



**République Algérienne Démocratique et Populaire**



**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Constantine 1**

**Département de Biochimie et de Biologie Cellulaire et Moléculaire**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master2**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : sciences biologiques**

**Spécialité : Biochimie**

**Thème :**

**Caractérisation moléculaire d'extrait phénolique des  
feuilles de la plante *Thymus algeriensis* sur la maladie  
cardiovasculaire**

**Présenté par : Benhamouda Yasser et Ammari Aymen.**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :**

**Rapporteur : MERGHEM Rachid (Professeur – UFM Constantine 1).**

**Examinatrice :**

**Année universitaire : 2021 - 2022**

## *Remerciements*

Je tiens à remercier en tout premier lieu ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la santé, le courage et la patience pour mener à terme ma formation et pouvoir réaliser ce travail.

Je tiens particulièrement à adresser mes remerciements à :

Mr MERGHAM Rachid, qui a accepté de m'encadrer, pour ses orientations et ses conseils tout au long de mon travail

Sous sa direction, j'ai trouvé toute l'aide nécessaire pour finaliser le présent travail

J'adresse mes remerciements et mes respects aux membres du jury

Je remercie tous les enseignants et le cadre administratif du département des sciences  
biologiques

# *Dédicaces*

AVANT TOUT JE TIENS À REMERCIER DIEU LE PLUS PUISSANT POUR M'AVOIR  
DONNÉ LA FORCE ET LA PATIENCE AFIN DE RÉALISER CE MODESTE TRAVAIL.

JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL

À MES TRÈS CHERS PARENTS QUI M'ONT TOUT DONNÉ. QUI ONT TOUJOURS  
ÉTÉ LÀ POUR MOI.

À TOUS LES AMIS SPÉCIALEMENT CHAIMA QUI M'AIDÉ POUR FAIRE CETTE  
MÉMOIRE.

À MON BINÔME AYMEN ET À TOUTE SA FAMILLE.

À TOUS MES PROCHES ET À TOUTES PERSONNES QUI M'EST CHÈRE AU CŒUR.

*Yasser*

## *Dédicaces*

JE TIENS VIVEMENT, À DÉDIER CE TRAVAIL EN SIGNE  
DE RESPECT ET DE RECONNAISSANCE À : DEUX  
PERSONNES TRÈS CHÈRES QUI ONT PARTAGÉ MES JOIES  
ET MES PEINES, QUI ONT ÉTÉ TOUJOURS À MES COTÉS,  
QUI ONT FAIT DE MOI CE QUE JE SUIS AUJOURD'HUI :

MA MÈRE ET MON PÈRE.

JE DÉDIE ÉGALEMENT CE TRAVAIL À UNE PERSONNE QUI  
ME TIENT À CŒUR ET PARTAGE TOUS LES MOMENTS DE  
JOIE, DE TRISTESSE ET QUI ÉTAIT MON PLUS GRAND

EXEMPLE DE PATIENCE À CHAIMA.

À MA COLLÈGE «YASSER» QUI A PARTAGÉE AVEC MOI LES MOMENTS  
DIFFICILES DE CE TRAVAIL.

*Amen*

## **Liste des tableaux**

**Tableau 01** : Localisation de quelques espèces de thymus en Algérie

**Tableau 02** : Taxonomie de *Thymus algeriensis*

**Tableau 03** : Révélation des flavonoïdes après séparation CCM

**Tableau 04** : Relation entre Rf- Structure flavonique

**Tableau 05** : Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes

**Tableau 06** : Comportement chromatographique des phases : éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC et eau d'origan sur plaque de polyamide (DC6).

**Tableau 07** : Corrélation couleur et molécule de la phase éther.

**Tableau 08** : Corrélation couleur et molécule de la phase Eau.

**Tableau 09** : Corrélation couleur et molécule de la phase acétate.

**Tableau 10** : Corrélation couleur et molécule de la phase MEC.

**Tableau 11** : Absorption UV des différentes phases.

**Tableau 12** : Changement de coloration avec le temps des différentes phases d'extraits.

## Liste des figures

**Figure 01** : plante *Thymus algeriensis*

**Figure 02** : Morphologie du *Thymus algeriensis*

**Figure 03** : Distribution du genre *Thymus* dans le monde

**Figure 04** : Structure de base des flavonoïdes

**Figure 05** : Voies de biosynthèse des flavonoïdes

**Figure 06** : Classification des polyphénols

**Figure 07** : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène

**Figure 08** : Feuilles séchées de *Thymus algeriensis*

**Figure 09** : Origines géographique de l'échantillons

**Figure 10** : Technique d'extraction des composé phénolique

**Figure 11** : Evaporation à l'aide du rotavapor

**Figure 12** : séparation d'extrait (la formation des deux phases défèrent).

**Figure 13** : Chromatographie : montage et vocabulaire

**Figure 14** : Préparation de la ligne de base

**Figure 15** : Fin de la chromatographie

**Figure 16** : Spectre d'absorption d'un flavonoïde

**Figure 17** : Spectres UV-vis de la quercétine (flavonols) (A), de l'isobutrine (chalcone) (B) et de la naringénine (flavanone) (C) enregistrés entre 200 et 500nm

**Figure 18** : Forme libre et réduite du DPPH°

**Figure 19** : CCM analytique représentative des flavonoïdes d'*Thymus algeriensis*

**Figure 20** : CCM analytique représentative des flavonoïdes d'*Thymus algeriensis* après 24h

**Figure 21** : Les changement des couleurs des composés après le réactif de NEU (Avant et après 24h).

**Figure 22 :** Les spectres des différentes phases : la phase éther diéthylique (E), la phase acétate d'éthyle (A), la phase MEC (M) et la phase eau (Eau).

**Figure 23 :** Etapes de la coloration en jaune.

**Figure 24 :** Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante

**Figure 25 :** Relation entre la structure de flavanes et leur capacité à piéger des radicaux libres

**Figure 26 :** Mécanismes d'action pour la protection vasculaire

### Liste abréviation

**ADN :** Acide DésoxyriboNucléique.

**ARNm :** Acide ribonucléique messenger.

**AS :** aurone synthase.

**AVC :** accident vasculaire cérébral.

**C :** carbone.

**CCM :** Chromatographie sur Couche Mince.

**CE :** commission européenne.

**CHI :** chalcone isomérase.

**CHI :** chalcone isomérase.

**CHS :** chalcone synthase.

**CHS :** chalcone synthase.

**cm :** centimètre.

**DFR :** dihydroflavonol 4-réductase.

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

**EOA :** espèces oxygénées activées.

**ERO :** Espèces Réactives de l'Oxygène.

**FHT :** flavanone 3-hydroxylase.

**FLS :** flavonol synthase.

**FNSI/FNSII** : flavone synthase.

**g** : gramme.

**Gpxs** : Glutathion peroxydases.

**H E** : huiles essentielles.

**HAT** : hypertension artérielle.

**HDL** : high density lipoprotein.

**IFS** : isoflavone synthase.

**IMC** : indice de masse corporelle.

**LCR** : leucoanthocyanidin reductase.

**LDL** : low density lipoprotein.

**LDOX** : leucoanthocyanidin dioxygenase.

**MEC** : méthyle éthyle cétone.

**ml** : millilitre.

**mm** : millimètre.

**mmHg** : millimètre de mercure.

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé.

**RF** : Rapport frontal.

**SOD<sub>s</sub>** : super oxydes dismutases.

**UV** : ultra-violet.



## Introduction

Pour se soigner, l'homme a longtemps eu recours à des remèdes traditionnels à base de plantes (tisanes, poudres, décoctions), administrés par frictions, inhalations, cataplasmes, massages ou encore par voie orale. Le nombre d'espèces de plantes à fleurs connues est évalué à plus de 400 000. On estime à environ 34 000 le nombre d'espèces encore inconnues à ce jour.

Les polyphénols constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires qui se localisent généralement au niveau des différentes parties de la plante. Ces composés suscitent un grand intérêt de par leurs nombreux effets bénéfiques pour la santé : prévention et traitement de certains cancers, traitement des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (**Li-Weber M., 2009**), Certains d'entre eux sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaires, pharmaceutique et cosmétique.

Les polyphénols sont communément subdivisés en tanins, lignines, flavonoïdes et anthocyanes qui dérivent tous de l'assemblage d'unités phénoliques. En particulier, les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, antivirales, antiinflammatoires, antiprolifératives, régulatrices de systèmes enzymatiques ... Ces activités ont très souvent un lien avec leur activité antioxydante et notamment leur capacité à piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation de radicaux.

Parmi les plantes aux propriétés médicinales le Thym, une plante aromatique appartenant à la famille des lamiacées, se retrouve principalement dans la région méditerranéenne, l'Asie, l'Europe du Sud et l'Afrique du Nord (**Miller R. et al., 2006 ; Maksimovic Z. et al., 2008 ; Dob T. et al., 2006**). Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres. La région méditerranéenne a été le centre principal pour la domestication et la culture de la Labiatea, Lamiaceae. *Thymus algeriensis* est une espèce endémique de l'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) (**Benabid A., 2000**). *Thymus algeriensis* est très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux Algérois et oranais.

De ce fait les objectifs assignés à ce travail consistent à étudier les feuilles de *Thymus algeriensis*, sélectionnées selon deux marqueurs biologiques (leurs contenus phénoliques et leurs activités antiradicalaires).

Notre étude se divise en quatre grandes parties :

- Une première partie représente une synthèse bibliographique comporte 3 chapitres sur l'espèce étudiée (description morphologique, utilisation...) ; caractérisation moléculaire d'extrait phénolique et activité biologique et la dernière sur la maladie cardiovasculaire.
- Un deuxième chapitre représente le matériel et méthodes utilisés.
- Un troisième chapitre réservé aux résultats et discussions.
- Et enfin, un quatrième chapitre parler sur la relation entre polyphénols et cardiovasculaire, s'ensuit une conclusion.

## TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale

Synthèse bibliographique

### **Chapitre I : Généralités sur *Thymus algeriensis***

1. Présentation de <i>Thymus algeriensis</i> .....	
1.1. Famille des Lamiacées.....	
1. 2. Espèce <i>Thymus algeriensis</i> .....	
1. 2. 1. Nomenclature.....	
1. 2. 2. Systématique de la plante.....	
1. 2. 3. Description morphologique.....	
2. Répartition de <i>Thymus</i> .....	
2. 1. Dans le monde.....	
2. 2. En Algérie .....	
3. Utilisations de thym.....	
3. 1. En phytothérapie.....	
3. 2. Dans l'agro-alimentation.....	
3. 3. En cosmétique.....	

### **Chapitre II : Caractérisation moléculaire d'extrait phénolique et activité biologique**

1. Définition et caractéristiques .....	
2. Biosynthèse.....	
3. Principales classes.....	
3. 1. Les acides phénoliques .....	
3. 1. 1. Les acides hydroxybenzoïques .....	
3. 1. 2. Les acides hydroxycinnamiques.....	
3. 2. Flavonoïdes.....	
3. 2. 1. Généralités sur les flavonoïdes .....	
3. 2. 2. Structure chimique et classification.....	

3. 2. 2. 1. Flavones et flavonols.....	
3. 2. 2. 2. Flavanones et dihydroflavonols.....	
3. 2. 2. 3. Anthocyanes.....	
3. 3. Les tannins.....	
4. Activités biologiques.....	
4. 1. Activité antioxydante.....	
4. 1. 1. Radicaux libres.....	
4. 1. 2. Défenses antioxydantes.....	
4. 1. 3. Prévention alimentaire.....	
4. 1. 3. 1. Défenses endogènes.....	
4. 2. Activité antibactérienne.....	
4. 2. 1. Définition.....	
4. 2. 2. Agents antimicrobiens.....	
4. 2. 3. Agents chimiques.....	
4. 2. 4. Agents physiques.....	
4. 2. 5. Agents chimiothérapeutiques.....	
4. 3. Antibiotiques.....	
4. 3. 1. Définition.....	
4. 3. 2. Antibiotiques naturels et synthétiques.....	
4. 3. 3. Mode d'action des antibiotiques.....	

### **Chapitre III : Cardiovasculaire**

1. Introduction.....	
2. Facteur de risque cardiovasculaire.....	
2. 1. Facteurs de risque non modifiables.....	
2. 2. Facteurs de risque modifiables.....	
2. 2. 1. Tabagisme.....	
2. 2. 2. Hypertension artérielle.....	
2. 2. 3. Dyslipidémies.....	
2. 2. 4. Diabète.....	
2. 2. 5. Insuffisance rénale.....	

2. 2. 6. Autres facteurs de risque .....

## **Chapitre IV : Matériel et méthodes**

1. Matériel végétal.....
2. Technique d'extraction des composéé phénolique.....
  2. 1. Macération.....
    2. 1. 1. Protocole.....
  2. 2. Concentration.....
    2. 2. 1. Mode opératoire.....
      2. 2. 1. 1. Affrontement par l'éther de pétrole.....
      2. 2. 1. 2. Affrontement par l'éther diéthylique.....
      2. 2. 1. 3. Affrontement par l'acétate d'éthyle.....
      2. 2. 1. 4. Affrontement par méthyle éthyle cétone (MEC).....
3. La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique (Aspect qualitatif).....
  3. 1. Définition d'une chromatographie.....
    - a. Histoire de la technique.....
    - b. Le principe.....
  3. 2. Protocole détaillé de la chromatographie sur couche mince.....
4. Identification.....
  4. 1. Relation : structure-fluorescence.....
  4. 2. Relation : structure-RF.....
5. La spectrophotométrie UV-Visible.....
  5. 1. Définition.....
  5. 2. Principe.....
6. Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° ».....
  6. 1. Principe.....
  6. 2. Mode opératoire.....

