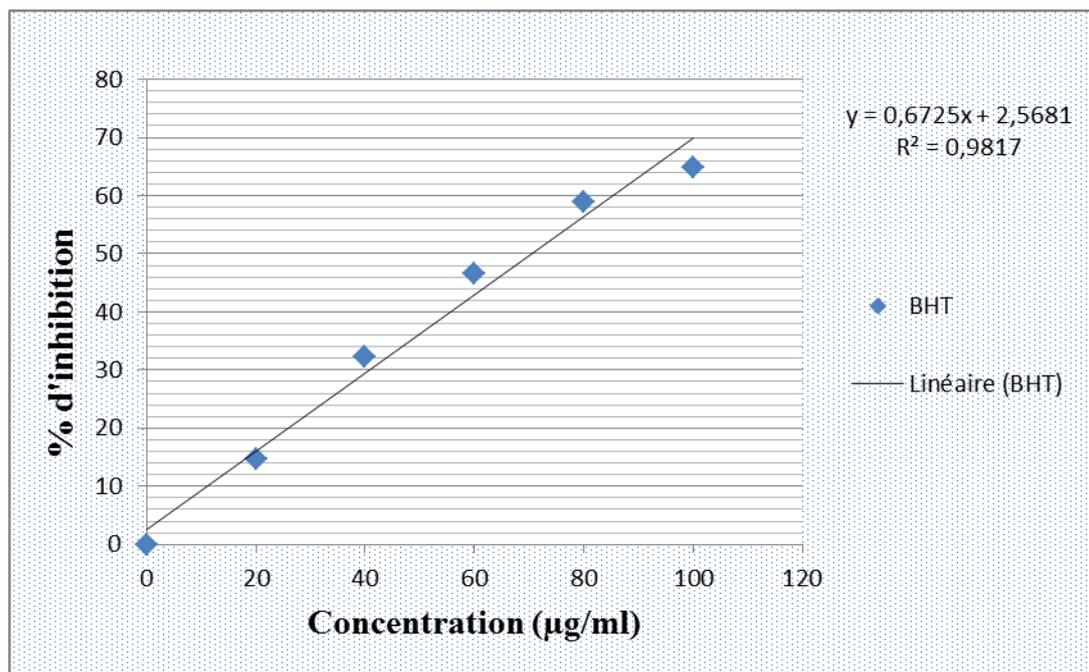
**Annexe 04 :** Teneur des extraits des plantes en flavonoïdes.



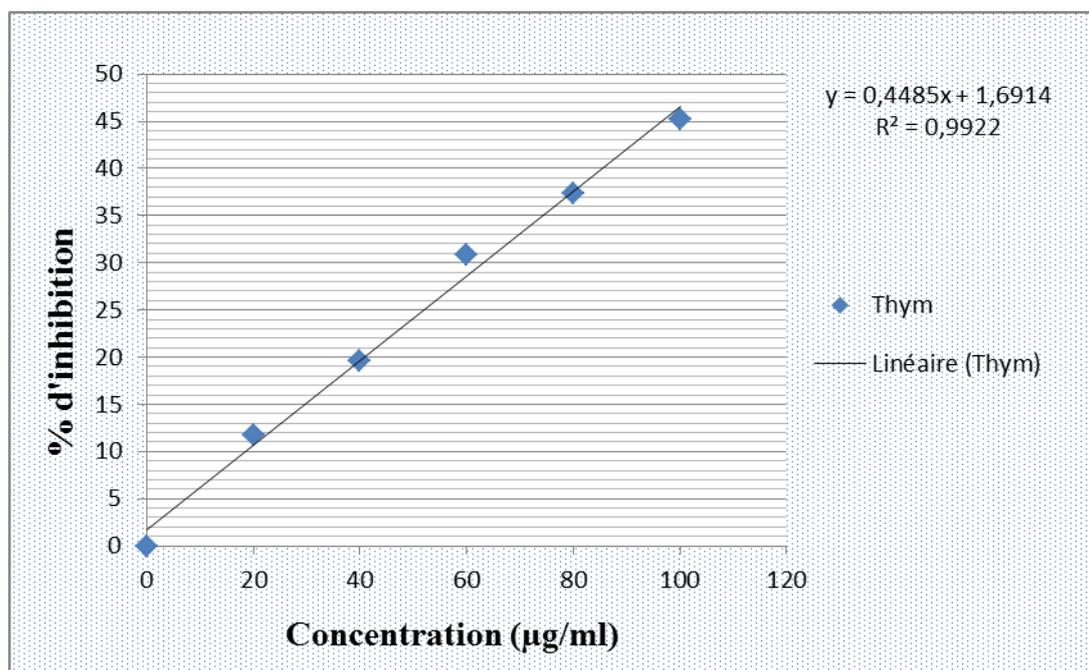
**Annexe 05:** Courbe d'étalonnage de la quercétine.