## **Chapitre V : Résultats et discussion**

1. Analyse phytochimique.....
  1. 1. Préparation des extraits.....
2. Aspect qualitatif.....

- 2. 1. Diagnostic sur chromatographie analytique sur couche mince.....
  - a. Couleurs.....
  - b. Rapport frontal (Rf).....
- 2. 2. L'analyse spectrale des fractions.....
- 2. 3. Estimation de l'activité antioxydante des composés phénoliques isolés.....
- 3. Relation : Structure-activité antioxydante.....

### **Chapitre VI : Polyphénols et cardiovasculaire**

- 1. Mécanisme de défense des antioxydantes.....
- 2. Comparaison.....

## Chapitre I : botanique de *Thymus algeriensis*

## 1. Présentation de *Thymus algeriensis*

### 1. 1. Famille des Lamiacées

La famille des lamiacées (Lamiaceae) ou Labiées (Labiatae) est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir anti microbien, anti-inflammatoire et antioxydant (Gherman C. *et al.*, 2000 ; Hilan C. *et al.*, 2006). Cette famille comprend près de 6700 espèces, regroupées dans environ 250 genres (Miller N. *et al.*, 2006).

Les labiées sont des arbustes, sous arbrisseaux, ou plantes herbacées, en général, odorantes reproducteurs d'huiles essentielles largement répandu autour du monde et dans tout type de milieu (Zghib A., 2013). Les plantes de cette famille sont à tiges quadrangulaires, feuilles en général opposées sans stipules. Fleurs pentamères en général hermaphrodites. Calice (les sépales) à cinq divisions. Corolle (les pétales) en général bilabiée longuement tubuleuse constituée de 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre, lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Les étamines sont quartes, la cinquième nulle ou très réduite, parfois deux étamines et deux staminodes. Ovaire super à carpelles originellement biovulés, ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison (Soto-Mendivil E. *et al.*, 2006).

Les espèces les plus citées sont : *Sativa officinalis* (Fellah S. *et al.*, 2006), *Mentha spicata* (Cheoudhury R. *et al.*, 2006), *Origanum vulgare* (Dimitrijevic S. *et al.*, 2007), *Rosmarinus officinalis* (Gachkar L. *et al.*, 2007). *Ocimum basilicum* ainsi que de nombreuses espèces du genre *Thymus* qui ont été abondamment étudiés : *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum* (Elhabazi K. *et al.*, 2006 ; Rota M. *et al.*, 2008).

### 1. 2. Espèce *Thymus algeriensis*

C'est une plante sous ligneuse, souvent prostrée affectionnant des stations sur calcaire, sèches et ensoleillées. On connaît actuellement environ 100 variétés de *Thymus*. En effet, le polymorphisme du *Thymus* a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs qui ont été amenés à étudier chez ce *Thymus algeriensis* les caractères suivants :

#### 1. 2. 1. Nomenclature

-Nom botanique : *Thymus algeriensis* Boiss et Reut.

-Noms locaux : se diffère d'une région à une autre en Algérie : mezouqech, hamzoucha, z'hitra, rebba, djouchchen, azoukni (<http://www.vitamedz.org/thym/>).



### 1. 2. 2. Systématique de la plante

Selon (Quezel P et Santa S., 1963) La classification de *Thymus algeriensis* est la suivante :

**Tableau 01** : Taxonomie de *Thymus algeriensis*

Règne	Végétale
-Règne :	Plantae
-Embranchement :	Spermaphytes
-Sous embranchement :	Angiospermes
-Classe :	Eudicotes
-Sous classe :	Astérides
-Ordre :	Lamiales
-Famille :	Lamiacées
-Genre :	<i>Thymus</i>
-Espèce :	<i>Thymus algeriensis</i>



**Figure 01** : plante *Thymus algeriensis* (Bouhedida H., 2019).

### 1. 2. 3. Description morphologique

*Thymus algeriensis* est un sous arbrisseau pouvant atteindre plus de 25 cm de long (**Figure 02**), d'une odeur forte, aromatisante très agréable. Sa période de floraison s'étale du mois d'Avril jusqu'au mois de Juillet. Cette plante est composée de :



**Figure 02** : Morphologie du *Thymus algeriensis* (**Bessidik M et Khenfer B., 2015**).

**-Tige** : Les tiges de *Thymus algeriensis* sont ligneuses et grêles plus ou moins dressés et velus, recouverts par des feuilles opposées.

**-Feuilles** : Elles sont florales sessiles ou courtement pétiolées, décussées, Les thymus possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes appelées \*trichomes\*. Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono terpènes (**Soto-Mendivil E. et al., 2006**).

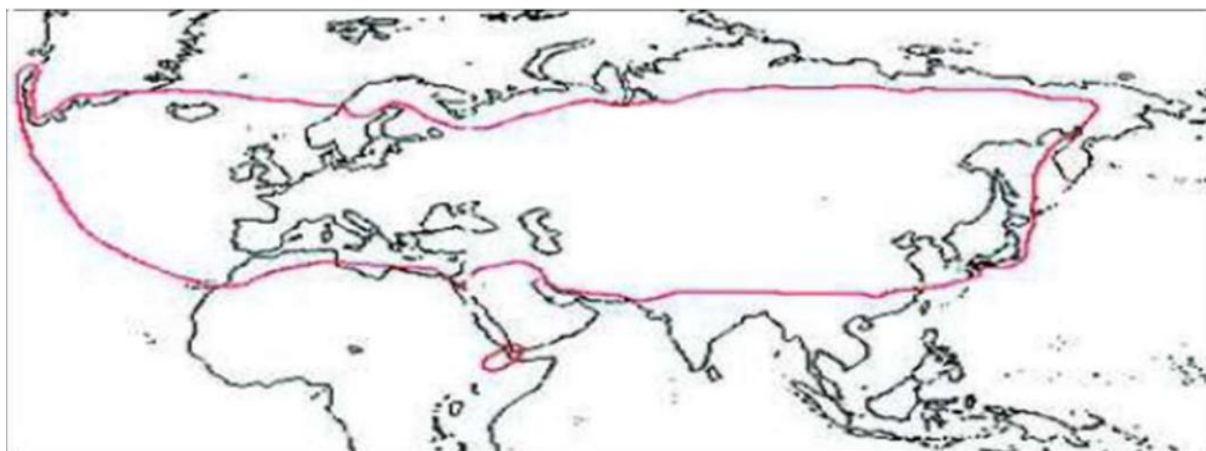
**-Fleurs** : Elles sont rosées, florifères courtes et étroites ne dépassant 15×12 mm, elles groupées en épis, de couleur violette, pâle, avec quatre étamines didynames (**Guy G., 2005**).

## 2. Répartition de Thymus

### 2. 1. Dans le monde

Le genre de *Thymus* est l'un des 220 genres les plus diversifiés dans le monde, appartient à la famille des lamiacées. La partie occidentale du bassin méditerranéen est le centre de diversité de ce genre. Le genre *Thymus* est inclus dans les continents Euro-Asiatique il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée (**Morale R., 2002**). C'est une plante très répandue dans l'Ouest du nord-africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du

sud-ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya (Dob T. *et al.*, 2006).



**Figure 03 :** Distribution du genre *Thymus* dans le monde (Morales R., 2002).

Le cercle rouge représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde.

## 2. 2. En Algérie

En regard de sa superflue et sa biodiversité bioclimatique L'Algérie est reconnue par sa richesse en plantes médicinales (Badjah H., 1978). Cette richesse est associée à une originalité sur le plan systémique (nombreuses plantes endémiques), sur le plan phytochimique (spécifié des substances bio synthétisées) et sur le plan pharmacologique. Le thym en Algérie comprend plusieurs espèces, il est réparti dans tous le littorale et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides, il est fréquent dans le nord algérien et est rencontré de façon anarchique de part et d'autre, dans les broussailles, pelouses rocailles et les montagnes. Ce genre développe spontanément, caractérisé par une morphologie extrêmement ciliée (Mohemmdi Z., 2006). Le **tableau 02** présente une répartition de quelques espèces de thym en Algérie (Saidj F., 2007).

**Tableau 02 :** Localisation de quelques espèces de thymus en Algérie (Saidj F., 2007).

Espèce	Découverte par	Localisation
<i>Thymus fontenessi</i>	Boiss et Reut	Commun dans l'Atlas tellien.
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reut	Endémique dans le secteur nord d'Algérie.
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral.
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique en Oran.
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans :

		-Le sous-secteur de l'Atlas Tellien. -La grande et la petite Kabylie. -De Skikda aux frontières Tunisiennes. -Tell Constantinois.
<i>Thymus algeriensis</i>	Boiss et Reut	Très commun dans les sous secteur des hauts plateaux Algérois et Oranais.

### 3. Utilisations de thym

Le thym est une plante médicinale largement utilisée pour ses propriétés illimitées même dans les domaines agro- alimentaires et industrielles (cosmétique).

#### 3. 1. En phytothérapie

- Le thym est un stimulant digestif utile dans le manque d'appétit et la digestion pénible (**Guy G., 2005**).
- La listerine qui est une solution constituée d'HE de thym et d'eucalyptus possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (**Kato T. et al., 1990**).
- C'est un antiseptique de l'intestin et des bronches, cholagogue, balsamique et expectorant. En infusion, il combat la coqueluche et la toux (**Colette K., 2004**).
- Les propriétés antvieillessement et antioxydantes du thym ont été mises en évidence par les scientifiques (<http://www.doctissimo.fr>).
- Il possède des propriétés vermifuges, antivirales, antifongiques, antiinflammatoires et antibactériennes (**Jiminez-Arellanes A. et al., 2006**).
- L'huile essentielle de thym inhibe la croissance de cellules cancéreuses humaines (**Sertel S. et al., 2011**).

#### 3. 2. Dans l'agro-alimentation

- Le carvacrol, un composé principal de thym exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agroalimentaire afin de les conserver (**Fenaroli G., 1995**).

- Les huiles essentielles (H.E) de thym sont très efficaces contre les moisissures responsables de la détérioration des denrées alimentaires lors de leur stockage (**Sahr M et Nielson E., 2003**).
- Il est utilisé comme épice et condiment dans les produits alimentaires (**Zghib A., 2013**).

### **3. 3. En cosmétique**

- Le thym est largement utilisé dans les produits cosmétiques (bains de bouche les déodorants, les huiles de massage lotions et shampoos) (**Kluczyńska D., 2001**).
- Ses extraits sont aussi utilisés dans les soins anti-âges (**[http://www.soin- du corps.ooreka.fr](http://www.soin-du-corps.ooreka.fr)**).

## Chapitre II : Caractérisation moléculaire d'extrait phénolique et activité biologique

## 1. Définition et caractéristiques

Largement distribué dans le règne végétal et abondant dans nos régimes alimentaires, « les composés phénoliques » sont aujourd'hui les composés phyto -chimiques les plus étudiés (**Knežević S.V. et al., 2012**). D'après **Hurtado-Fernandez E. et al., (2010)** ; beaucoup de travaux ont été présentés par la communauté scientifique, qui se concentre sur :

- La structure chimique des phénols antioxydants dans les différents aliments végétaux, des plantes aromatiques et des matières végétales les plus diverses.
- Le rôle probable des composés phénoliques dans la prévention de diverses maladies associées aux stress oxydatifs telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et le cancer.
- La capacité de certaines catégories de composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes pour se lier aux protéines.
- La stabilisation des huiles comestibles, la protection de la formation de saveurs et la stabilisation de saveurs.
- Préparation de compléments alimentaires.

Plus de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille et le nombre ne cessent de croître (**Ignat I. et al., 2011**), ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyle. Ils comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les lignanes et lignines. Ils peuvent être conjugués avec plusieurs résidus sucrés liés ou ils peuvent également être liés avec d'autres composés chimiques, tels que des acides carboxyliques, des amines ou des lipides ou avec d'autres phénols existants (**Martin S et Andrantsitohaina R., 2002**).

## 2. Biosynthèse

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires et sont synthétisés, par des plantes au cours de leur développement normal, en réponse à des infections, des blessures, des rayons ultra-violet (UV) et des insectes. Ces composés phytochimiques provenant de la phénylalanine et la tyrosine sont ubiquitaires dans les plantes (**Pereira Nunes X. et al., 2012**).

Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- **Celle de l'acide shikimique** : qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;

- **Celle issue de l'acétate/malonate** : qui conduit à des polys  $\beta$ -coesters (poly-acétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy 1,8-anthraquinone ou les naphthoquinones.

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée de deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, « les flavonoïdes » (**Martin S, Andrantsitohaina R., 2002**).

### **3. Principales classes**

#### **3. 1. Acides phénoliques**

Le terme acide- phynol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et hydroxyl phénolique (**Bruneton J., 1999**). La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Les acides hydroxy benzoïques et hydroxycinnamiques existent rarement sous forme libres, mais sont généralement trouvés sous formes conjuguées d'esters et de glycosides (**Hager T et Howard L., 2009**).

Les acides phénoliques participent directement aux réactions de stress environnementaux, comme les attaques par les ravageurs et contribuent au processus de guérison de la plante par la lignification des tissus endommagés (**Manach C. et al., 2004**).

##### **3. 1. 1. Acides hydroxybenzoïques**

La concentration de l'acide hydroxy benzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxy-cinnamiques tels que les acides p-coumariques, férulique et sinnapique sont très présents (**Macheix J.J. et al., 2006**).

##### **3. 1. 2. Acides hydroxycinnamiques**

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6-C3) dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (par méthylation chez



les acides féruliques ou sinapique) sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Macheix J.J. *et al.*, 2006).

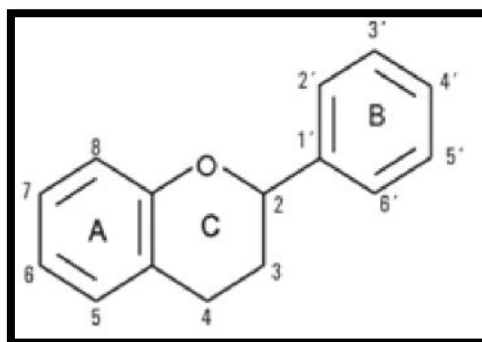
### 3. 2. Flavonoïdes

#### 3. 2. 1. Généralités sur les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées (Bruneton J., 1999).

#### 3. 2. 2. Structure chimique et classification

Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux), que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Harborne J et Williams C., 2000) comme montre la **figure 04**.

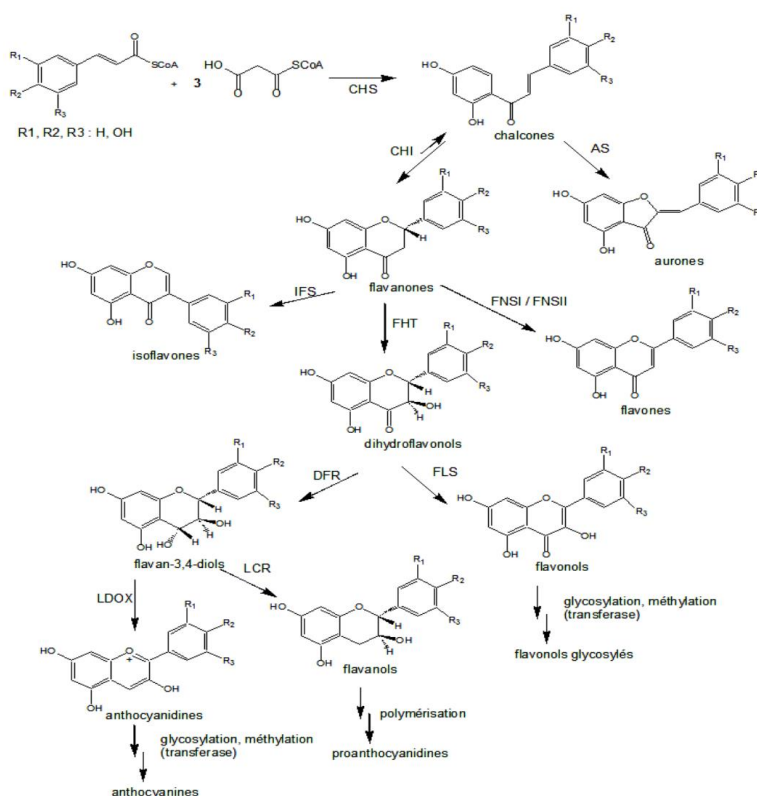


**Figure 04** : Structure de base des flavonoïdes (Balasundram N. *et al.*, 2006).

Le cycle aromatique A est dérivé de la voie acétate/malonate, tandis que le cycle B est dérivé de la phénylalanine par la voie de shikimate sous l'intervention de la chalcone synthase (CHS) (Merghem R., 2000). Dans les conditions physiologiques normales, la 9 chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone, en fait la cyclisation de la chalcone est catalysée par une enzyme, la chalcone isomérase (CHI) qui induit une fermeture de cycle conduisant à une flavanone constituant le squelette de base des flavonoïdes.

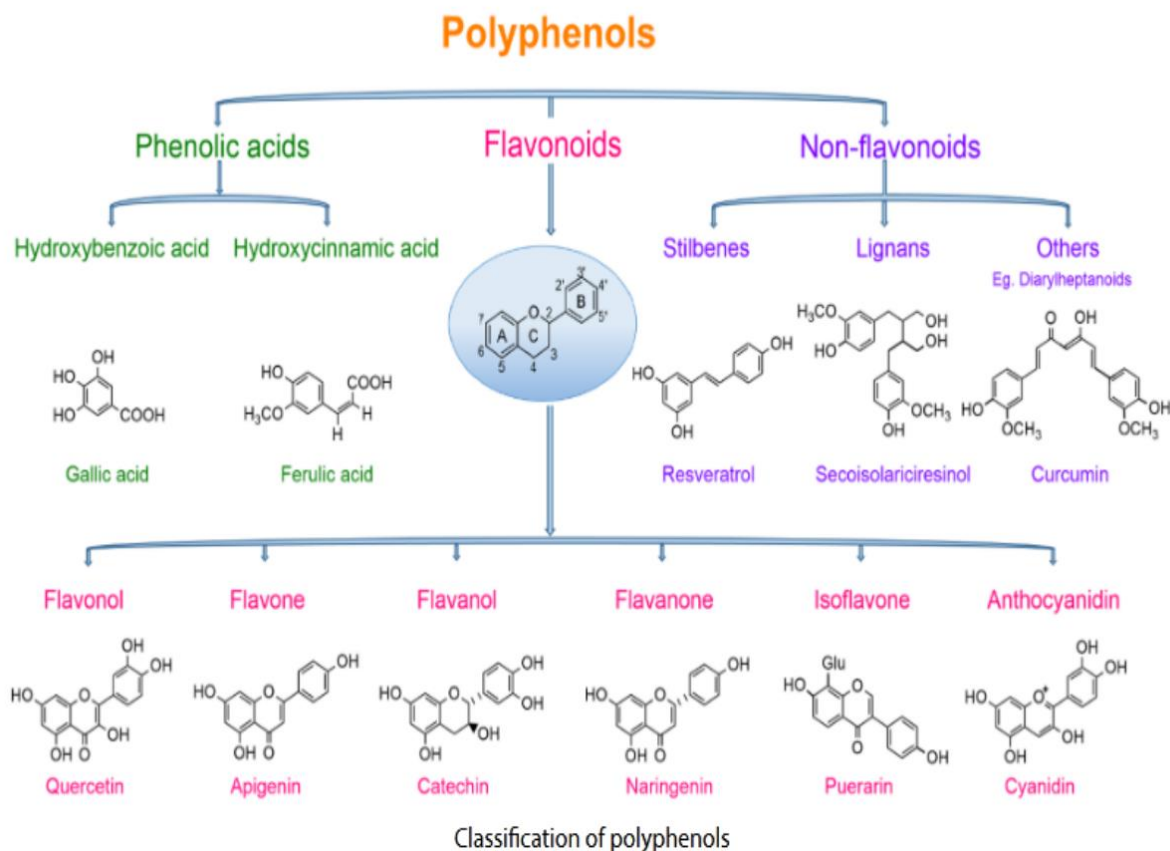
Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes, et dans chaque classe, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïdes 3'-hydroxylase, flavonoïde 3', 5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl CoA transférase) ou polymérisation (**Merghem R., 2000**).

La **Figure 05** ci-dessous présente les voies de biosynthèse des flavonoïdes adaptées selon **Winkel-Shirley B., (2002)**.



**Figure 05** : Voies de biosynthèse des flavonoïdes adaptées de **Winkel-Shirley B., (2002)**.

**AS** : aurone synthase, **CHI** : chalcone isomérase, **CHS** : chalcone synthase, **DFR** : dihydroflavonol 4-réductase, **FHT** : flavanone 3-hydroxylase, **FLS** : flavonol synthase, **FNSI/FNSII** : flavone synthase, **IFS** : isoflavone synthase, **LDOX** : leucoanthocyanidin dioxygénase, **LCR** : leucoanthocyanidin réductase.



**Figure 06** : Classification des polyphénols (**Rambaran T. et al., 2020**).

### 3. 2. 2. 1. Flavones et flavonols

Les flavones et flavonols (quelques exemples se trouvent dans les tableaux ci-dessus) sont les composés flavonoïdiques les plus répandus ; en 2004, on dénombrait plus de 1100 génines de structure connue (530 flavones et 600 flavonols), et environ 1400 hétérosides de flavonols et 700 hétérosides de flavones (**Bruneton J., 2009**). Les flavonols diffèrent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en C3. Chez les flavonols, la position 3 de l'hétérocycle est toujours glycosylée, ainsi que fréquemment la position 7 du cycle A mais jamais la position 5 (**Macheix J.J. et al., 2006**). La teneur des flavonols est plus élevée dans la peau des fruits puisque la lumière en stimule la biosynthèse.

### 3. 2. 2. 2. Flavanones et dihydroflavonols

Les flavanones et dihydroflavonols (quelques exemples sont donnés dans les tableaux ci-dessus) sont caractérisés par l'absence de la double liaison entre le C2 et C3. Les dihydroflavonols se différencient des flavanones par la présence d'un groupement hydroxyle

en position 3 (**Chosson E. et al., 1998**). Les flavanones se retrouvent surtout dans les agrumes et les tomates. La menthe constitue également une source abondante (**Benbrook CM., 2005 ; Ignat I., 2011**).

### 3. 2. 2. 3. Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et kuanos, bleu violet) sont des pigments hydrosolubles responsables des couleurs bleu, mauve, rouge ou rose de certaines parties végétales (fleurs, fruits, feuilles, racines...) (**Valls J. et al., 2009**).

Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge positive sur l'oxygène de l'hétérocycle C. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment.

### 3. 3. Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, dont les masses molaires se situent entre 500 et 3000. Ils présentent les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine, et les autres protéines (**Merghem R., 2009 ; Stevanovic., 2005**). Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau.

D'après leurs structures et leurs propriétés, deux types de tannins sont distingués : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

Les tanins hydrolysables sont des dérivés de l'acide gallique ; ce dernier est estérifié à un polyol. Tandis que les tanins condensés (ou proanthocyanidines) sont des oligomères hétérogènes dont la structure est liée aux flavan 3-ols et flavan 3,4- diols, les unités de monomères sont principalement liées par des liaisons C-C entre les carbones 4-6 ou 4-8 (proanthocyanidine type B). Les tanins condensés sont distingués en procyanidine (dérivé de catéchine, épicatechine et leurs esters galliques) et en prodelpinidines (dérivés de gallocatéchine, épigallocatéchine et leurs esters galliques) (**valls J. et al., 2009 ; Ignat I. et al., 2011**).

## 4. Activités biologiques

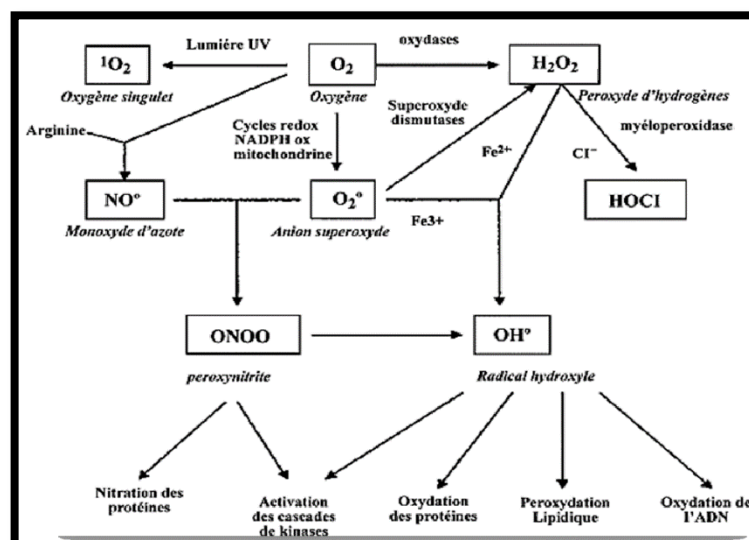
### 4. 1. Activité antioxydante

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires (**Haleng J. et al., 2007**).

#### 4. 1. 1. Radicaux libres

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atome ou molécule qui possède un électron ou plus non apparié. De par sa structure particulière, il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité, ce qui rend les autres constituants organiques et les structures cellulaires très réactives (**Bruneton J., 1999**) (**Figure 07**).

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété des radicaux libres dérivent de l'oxygène tel que l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le radical superoxyde  $O_2^-$ , les peroxydes ROOH et les radicaux hydroxyles OH et les alkoxydes RO (**Cavin A., 1999**), ces dérivés sont utiles pour l'organisme à une dose raisonnable. La production peut devenir excessive à cause des phénomènes toxiques endogènes ou exogènes dont l'organisme doit se protéger par des différents systèmes antioxydants (**Favier A., 2003**).



**Figure 07 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène  
(Hazzout A. *et al.*, 2008).

#### 4. 1. 2. Défenses antioxydantes

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation (exogène) sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (Haleng J. *et al.*, 2007).

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, ils réagissent rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulier pour la transformer en chaleur (Hellal Z., 2011).

#### 4. 1. 3. Prévention alimentaire

L'alimentation contient un grand nombre d'antioxydants, non seulement les vitamines (E, C, Q,  $\beta$  carotène) et les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse), mais aussi 600 sortes de caroténoïdes, 4 000 polyphénols et flavonoïdes (trouvés dans les choux, le thé, le vin, les céréales, les fruits), des alcaloïdes, des acides organiques, des phytates, des dérivés soufrés de l'ail et de l'oignon, des dérivés indoliques du chou (Favier A., 2003).

##### 4. 1. 3. 1. Défenses endogènes :

-Systèmes de défense enzymatiques

Les super oxydes dismutases (SODs).

Glutathion peroxydases (Gpxs).

Le système thiorédoxine.

La catalase. (Haleng J. *et al.*, 2007).

-Systèmes de défense non enzymatiques

NADPH, les dipeptides (**Boldyre V., 1993**).

Le glutathion et les protéines-thiols (**Piquet M. et al., 2007**).

L'acide urique (**Ames B. et al., 1993**).

L'acide lipoïque (**Pham-Huy C. et al., 2008**).

## **4. 2. Activité antibactérienne**

### **4. 2. 1. Définition**

L'activité antibactérienne correspond à l'activité d'une molécule ou d'un composé présent au sein d'un végétal qui, à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie à un antibactérien varie selon la nature de l'antibactérien (**Dorman H et Deans S., 2000**).

### **4. 2. 2. Agents antimicrobiens**

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (commission européenne (CE), 2001).

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificité d'action. Cette dernière peut globalement être répartie en deux types : action bactéricide (ou germicide) pour les agents ayant une action létale sur les bactéries, action bactériostatique pour les agents qui inhibent les bactéries sans les tuer (**Euzéby J., 2005**).