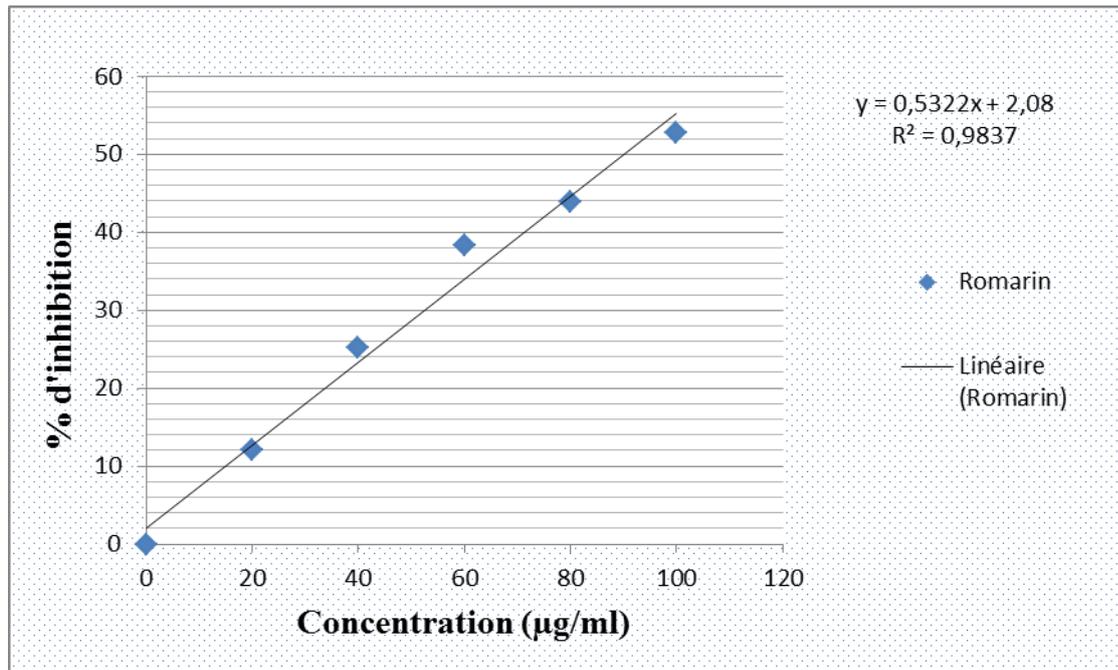
**Annexe 06 :** Droite du % d'inhibition de DPPH par l'acide ascorbique.



Annexe 07 : Droite du % d'inhibition de DPPH par le BHT.



Annexe 08 : Droite du % d'inhibition de DPPH par le thym.



**Annexe 09** : Droite du % d'inhibition de DPPH par le romarin.

# Résumé

## Résumé :

Notre étude rentre dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales en Algérie (*Thymus hirtus et Rosmarinus tournefortii*). Ce travail porte sur l'extraction par macération des composés phénoliques à partir des broyats des parties aériennes des deux plantes, dosage qualitatif et quantitatif des polyphénols totaux et des flavonoïdes et en fin sur l'évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes par la méthode DPPH. Nos résultats montrent que l'extrait du romarin possède un rendement d'extraction, une teneur moyenne en polyphénols totaux et une teneur moyenne en flavonoïdes plus élevée que l'extrait du thym. Soumis au test DPPH, l'extrait du romarin a une valeur  $IC_{50}$  inférieure et est considéré comme un antioxydant puissant par rapport à l'extrait du thym.

Mots clés : Extraction, romarin, thym, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante

## Abstract :

Our study is within the scope of the valuation of medicinal plants in Algeria (*Thymus hirtus et Rosmarinus tournefortii*). This work report the extraction by maceration of phenolic compounds from crushed aerial parts of the two plants, qualitative and quantitative determination of total polyphenols and flavonoids and finally the evaluation of the antioxidant activity of both plants by the DPPH method. Our results show that rosemary extract has a higher extraction yield, average total polyphenol content and average flavonoid content than thyme extract. Submitted to the DPPH test, rosemary extract has a lower  $IC_{50}$  value and is considered a powerful antioxidant compared to thyme extract.

**Key words:** Extraction, rosemary, thyme, total polyphenols, flavonoids, antioxidant activity

## الملخص :

تهدف دراستنا الى تميم النباتات الطبية في الجزائر (الزعر و إكليل الجبل). يتناول هذا العمل استخراج المركبات الفينولية عن طريق النقع للأجزاء الهوائية من كلا النباتين ، وتحديد كمية البوليفينول الكلي و الفلافونويد و تقييم نشاط مضادات الأكسدة في كلا النباتين بواسطة طريقة DPPH. تظهر نتائجنا أن مستخلص إكليل الجبل يحتوي على العائد الاستخراج، و متوسط محتوى من البوليفينول الإجمالي و متوسط محتوى فلافونويد أعلى من مستخلص الزعر. عند الخضوع لاختبار DPPH ، يكون لمستخلص إكليل الجبل قيمة  $IC_{50}$  أقل ويعتبر مضادًا قويًا للأكسدة مقارنة بمستخلص الزعر.

## كلمات الدلالة :

استخراج ، إكليل الجبل ، الزعر ، البوليفينول الكلي ، الفلافونويد ، نشاط مضادات الأكسدة