### **4. 2. 3. Agents chimiques**

Les agents chimiques antimicrobiens sont très nombreux. Leur choix dépend de l'usage auquel ils sont destinés, de leur activité, de leur toxicité, de leur stabilité, de leur pouvoir corrosif ou colorant, de leur odeur, etc. Parmi ces agents chimiques les agents oxydants oxygénés, le chlore et dérivés, les alcools, les phénols, autres composés phénoliques et aromatiques (**Guiraud J., 1998**).

### **4. 2. 4. Agents physiques**

En raison de leur faible spécificité, la plupart des agents physiques antimicrobiens sont efficaces sur l'ensemble des microorganismes, en affectant leurs acides nucléiques ou les protéines. Les quatre agents les plus fréquemment employés sont la chaleur, les basses températures, la filtration et les radiations (**Prescott M. et al., 2003**).

#### **4. 2. 5. Agents chimio-thérapeutiques**

Un agent chimio-thérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faible dose. Il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tuer tout en étant inoffensif pour l'hôte. Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimio-thérapeutiques antibactériens : Les sulfamides, sont des produits de synthèse. Les antibiotiques beaucoup sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémisynthèse. Ils comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent : la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines, certaines réactions du métabolisme intermédiaire (**Guillaume A., 2000**).

### **4. 3. Antibiotiques**

#### **4. 3. 1. Définition**

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres microorganismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe (**Gogny M. et al., 2001**). Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans n'être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne (**Ogawara H., 1981**).

#### **4. 3. 2. Antibiotiques naturels et synthétiques**

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (**Newman D. et al., 2003**).

#### **4. 3. 3. Mode d'action des antibiotiques**

Les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne, cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont



actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés **(Mevius D. *et al.*, 1999)**.

Les antibiotiques peuvent agir sur :

La paroi bactérienne : Pénicilline et Céphalosporine agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane au cours de la multiplication cellulaire **(Zeba B., 2005)**.

La membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur. L'ADN : Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase **(Flandrois J. *et al.*, 1997)**.

Le ribosome bactérien : les aminoglycosides ou aminosides (streptomycine, gentamycine, amikacine), empêchent la traduction de l'ARNm se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes **(Hermann T., 2005)**.

## Chapitre III : Cardiovasculaire



## 1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires, ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, figurent aujourd'hui parmi les premières causes de décès dans le monde. Elles touchent les organes vitaux comme le cœur, le cerveau, les poumons, mais peuvent aussi être source d'invalidité ou de morbidité chronique. Les maladies cardiovasculaires sont liées à l'agression des radicaux libres (ou Espèces Réactives de l'Oxygène ERO) sur les cellules de l'organisme (**Guillouty A., 2016 ; Codoñer-Franch P. et al., 2011**).

Cette agression est provoquée par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de dépenses antioxydant de l'organisme (**Beaudeau J et Durand G., 2011**). Les accidents vasculaires cérébraux constituent aujourd'hui la première cause d'hospitalisation dans le monde (**OMS., 2015**).

## 2. Facteur de risque cardiovasculaire

### 2. 1. Facteurs de risque non modifiables

- Âge : c'est un facteur de risque continu qui accroît progressivement l'incidence des complications de l'athérome aortique, coronaire puis carotidien et l'insuffisance cardiaque. Ce risque devient significatif à partir de 50 ans chez l'homme et 60 ans chez la femme.
- Sexe masculin : avant 70 ans, deux tiers des infarctus surviennent chez l'homme.

Cette différence diminue chez la femme après la ménopause et disparaît après 75ans. L'influence des estrogènes naturels explique la plus faible incidence des complications de l'athérome chez la femme que chez l'homme.

- Héritéité : les antécédents familiaux cardiovasculaires, coronaires, d'Accident

Vasculaire Cérébral < 55 ans pour le père ou < 65 ans pour la mère (**Rosengren A. et al., 2009**).

## 2. 2. Facteurs de risque modifiables

### 2. 2. 1. Tabagisme

Il accroît les lésions athéromateuses, par altération de la fonction endothéliale, avec perturbation de la vasomotricité, activation de l'agrégation plaquettaire et baisse du High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité) -cholestérol. Il est athérogène et prothrombotique.

Son risque relatif est de 5 pour l'infarctus et  $> 2$  pour l'artériopathie des membres inférieurs. Ce risque relatif existe aussi lors de tabagisme passif.

Le risque est proportionnel à l'exposition au tabac, évaluée en paquets-années.

Le bénéfice de l'arrêt du tabac est rapide : disparition de l'augmentation du risque relatif en 3 ans et diminution de 50 % du risque de récurrence chez un coronarien.

### 2. 2. 2. Hypertension artérielle

Elle se définit par des valeurs de pression  $> 140$  mmHg pour la systolique (Pression Artérielle Systolique) ou  $> 90$  mmHg pour la diastolique (Pression Artérielle Diastolique).

Tous les types d'hypertension artérielle (HAT) sont des facteurs de risque : HTA permanente, paroxystique, traitée ou non.

Son risque relatif est de 7 pour les AVC et 3 pour la maladie coronaire et 2 pour l'artériopathie des membres inférieurs. Avant 55 ans, ce risque est corrélé autant aux valeurs de pressions systoliques que diastoliques. Après 60 ans, la corrélation est plus forte avec la pression pulsée (PAS – PAD), donc surtout la pression systolique chez les personnes plus âgées.

Le traitement de l'HTA baisse de 40 % le risque d'AVC et de 15 % celui de l'infarctus.

(<http://umvf.univ-nantes.fr/cardiologie-et-maladies-vasculaires/enseignement/card>).

### 2. 2. 3. Dyslipidémies

Parmi les anomalies des lipides circulants, le principal facteur de risque des maladies cardiovasculaires est l'élévation du Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de basse densité) -cholestérol, cholestérol lié aux lipoprotéines de faible densité  $> 1,60$  g/L (4,1mmol/L).

Le LDL-cholestérol est corrélé positivement au risque de maladie cardiovasculaire, alors que le HDL-cholestérol a une corrélation négative, s'il est  $> 0,40$  g/L (1 mmol/L).

L'élévation seule des triglycérides ( $> 2,0$  g/L) n'est pas un facteur de risque (indépendant), mais peut le devenir lors d'association avec d'autres éléments (cf. syndrome métabolique).

Le LDL-cholestérol a un rôle direct sur l'accroissement des plaques d'athérome et sur leur rupture par instabilité.

L'hypercholestérolémie a un risque relatif de 3 pour les maladies coronaires, plus important que pour l'artériopathie et les AVC. L'efficacité du traitement des hypercholestérolémies a été le principal facteur de baisse de la mortalité cardiovasculaire ( $- 30$  % en 20 ans).

#### **2. 2. 4. Diabète**

Le diabète est défini par deux dosages à jeun  $> 1,26$  g/L (7 mmol/L) ou un seul dosage de glycémie  $> 2$  g/L (11 mmol/L).

Les diabètes I ou II sont tous associés à une augmentation du risque cardiovasculaire. Les complications cardiovasculaires sont plus précoces à partir de 30 ans, pour le diabète I, mais l'incidence galopante du diabète II en fait un facteur de risque très préoccupant.

Son risque relatif est  $> 2$ , provoquant surtout l'artériopathie plus que la maladie coronaire et l'AVC. Mais le diabète se complique encore plus souvent de lésions microvasculaires (rétinopathies et néphropathies). Ce risque relatif augmente lors d'anomalies rénales.

Le traitement du diabète avec un objectif d'hémoglobine glyquée (HbA1c) à 6,5 % diminue l'incidence des complications cardiovasculaires.

#### **2. 2. 5. Insuffisance rénale**

L'insuffisance rénale chronique est associée à une forte incidence des complications cardiovasculaires, comparable à la gravité du diabète sur le système cardiovasculaire.

#### **2. 2. 6. Autres facteurs de risque**

Ils sont nombreux mais leur responsabilité causale directe est moindre ou ils agissent par aggravation des facteurs de risque principaux.

- Sédentarité :

- la comparaison de populations sédentaires et actives physiquement attribue un risque relatif d'infarctus de 2 à 3 à la sédentarité. C'est un facteur de risque indépendant, mais surtout aggravant d'autres facteurs de risque très souvent associés : HTA, diabète, dyslipidémies et surpoids.

- la lutte contre la sédentarité diminue l'incidence des complications cardiaques et vasculaires ; c'est la base de la réadaptation cardiaque et du traitement de l'artériopathie des membres inférieurs en prévention secondaire.

- **Obésité :**

- l'indice de masse corporelle (Indice de Masse Corporelle).
- le risque cardiovasculaire est corrélé avec cet IMC, d'autant plus que l'obésité est androïde, par prépondérance de graisses intra-abdominales.

- très souvent associée à d'autres facteurs de risque (HTA, diabète), sa prise en charge est difficile mais indispensable, la perte de poids est corrélée avec une diminution des complications cardiovasculaires.

- **Syndrome métabolique :** il est lié à l'insulino-résistance qui expose à un double risque, des complications cardiovasculaires fréquentes et un taux élevé d'apparition du diabète. Ce syndrome métabolique se définit par la présence de trois des cinq éléments suivants :

- obésité abdominale : tour de taille > 102 cm (homme) ou > 88 cm (femme).
- HDL-cholestérol : < 0,40 g/L (1 mmol/L) chez l'homme et < 0,50 g/L (1,3mmol/L) chez la femme.
- triglycérides > 1,5 g/L (1,7 mmol/L).
- pression artérielle > 130/85 mmHg.
- glycémie à jeun > 1,10 g/L (6,1 mmol/L) (**Société française de cardiologie., 2007**).

## Chapitre IV : Matériel et méthodes



Le présent travail a été réalisé au laboratoire ancien biopole de biologie à chaabat ernessas à université frères mentouri (Constantine 1).

## 1. Matériel végétal

Les feuilles de la plante (*Thymus algeriensis*), a été récolté de la région Maarif de la wilaya Msila (**Figure 09**) ; au cours des mois d'octobre 2021, Les parties aériennes (tiges et feuilles) ont été séchées à l'air libre (**figure 08**).



**Figure 08** : Feuilles séchées de *Thymus algeriensis* (originel, 2022).



**Figure 09** : Origines géographique de l'échantillons (Merniz N., 2018).

## 2. Technique d'extraction des composé phénolique

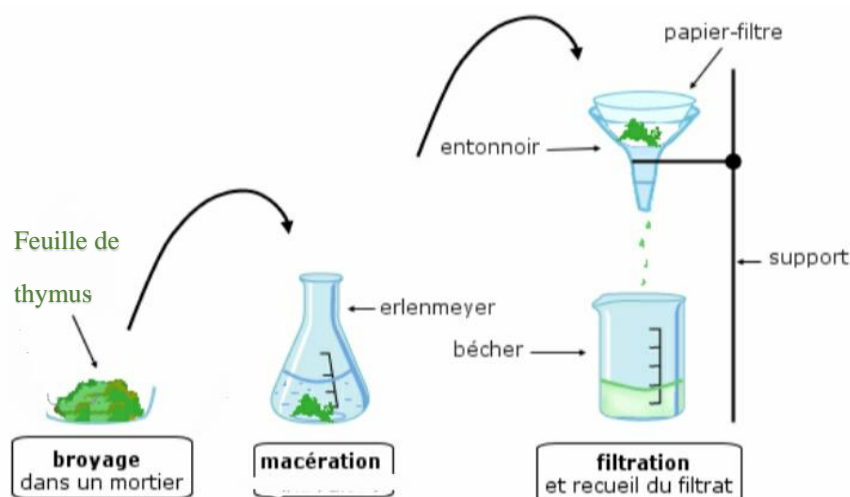
### 2. 1. Macération

L'extraction peut se faire à froid (macération), ou à chaud sous reflux et le temps d'extraction peut varier en fonction du matériel végétal et de la solubilité des composés (Merghem R., 2009).

#### 2. 1. 1. Protocole

Avant de commencer l'extraction, les feuilles séchées ; subissent un broyage avec les mains c'est tout.

Les flavonoïdes sont extraits par macération dans un mélange éthanol /eau (7/3), équivalent à 500 ml. Cette macération se fait en trois temps, c'est-à-dire pendant trois jours successifs avec changement du solvant chaque 24 h ; ceci pour permettre une meilleure extraction de composés flavonique (nos ce fait une seule fois la macération) (**Figure 10**).



**Figure 10** : Technique d'extraction des composéé phénolique ([www.pagesperso-orange.fr.com](http://www.pagesperso-orange.fr.com)).

## 2. 2. Concentration

Le volume total de ces macérations hydroalcooliques (500ml) est filtré puis évaporé à sec sous agitation (vitesse de rotation 4 à 7) et chauffage à 40°C (l'éthanol est très volatil), dans un rotavapor (**Figure 11**). Ne pas sécher l'extrait dans le rotavapor, laisser 100 ml à peu près et remplir par l'eau distillée ; jusqu'à 100 ml.



**Figure 11** : Evaporation à l'aide du rotavapor au niveau du laboratoire **ancien biopole de biologie, 2022**.

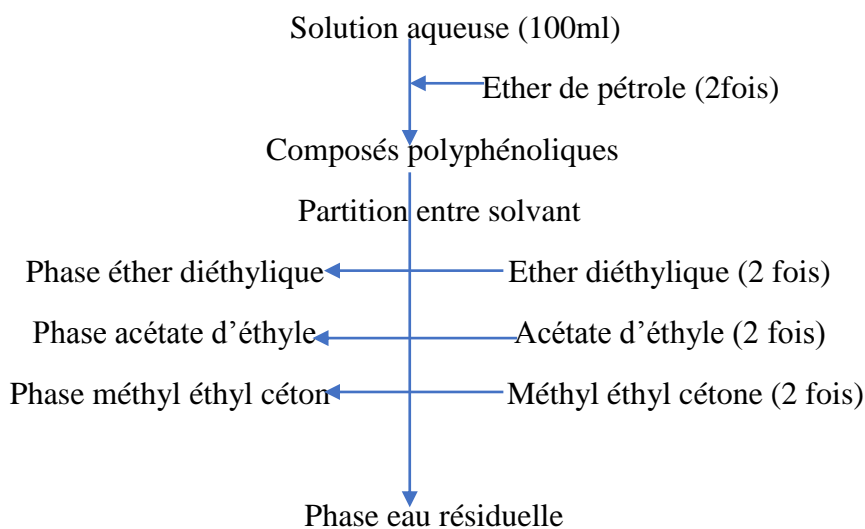
## 2. 3. Affrontement par différentes solvant

Séparation des polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation par déférent solvant :

- Affrontement par éther de pétrole pour éliminer toutes les composés non phénoliques (lipide, pigments, chlorophylliens ...etc).
- Affrontement par éther diéthylique pour solubiliser les composés phénoliques simple, en plus des tannins monomériques.
- Affrontement par acétate d'éthyle pour entraîne les aglycones, les monoglycosides et partiellement les di-o-glycosides en plus des tannins monomérique.
- Affrontement par MEC (méthyle éthyle cétone) pour entraîner les tannins trimérique, oligomériques et une partie des tannins polymériques.

### 2. 2. 1. Mode opératoire

Les étapes de préfractionnement et de purification des polyphénols des feuilles de thymus.



Protocole d'extraction des flavonoïdes (**Merghem R., 2009**).

Lors d'une extraction liquide/liquide :

- L'espèce chimique à extraire est plus soluble dans le solvant extracteur que dans le solvant de départ.
- Et le solvant extracteur et le solvant de départ sont non miscibles.
- L'extraction par un solvant consiste à dissoudre l'espèce chimique recherchée dans un solvant non miscible avec l'eau et à séparer les deux phases obtenues.
- L'extraction par un solvant se réalise dans une ampoule à décanter.

- Le choix du solvant dépend de l'espèce (*Thymus algeriensis*).
- L'espèce chimique doit être plus soluble dans le solvant que dans l'eau (les solvant utilisé : éther diéthylique, acétate d'éthyle, méthyl éthyl cétone).

### 2. 2. 1. 1. Affrontement par l'éther de pétrole

Dans une ampoule à décanter, introduire les 100ml de solution aqueuse limpide et ajouter 100ml d'éther de pétrole agiter énergiquement.

- La phase éther de pétrole (phase supérieure de l'ampoule à décanter) est éliminée.
- La phase eau (phase inférieure de l'ampoule à décanter) est récupérée dans un bécher propre, faire cette étape deux fois.

### 2. 2. 1. 2. Affrontement par l'éther diéthylique

Mettre la phase eau dans une ampoule à décanter (100ml) et lui ajouter 100ml d'éther diéthylique. Agiter énergiquement avec précaution. Laisser reposer jusqu'à la formation de deux phases (**figure 12**) :

- La phase supérieure appelée phase éther récupérée dans un bécher de 100ml et est laissée évaporée à l'air libre (contient des polyphénols simple).
- La phase inférieure appelée phase eau (contient le reste des flavonoïdes) récupérée dans un bécher, faire cette étape deux fois.

### 2. 2. 1. 3. Affrontement par l'acétate d'éthyle

La phase eau est soumise à une deuxième extraction liquide-liquide (partition entre solvant) avec de l'acétate d'éthyle.

Mettre la phase eau dans une ampoule à décanter et ajouter 100ml d'acétone d'éthyle, agiter énergiquement, laisser se reposer jusqu'à la formation de deux phases :

- La phase supérieure appelée phase acétate d'éthyle récupérer dans un bécher.
- La phase inférieure appelée phase eau résiduelle récupérer dans bécher, faire cette étape deux fois.

#### 2. 2. 1. 4. Affrontement par méthyle éthyle cétone (MEC)

Remettre la phase eau dans l'ampoule à décanter et ajouter 100ml de MEC, agiter énergiquement, laisser se reposer jusqu'à la formation de deux phases :

- La phase supérieure appelée phase méthyle éthyle cétone récupérer dans bécher.
- La phase inférieure appelée phase eau résiduelle est récupérer aussi dans un bécher.

**NB :** Les 3 phases : acétate d'éthyle, méthyle éthyle cétone et eau résiduelle sont évaporé à sec à l'aide de rotavapor et reprises chacune par 5ml de méthanol ; puit mettre dans des tubes en verre.



**Figure 12 :** séparation d'extrait (la formation des deux phases défèrent) au laboratoire **ancien biopole de biologie, 2022.**

### 3. La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique (Aspect qualitatif)

#### 3. 1. Définition d'une chromatographie

##### a. Histoire de la technique

À l'origine, cette technique servait à séparer des espèces chimiques végétales colorées contenues dans un mélange. Son nom vient d'ailleurs de la racine grecque **Khrôma** et fut employé pour la première fois par le botaniste russe **Mikhaïl Tswett en 1906** qui sépara les pigments d'une feuille d'épinard.

La chromatographie est aujourd'hui une méthode de séparation, mais également d'identification des constituants d'un mélange.

##### b. Le principe

La Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M) est une technique qui permet d'identifier les constituants d'un mélange.

Les constituants d'un mélange homogène sont séparés par entraînement au moyen d'un solvant (nommé éluant ou phase mobile) sur un support (nommé phase fixe ou stationnaire).

Une petite quantité du mélange à séparer est déposée sur le support (la plaque chromatographie).

Le support est ensuite placé au contact de l'éluant.

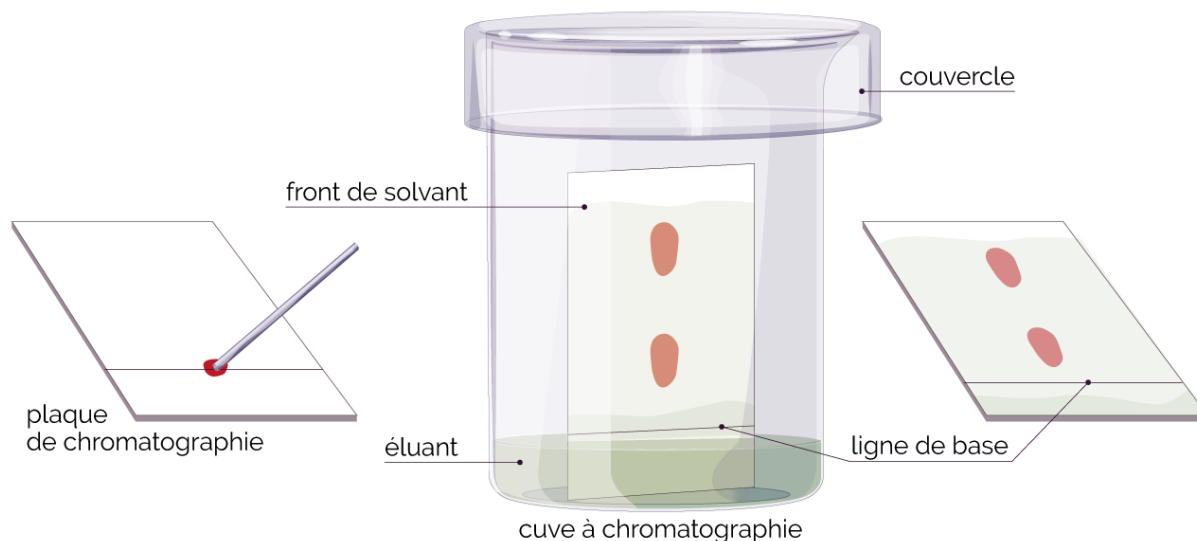
L'éluant migre de bas en haut, par capillarité, le long du support.

L'éluant entraîne ainsi les constituants du mélange vers le haut du support. C'est le phénomène d'élution.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance. C'est la migration différentielle.

Il suffit alors de comparer la migration de ces constituants avec des espèces chimiques de référence ou témoins. C'est l'analyse comparative ([www.maxicours.com](http://www.maxicours.com)).

### 3. 2. Protocole détaillé de la chromatographie sur couche mince



**Figure 13 :** Chromatographie : montage et vocabulaire

#### Étape 1 :

- Préparation de la phase stationnaire : pour la CCM des polyphénols, on utilise un gel de polyamide DC6. Le gel est préparé en mélangeant 10g de poudre de polyamide dans 55ml d'éthanol. Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation.

- Préparation de la phase mobile : La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organique. Le système solvant utilisé pour la CCM de gel polyamide Toluène, Méthyl éthyl cétone, Ethanol : 40/30/30.

Ce mélange de solvant est utilisé pour la phase ether diéthylique et phase acétate d'éthyl et phase MEC.

#### Étape 2 :

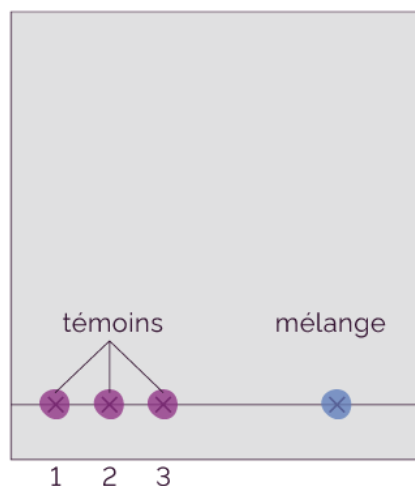
Préparation de la cuve à chromatographie et du support.

On verse environ 0,5 à 1 cm d'éluant dans la cuve à chromatographie que l'on referme avec un couvercle de manière à ce que l'éluant sature la cuve en vapeur.

On trace alors un trait fin appelé ligne de dépôt (ou ligne de base) sur la plaque à chromatographie de manière à ce que ce trait soit au-dessus du niveau de l'éluant.

Étape 3 :

Préparation des dépôts.



**Figure 14** : Préparation de la ligne de base

Sur la ligne de base, on doit réaliser les différents dépôts :

- le mélange ;
- les témoins : ce sont les produits susceptibles d'entrer dans la composition du mélange.

On respecte des espaces réguliers entre chaque dépôt. On place de fines croix à l'endroit de ces dépôts et on les repère par une lettre ou un nom.

On doit enfin sécher ces dépôts pour bien les fixer sur le support.

Étape 4 :

Réalisation de la chromatographie.

La plaque est placée dans la cuve à la verticale et le couvercle est remis en place.

On laisse l'éluant migrer par capillarité.

On sort la plaque lorsque ce dernier arrive à ~0,5 cm du haut de la plaque en y traçant un nouveau trait appelé front du solvant.



La tache constituée du mélange va migrer vers le haut en se divisant en autant de taches qu'il y a de constituant.

Étape 5 :

Révélation et analyse du chromatogramme par comparaison.



**Figure 15** : Fin de la chromatographie

Les taches ne sont pas nécessairement visibles. Parfois, il est nécessaire de plonger la plaque dans un révélateur qui va les rendre visibles.

On compare la hauteur des taches issues du mélange à celles des témoins.

Les taches qui sont arrivées à la même hauteur sont constituées d'un même produit.

#### **4. Identification**

Il existe différentes méthodes d'identification des polyphénols, parmi ces méthodes :

##### **4. 1. Relation : structure-fluorescence**

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes, le tableau résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

**Tableau 03** : Révélation des flavonoïdes après séparation CCM (Markham K., 1982).

Spots coloré	Types de flavonoïdes
Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
Rose	Anthocyanidine 3,5 di glucoside
Orange	Anthocyanidine 3 glucoside
Orange pale	Anthocyanidine 3 glucoside
Jaune	Flavonols
Jaune pale	Flavonols
Vert	Rutine
Bleu sombre	Flavonols, flavonones, aurones
Bleu vif	Hydroquinones
Bleu pale	Acide phénol
Bleu blanc fluo	Acide phénol
Mauve	Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavones
Violet	Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavones
Pourpre sombre	Chalcones

#### 4. 2. Relation : structure-RF

Le facteur de rétention (Rf) apporte aussi des informations sur la structure des polyphénols. Le facteur de rétention est calculé d'après la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre la ligne de base et la tâche du produit}}{\text{Distance entre la ligne de base et le front de solvant}}$$

Sachant que la valeur du Rf n'est pas une constante physique du corps, car elle est influencée par plusieurs facteurs, tels que la nature du solvant, la technique employée, la température ainsi les différents substituants et leurs positions sur le squelette flavonique (**Tableau 04**).

**Tableau 04** : Relation entre Rf- Structure flavonique (Akroum S., 2011).

Structure flavonique	Rf
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	RF augmente dans un solvant aqueux RF diminue dans un solvant alcoolique
Hydroxyles méthylés	RF augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	RF diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3-OH libre	RF nul dans l'eau

## 5. La spectrophotométrie UV-Visible

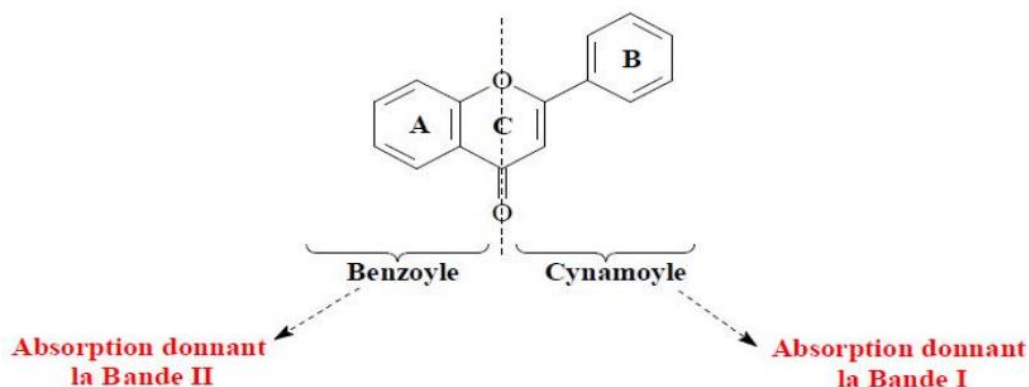
### 5. 1. Définition

Les méthodes spectroscopiques utilisent la lumière pour effectuer des études qualitatives ou quantitatives des molécules dans différents milieux. Dans les suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement aux analyses quantitatives en milieu liquide. Une bonne connaissance de ces méthodes est fondamentale car, outre les mesures classiques effectuées sur un spectrophotomètre, de nombreuses méthodes automatisées ou non utilisent les propriétés spectrales de la lumière (**Haique B. et al., 2008**).

### 5. 2. Principe

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV. Dans le méthanol neutre, les composés flavonoïdiques absorbent dans deux régions différentes du spectre ultra-violet entre 300 et 385 (Bande I), et entre 250 et 280 (Bande II) (**Figure 16**).

- La Bande I correspond à l'absorption du système cinnamoyle qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B.
- La bande II est associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A, cette bande permet de connaître le nombre de substituants du noyau A (**Lahouel M. et al., 2004**).

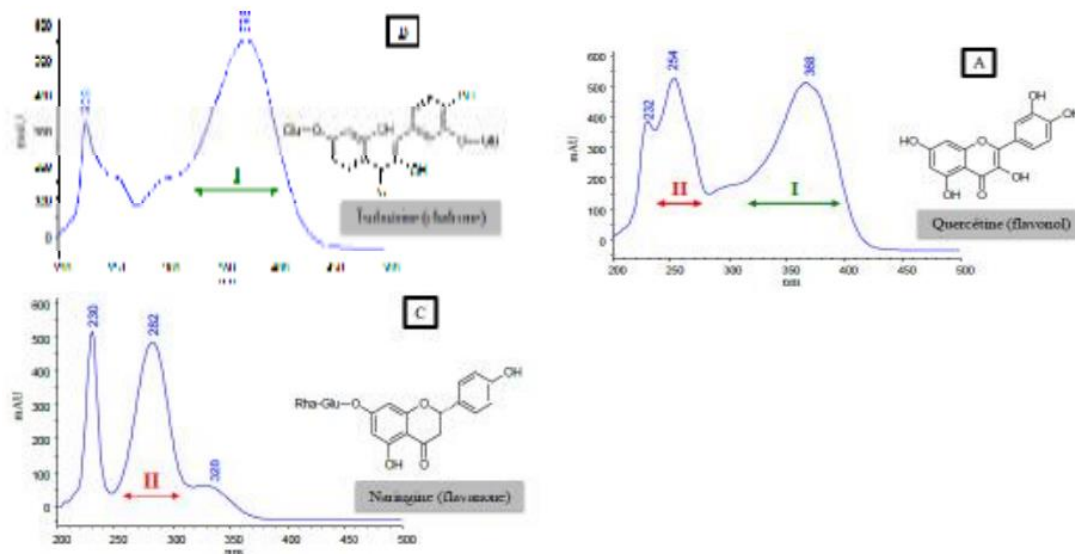


**Figure 16 :** Spectre d'absorption d'un flavonoïde

Suivant le nombre de doubles liaisons conjuguées sur la structure des flavonoïdes, ces bandes seront plus ou moins intenses. Il est ainsi facile de faire la différence entre des molécules aglycones à cycle C ouvert (chalcone, aurone) qui ont une bande II très réduite et les autres flavonoïdes à cycle C fermé qui possèdent une bande II beaucoup plus intense. Par contre, les isoflavones et les flavanones possèdent une bande I qui est généralement réduite à un épaulement (**Figure 17**). **Le Tableau 05** montre les principales classes de flavonoïdes et leur spectre d'absorption UV-visible.

**Tableau 05 :** Les principales caractéristiques des spectres UV-visible des flavonoïdes (**Markham K., 1982**).

Bande II (nm)	Bande I (nm)	Types de flavonoïdes
250-280	304-350	Flavones
250-280	352-385	Flavonols
250-280	328-357	Flavonols substitué en C3
275-295	300-330	Flavanones et dihydroflavanol
230-270	340-390	Chalcone
230-270	380-430	Aurone
270-280	465-560	Anthocyane
245-275	310-330	Isoflavone



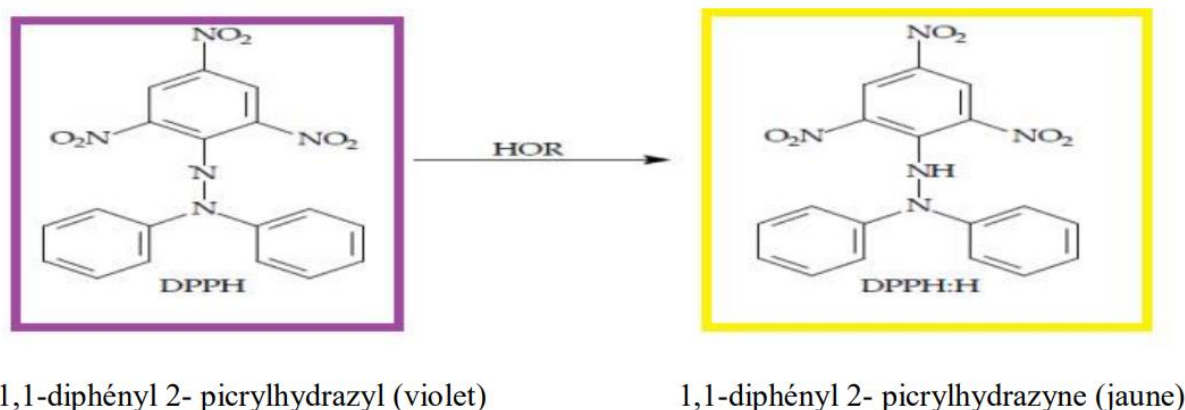
**Figure 17** : Spectres UV-vis de la quercétine (flavonoï) (A), de l'isobutrine (chalcone) (B) et de la naringénine (flavanone) (C) enregistrés entre 200 et 500nm (Michel M., 2011).

## 6. Le pouvoir antioxydant « test au DPPH° »

La méthode de DPPH° a d'abord été décrite par **Blois** en **1958**, et a ensuite été largement modifiée par de nombreux chercheurs (**Pereira Nunes X. et al., 2012**). Le DPPH° (1,1-diphényl -2- picrylhydrazyle) (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> ; M= 394,33g/mole) est un radical libre stable, de couleur violette (**Figure 18**) qui réagit avec des composés qui peuvent donner un atome d'hydrogène, mais il est sensible à la lumière, à l'oxygène, au pH et à la nature du solvant utilisé (**Schever R et Godoy H. T., 2009**).

### 6. 1. Principe

Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH° accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule scavenger par exemple un antioxydant, résultant une réduction du DPPH° en DPPH<sub>2</sub>, un changement de la couleur (violette) en jaune (**Mishra K. et al., 2012**). Le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants.



**Figure 18** : Forme libre et réduite du DPPH° (Pereira Nunes X., 2012).

## 6. 2. Mode opératoire

L'activité anti-radicalaire de ces extraits et étudiée selon le protocole suivant :

- 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,25% est préparée à l'avance au moins 1-2 heures car la solubilisation est difficile).
- En à tester l'extraits par l'ajoute des gouttes par ordre diminue (5,2,1 gouttes).
- On prend 5 micro-tubes et mettre dans chaque tube 5ml de DPPH et ajouter des gouttes de l'extrait à tester dans différent phases (phase éther, acétate, MEC et eau).

## Chapitre V : Résultats et discussion

Ces dernières années, les recherches scientifiques ont été focalisées sur l'extraction des composés phénoliques à partir de nouvelles sources végétales peu coûteuses ou résiduelles des industries agro-alimentaires. Le résultat de plusieurs études (**Ivanisova E. et al., 2012 ; Vitaglione P. et al., 2008 ; Liyana- Pathirana C.M et Shahidi F., 2007**) confirme que les composés phytochimiques (composés phénoliques, vitamines, caroténoïdes, minéraux) d'intérêts bénéfiques à la santé des consommateurs se trouvent principalement dans les feuilles des plantes.

Dans notre étude, nous avons effectué des étude et qualitative des composés phénoliques sur *Thymus algeriensis*.

## **1. Analyse phytochimique**

### **1. 1. Préparation des extraits**

L'extraction est une étape très importante dans l'isolement, l'identification et l'utilisation des composés phénoliques (**Ignat I. et al., 2011**). Les méthodes d'extraction dépendent aussi bien du matériel végétal que des molécules recherchées. L'optimisation d'une procédure d'extraction des métabolites d'un organe donné est une démarche fondamentale, en effet, si un composé n'est pas extrait de l'échantillon, il ne pourra bien évidemment pas être identifié et dosé.

L'extraction par les solvants spécifiques à la température ambiante (macération) est la méthode la plus perfectionnée au niveau de notre laboratoire. Le choix du système solvant est en fonction de la polarité des composés d'intérêts, de la polarité des composés indésirables, du cout global et de la sécurité du manipulateur (**Wang Y. et al., 2008**).

Après les extractions et les partitions entre solvants entre solvants, les phases éther diéthylique, acétate d'éthyle, méthyl éthyle cétone (MEC) et eau sont évaporées à sec et reprises dans 5ml de méthanol.



## 2. Aspect qualitatif

### 2. 1. Diagnostic sur chromatographie analytique sur couche mince

La CCM analytique est une méthode simple, couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapide des constituants d'un extrait donné avant l'analyse détaillée par d'autres techniques instrumentales.

Les plaques de CCM utilisées sont des plaques de verre constituées de gel de polyamide DC6. La chromatographie sur polyamide des phénols est basée sur la formation réversible de liaisons hydrogène de différentes intensités entre d'une part les groupes amides du polyamide et d'autre part l'échantillon et l'éluant. Les éluants qui conviennent le mieux sont ceux qui réussissent à rompre les liaisons hydrogène entre le substrat et l'adsorbant.

Des difficultés ont été trouvées pour atteindre une séparation satisfaisante à l'analyse des constituants du dépôt. Plusieurs systèmes solvants ont été essayés et le meilleur a été gardé : (Toluène, MEC, ETOH : 40/30/30).

L'analyse chromatographique des extraits à 365nm permet d'observer les couleurs ainsi de mesurer les RF des taches.

#### a. Couleurs

Après la migration et séchage, la **Figure 19** et **20** présente les chromatogrammes CCM résultants de l'analyse des quatre extraits (éther diéthylique (E), acétate d'éthyle (A), MEC (M), eau) des feuilles de *Thymus algeriensis*. La révélation a été faite sous UV à 365 nm et a visible ; après révélation au réactif de Neu après quelque minute et après 24 heures.

Les plaques présentent une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés flavoniques, les spots sont bien distincts et montrent une richesse considérable des plantes en substances flavoniques.

De ces résultats on remarque que le système solvant choisis est bien séparé les constituant des dépôts pour les différentes phases (apparition des taches colorées bien distinguées : la phase éther diéthylique (E) présent 08 taches distincts, la phase acétate d'éthyle (A) présente 06 taches, la phase MEC (M) présent 04 taches et la phase eau présente 03 taches. Est montrent une richesse considérable de thymus en substances flavoniques.

A



B



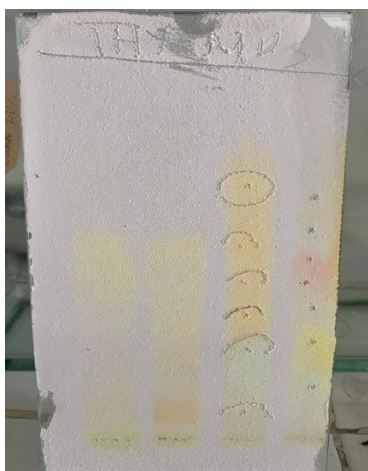
Eau M A E

**Figure 19** : CCM analytique représentative des flavonoïdes d'*Thymus algeriensis* sur plaque de polyamide DC6 développée dans le système solvant (Toluène, MEC, ETOH : 40/30/30).

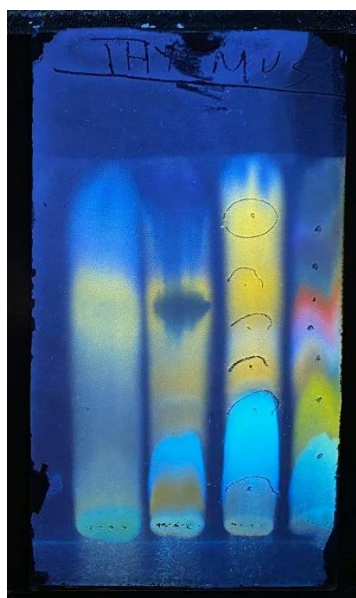
A : Après pulvérisation du réactif de NEU (visible).

B : Après pulvérisation du réactif de NEU sous UV à 365 nm.

A



B

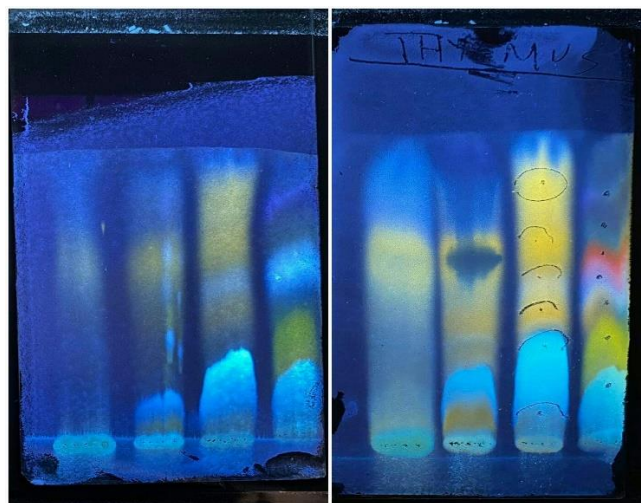


Eau M A E

**Figure 20** : CCM analytique représentative des flavonoïdes d'*Thymus algeriensis* sur plaque de polyamide DC6 développée dans le système solvant (Toluène, MEC, ETOH : 40/30/30).

A : Après pulvérisation du réactif de NEU (visible).

B : Après pulvérisation du réactif de NEU sous UV à 365 nm (après 24h).



Avant 24h

Après 24h

**Figure 21** : Les changement des couleurs des composés après le réactif de NEU (Avant et après 24h).

Après 24 heures on observe l'apparition des nouveaux couleurs, comme les couleurs : rouge, violet, marron, noir dans la phase éther diéthylique ; bleu clair et jaune fluorescent et jaune fluorescent orangée dans la phase acétate d'éthyle.

### b. Rapport frontal (Rf)


Les rapports frontaux sont dus à la polarité des composés vis-à-vis le système solvant de migration, et la phase stationnaire présent dans le **tableau 06**.

**Tableau 06 :** Comportement chromatographique des phases : éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC et eau, sur plaque de polyamide (DC6).

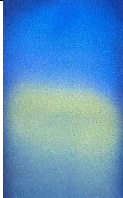
Phase éther diéthylique		Phase acétate d'éthyle		Phase MEC		Phase eau	
Fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf	Fluorescence	Rf
Bleu blanc fluo	0,16	Bleu vif	0,12	Orange pale	0,12	Bleu pale	0,2
Vert	0,4	Bleu blanc fluo	0,32	Bleu blanc fluo	0,3	Jaune pale	0,4
Jaune terne	0,5	Jaune fluorescent orangée	0,46	Orange	0,4	Bleu vif	0,8
Violet	0,61	Jaune	0,55	Jaune	0,7		
Rouge	0,7	Jaune fluorescent	0,69				
Bleu pale	0,81	Jaune pale	0,89				
Bleu vif	0,9						
Bleu sombre	0,95						

On conclut que les feuilles de la plante *Thymus algeriensis* sont riches en plusieurs types de flavonoïdes représentés dans les tableaux suivants :

**Tableau 07 :** Corrélation couleur et molécule de la phase éther.


La phase éther	La fluorescence	La structure de molécule
	Bleu sombre	Flavonols, flavonones, aurones
	Bleu vif	Hydroquinones
	Bleu pale	Acide phénol
	Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
	Violet	Flavonols, flavonones, isoflavonones, flavones
	Jaune terne	Flavonols
	Vert	Rutine
	Bleu blanc fluo	Acide phénol

**Tableau 08 :** Corrélation couleur et molécule de la phase Eau.


La phase Eau	La fluorescence	La structure de molécule
	Bleu vif	Hydroquinones
	Jaune pale	Dihydroflavonols

	Bleu pale	Acide phénol
--	-----------	--------------

**Tableau 09 :** Corrélation couleur et molécule de la phase acétate.

La phase acétate	La fluorescence	La structure de molécule
	Jaune pale	Flavonols
	Jaune fluorescent	Chalcone
	Jaune	Flavonols
	Jaune fluorescent orangée	Flavonols
	Bleu blanc fluo	Acide phénol
	Bleu vif	Hydroquinones

**Tableau 10 :** Corrélation couleur et molécule de la phase MEC.

La phase MEC	La fluorescence	La structure de molécule
	Jaune	Flavonols
	Orange	Anthocyanidine 3 glucoside

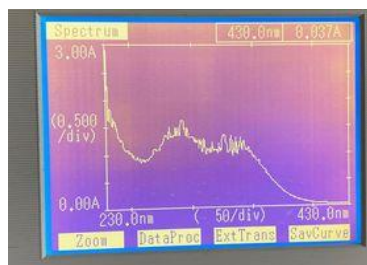
	Bleu blanc fluo	Acide phénol
	Orange pale	Anthocyanidine 3 glucoside

## 2. 2. L'analyse spectrale des fractions

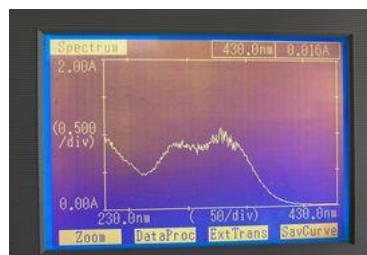
Les flavonoïdes peuvent être considérés comme des pigments qui absorbent très fortement les radiations UV, par conséquent la spectroscopie UV-Vis reste l'outil principal pour l'analyse structurale des flavonoïdes. Les flavones et flavonols sont caractérisés par deux bandes d'absorption majeures dans la région UV-Visible.

On peut observer une bonne résolution (efficacité) et séparation des différents pics résultants dans les profils chromatographiques. Il faut signaler que chaque pic correspond à une molécule, et celle qui présente une forte absorption correspond aux molécules majeures.

L'analyse spectrale de chaque phase (éther, acétate, MEC, eau) par un spectrophotomètre à défilement de longueur d'onde entre 230-430nm à permet de tirer les spectres suivants :

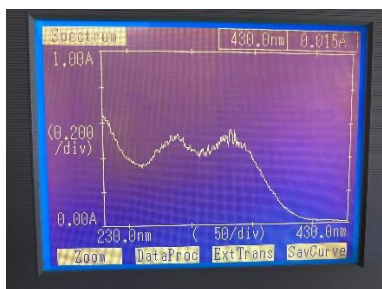


E

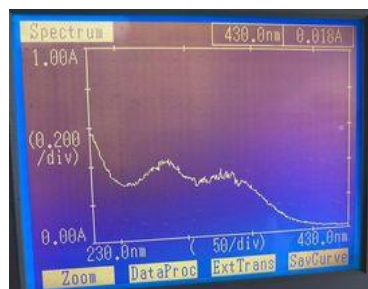


A





M



Eau

**Figure 22 :** Les spectres des différentes phases : la phase éther diéthylique (E), la phase acétate d'éthyle (A), la phase MEC (M) et la phase eau (Eau).

**Tableau 11** : Absorption UV des différentes phases.

Les phases	Bande II nm	Bande I nm
<b>E</b>	309	363
<b>A</b>	285	355
<b>M</b>	293	357
<b>Eau</b>	305	355

Les solutions méthanolique des quatre phases (éthanol, acétate, MEC, Eau) sont absorbé dans l'intervalle de 352-385 nm pour la bande I cela montre l'existence des flavonols (3-OH libre), par contre les deux phases acétate et MEC absorbent dans l'intervalle de 275-295 nm pour la bande II cela montre l'existence des flavanones, dihydroflavanols et catechine ; ainsi que les spectres des phase éthanol et Eau ne donne pas des bandes connus parce que on utilise la phase complète.

### 2. 3. Estimation de l'activité antioxydante des composés phénoliques isolés

L'activité antioxydante de tous les extraits a été évaluée par le test DPPH, ce test nous a permis de déterminer la capacité de nos extraits à neutraliser le radical stable DPPH présent dans le milieu réactionnel.

Une solution méthanolique DPPH° (2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violet sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune.

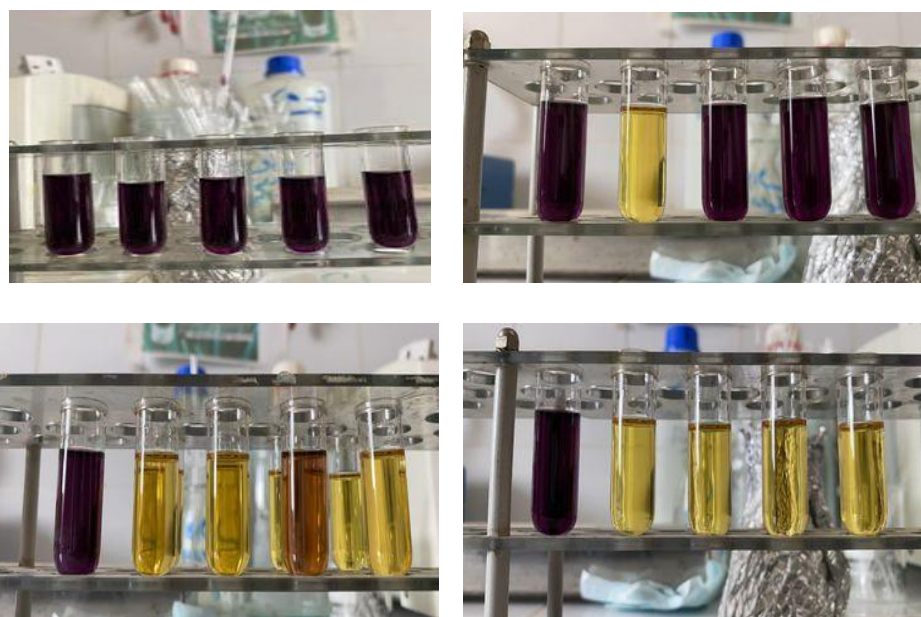
Ce changement de couleur en présence des antioxydantes (composés phénoliques et flavonoïdes).

Cette étude montrerait le potentiel de radicaux libres de la plante *Thymus algeriensis* qui pourraient être considérées comme des sources d'antioxydantes naturels.

On met des gouttes des quatre phase (5, puis 2, puis 1 gouttes), et on remarque le changement de couleur avec le temps par rapport a le tube qui contienne la solution DPPH c'est tout. Ces résultats sont montrés dans le **tableau 12** et les **figure 23** suivantes :

**Tableau 12** : Changement de coloration avec le temps des différentes phases d'extraits.

Gouttes/Phases	Ether	Acétate	MEC	Eau
5	1min : 38s	1min : 09s	2min : 21s	32s
2	3min : 12s	2min : 36s	10min	1min : 43s
1	6min : 20s	12min	30min	10min

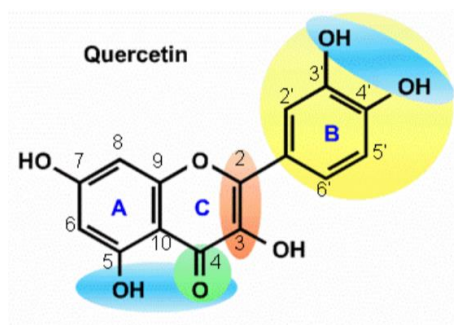
**Figure 23** : Etapes de la coloration en jaune.

- En conclus que tous les tubes qui contiennent des molécules antioxydantes à cause de la coloration jaune avec le temps.
- Chaque tube a son propre temps de coloration.
- Nous testons d'abord une dose de 5 gouttes puis 2 gouttes de chaque phase d'extraits sur les quatre tubes de solution DPPH. Il est remarqué que la phase eau est plus rapide à perdre la coloration violette en jaune, donc elle possède une activité antioxydante plus élevée que les autres phases (éther, acétate, MEC).
- Lorsque nous avons utilisé une goutte de l'extrait dans chaque phase, nous avons remarqué que le temps de coloration de la phase éther était plus rapide par rapport aux autres phases, elle a donc un pouvoir antioxydant élevé.

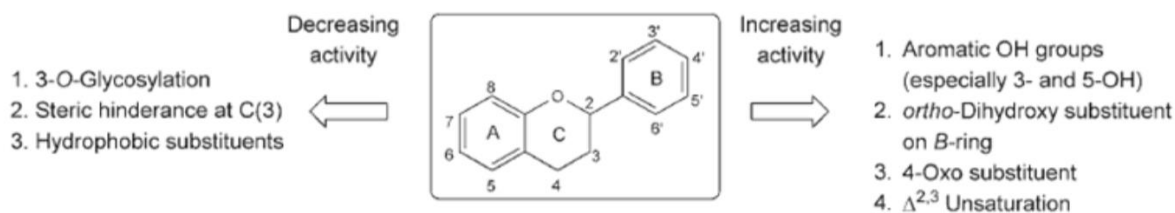
- Cette étude montrerait le potentiel de radical libre de la plante thymus qui pourraient être considérées des sources d'antioxydantes naturels.

### 3. Relation : Structure-activité antioxydante

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence de relations structure-activités dans le cas des flavonoïdes. Ainsi, il a été montré que les activités des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent essentiellement du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels. Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont pu être établis par plusieurs auteurs (Wolfe K et Liu R., 2008 ; Khlebnikov A., 2007 ; Sroka Z. *et al.*, 2005 ; Afanas I. *et al.*, 2001) et sont présentés dans les figures 24 et 25.



**Figure 24 :** Eléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante



**Figure 25 :** Relation entre la structure de flavanes et leur capacité à piéger des radicaux libres (Ma X. *et al.*, 2007)

## Chapitre VI : Polyphénols et cardiovasculaire

### 1. Mécanisme de défense des antioxydante

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits riches en polyphénols tels que les fruits, les légumes, le vin rouge, le cacao et le thé. L'effet bénéfique des polyphénols sur la santé cardiovasculaire a été attribué en partie à leur effet direct sur les vaisseaux sanguins et plus particulièrement sur l'endothélium. En effet, des études expérimentales et cliniques ont révélé que les polyphénols sont capables d'augmenter la formation endothéliale de facteurs vasoprotecteurs comme le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur et un inhibiteur de réponses pro-inflammatoires et pro-thrombotiques, et d'améliorer la dysfonction endothéliale et le stress oxydant vasculaire qui contribuent au développement des pathologies cardiovasculaires majeures comme l'hypertension artérielle. Cette revue de synthèse présente de façon non exhaustive les données de la littérature démontrant les effets protecteurs des polyphénols sur la fonction endothéliale ainsi que les mécanismes sous-jacents (Cyril A. *et al.*, 2014).

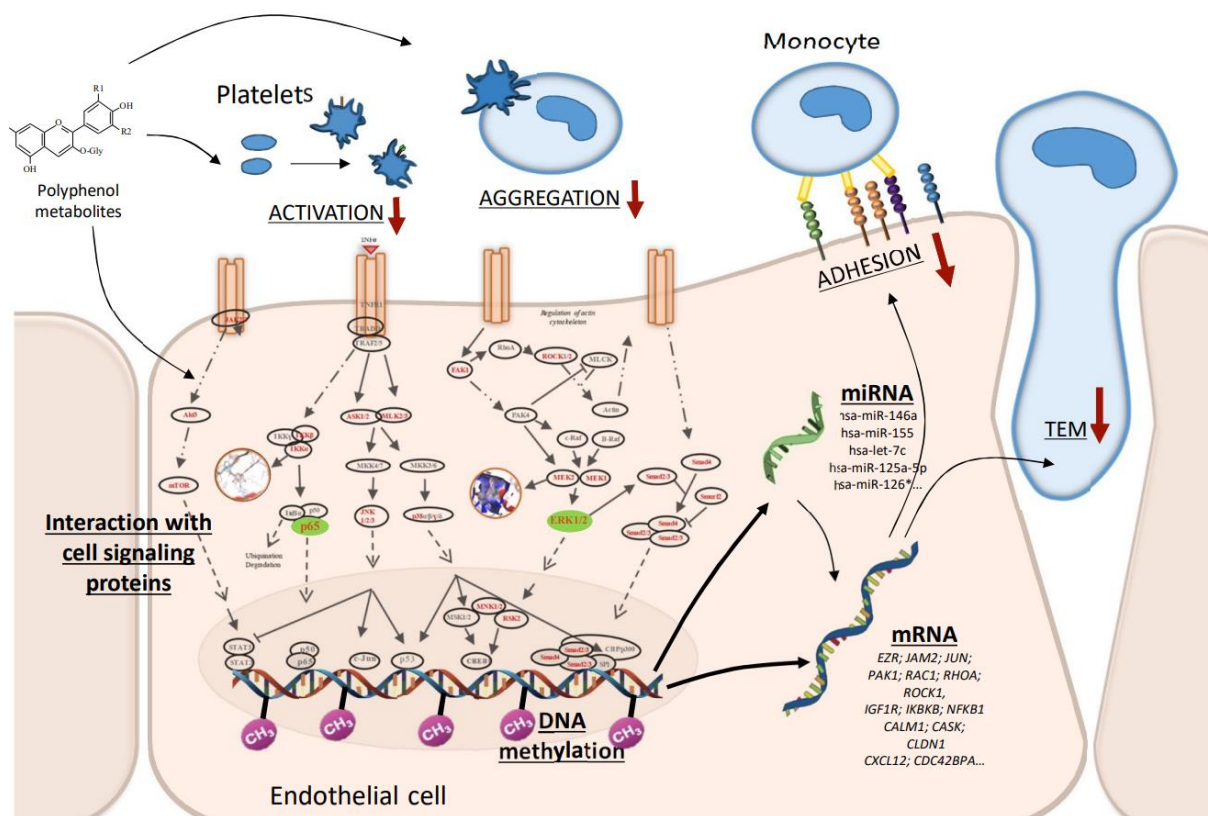


Figure 26 : Mécanismes d'action pour la protection vasculaire (Milenkovic D., 2019).

### 2. Comparaison

En comparant notre résultat avec (**Adriouch S. *et al.*, 2017**), qui fait une étude sur Association entre les apports en polyphénols et le risque de maladies cardiovasculaires : résultats d'une étude prospective sur 84 000 adultes français.

Au total, 602 événements cardiovasculaires majeurs incidents ont été diagnostiqués et validés au cours du suivi (309 maladies coronariennes et 293 événements cérébrovasculaires). Les apports en polyphénols étaient associés à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires pour les classes suivantes : catéchines (HRT3 contre T1 = 0,77 [0,62–0,94] ; pt = 0,009), flavonols (HRT3 contre T1 = 0,78[0,63–0,97] ; pt = 0,02), anthocyanines (HRT3 contre T1 = 0,71 [0,56–0,90] ; pt = 0,004), acides hydroxybenzoïques (HRT3 contre T1 = 0,79 [0,64–0,97] ; pt = 0,02), et dihydrochalcones (HRT3 contre T1 = 0,77 [0,63–0,96] ; pt = 0,02).

Ces résultats montrent qu'un apport nutritionnel en plusieurs classes de polyphénols est associé à une diminution du risque de développer une maladie cardiovasculaire. Ils soulignent ainsi le potentiel intérêt préventif d'une alimentation riche en polyphénols.

# CONCLUSION



## Conclusion

D'un point de vue applicatif, il s'agissait de valoriser une plante, *Thymus algeriensis*.

Cette dernière est déjà utilisée depuis de nombreuses années en médecine traditionnelle et d'hypothétiques corrélations entre les activités de la plante et son contenu en flavonoïdes ont été rapportées. C'est pourquoi, notre étude a consisté à étudier les flavonoïdes constitutifs de des feuilles de Thymus, à les identifier, à évaluer leurs activités telles que leurs propriétés antioxydantes et de les comparer avec celles d'autres flavonoïdes modèles, analogues structuraux plus connus.

Nous avons fait différentes méthodes pour extraire les composés phénoliques : macération, concentration et affrontements par différents solvants.

Les analyses qualitatives effectuées par diagnostiquer les phases Ether diéthylique, Acetate d'éthyle, MEC et Eau par la chromatographie sur couche mince de polyamide DC6 avec un révélateur spécifique pour les flavonoïdes ; réactifs de NEU, suivi par les techniques d'identification : Rf, fluorescence et spectrophotométrie qui nous a permet d'avoir les empreintes flavoniques des différentes phases.

Le potentiel anti radicalaire des flavonoïdes isolés a été déterminées par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces flavonoïdes possèdent une bonne activité, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydantes de première classe et peuvent être employées pour applications thérapeutiques.

La plante *Thymus algeriensis* est caractérisés par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques sur les maladies cardiovasculaires.

# RESUME

## المخلص

*Thymus algeriensis* المعروف باسم « Zhitra » هو نبات طبي من عائلة Lamiaceae ، يستخدم على نطاق واسع في الطب الجزائري التقليدي وكبهارات غذائية. في هذا العمل، أجرينا تحليلات كمية ونوعية لمختلف مستخلصات المذيبات، لتقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والكيميائية النباتية للمركبات الفينولية الموجودة في *Thymus algeriensis*.

تجزئة المستخلص العالمي مرحلة الإيثر، مرحلة الأسيتات، مرحلة MEC ومرحلة الماء، بناءً على استخدام مزيج من الأساليب الكروماتوغرافية، والتقنية الطيفية، مثل التحليل الطيفي لامتناص الأشعة فوق البنفسجية.

أظهر النشاط المضاد للأكسدة الذي حدده اختبار DPPH أن هذا النبات لديه قوة مضادة للأكسدة أقوى وفقاً للمركبات الفينولية الموجودة في المراحل، ويرجع هذا النشاط المضاد للأكسدة أساساً إلى ثراء الفلافونويد وتأثيرها العلاجي على أمراض القلب والأوعية الدموية.

## Résumé

*Thymus algeriensis* connue sous le nom « Zhitra » est une plante médicinale de la famille des Lamiaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle algérienne et comme condiment alimentaire. Dans le présent travail, nous avons réalisés des analyses quantitatives et qualitatives de différents extraits de solvants, est d'évaluer les activités antioxydantes et phytochimique des composés phénoliques contenus du *Thymus algeriensis*.

Le fractionnement de l'extrait global (phase Ether, phase Acétate, phase MEC et phase Eau), basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et le technique spectroscopique, telle que la spectroscopie d'absorbance ultraviolette.

L'activité antioxydant déterminée par le test DPPH a montré que cette plante présente un pouvoir antioxydante plus fort selon les composés phénoliques existants dans les phases, cette activité antioxydante est due principalement à la richesse en flavonoïdes et leurs effet thérapeutiques sur les maladies cardiovasculaires.

## **Abstract**

*Thymus algeriensis* known as « Zhitra » is a medicinal plant of the family Lamiaceae, widely used in traditional Algerian medicine and as a food condiment. In this work, we have carried out quantitative and qualitative analyses of various solvent extracts, to evaluate the antioxidant and phytochemical activities of the phenolic compounds contained in *Thymus algeriensis*.

The fractionation of the global extract (Ether phase, Acetate phase, MEC phase and Water phase), based on the use of a combination of chromatographic methods, and the spectroscopic technique, such as ultraviolet absorbance spectroscopy.

The antioxidant activity determined by the DPPH test showed that this plant has a stronger antioxidant power according to the existing phenolic compounds in the phases, this antioxidant activity is mainly due to the richness of flavonoids and their therapeutic effect on cardiovascular diseases.

# REFERENCES

- **Adriouch S, Kesse-Guyot E, Hercberg S, Touvier M, Fezeu L.K.** Association entre les apports en polyphénols et le risque de maladies cardiovasculaires : résultats d'une étude prospective sur 84 000 adultes français. 2017.
- **Afanas'ev I. B, Ostrakhovitch E. A, Mikhal'chik E.V, Ibragimova, G. A, Korkina L.G.** Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem. Pharmacol.* 2001 ; 61 : 677-684.
- **Akroum S.** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de Doctorat en Science de l'Université de Constantine. 2011.
- **Ames B, Shigenaga K, Hagen T, Proc M.** In thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers Aboubakr Belkaïd Tlemcen. 1993. Antioxidant activity assay. *J. Agricult. Food Chem.* 2008 ; 56, 8404-8411.
- **Badjah H. A.** Etude de l'activité antifongiques des HE d'Eucalyptus globulus et Thymus algeriensis contre quelques champignons phytopathogènes des palmes du palmier dattier. 1978.
- **Balasundram N, Sundram K, Samman S.** Phenolic compounds in plants and agri industrial by- products : antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods. Food Chemistry.* 2006 ; 99 : 191-203.
- **Beaudeau J.L, Durand G.** Biochimie médicale - Marqueurs actuels et perspectives (2e ed.) Médecine Sciences Publications / Lavoisier. 2011.
- **Benabid A.** Flore et écosystèmes du Maroc. Évaluation et préservation biodiversité. Ibis press, Paris. 2000 ; 259.
- **Benbrook C.M.** Accroître la teneur en antioxydant des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologique. *The Organic Center.* 2005 ; 1-87.
- **Bessidik M, Khenfer B.** Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles'Eucalyptus globulus et Thymus algeriensis contre quelques champignons

phytopathogènes des palmes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). Mémoire de master Université Kasdi Merbah Ouargla. 2015.

- **Boldyre V.** In thèse de doctorat Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers Aboubakr Belkaïd- Tlemcen. 1993.
- **Bouhedida H.** Contribution à l'étude des feuilles et stomates de la plante *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. (Région de Djelfa). 2019.
- **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie : Plantes médicinales, Eds.Technique et documentation Lavoisier, Paris. 1999.
- **Bruneton J.** Pharmacognosie, phytochimie : Plantes médicinales, Eds.Technique et documentation Lavoisier, Paris. 1999.
- **Cavin A.** Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et anti radicalaire. *Tinospora crispa* (Ménispermacées). *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (Annonacées). In Thèse de Doctorat Université de Lausanne. Suisse. 1999 ;241. *Chem.* 2007 ; 15,1749-1770.
- **Chosson E, Chabond, A, Chulia A, J Raynaud J.** Dihydroflavonol glycosides Two dimensional thin Layer Chromatography in the analysis. *Journal of Chromatography A.* 1998 ; 1216 : 1035-1052.
- **Choudhhury R, Kumar A.** *Pharm Biomed.* 2006 ; 825.
- **Codoñer-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E.** Oxidant mechanisms in childhood obesity : the link between inflammation and oxidative stress, *Translational Res.* 2011 ; 158 (6) : 369-384.
- **Colette K.** Les plantes médicinales. 2004.
- **Cyril A, Valérie B, Schini-Kerth B.** Potential of polyphenols to improve vascular health by stimulating the endothelial function. 2014.
- **Dimitrijevic`S, Milonavic-Stevanovic K, Antonvic-Stevanovic M, Yadegari D, Dob T, Dahmane D, Chelghoom C.** Studies on the essential oil composition and



antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss & Reut – the International Journal of Aromatherapy. 2006 ; 16 : 95-100.

- **Dob T, Dahmane D, Chelghoom C.** Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss & Reut – the International Journal of Aromatherapy. 2006 ; 16 : 95-100.
- **Dorman H, Deans S.** Antimicrobial agents plants antibacterial of plant volatil oils journal of Applied Microbiology. 2000 ; 88 : 308-316.
- **Elhabzi K, Dicko A, Desor F, Dalal A, Younos C, Soulimani R.** Journal of Ethnopharmacol. 2006, 103 : 413-419.
- **Etape de la chromatographie.** [www.maxicours.com](http://www.maxicours.com). Ethnopharmacol. 2006, 103 : 413-419.
- **Euzéby J.** Bactériologie générale et médicale. 2005 ; 104.
- **Favier A.** Le stress oxydant. L'actualité chimique. 2003 ; 112.
- **Fellah S, Romdhane M, Abderraba A.** Extraction et etude des huiles essentielles la *salvia officinalis* L. Journal de la Société Algérienne de la Chimie. 2006 ; Vol.16 ; N°2 : 193-202.
- **Fenaroli G.** Fenaroli's Handbook of flavor ingredient, 3rd ed. CRC Press. 1995.
- **Flandrois J, Courco L, Lemeland J, Ramuc M, Sirot J, Souny C.** (1997). Bactériologie médicale. Presses Universitaire de Lyon. 1997 ; ISBN 2 7297 0567 8. France. 2007.
- **Ghchkar L, Yadegari D, Rezaei M, Taghizadeh M, Astaneh S, Rasooli I.** Chemical and biological characteristics of *cuminum cyminum* and *Ros*. 2007.
- **Gherman C, Culea M, Cozar O.** Comparative analysis of some active principles of herbs plants by GC/MS. 2000 ; 253.

- **Gogny M, Puyt J, Pellerin J.** Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, édition le point vétérinaire. 2001 ; 165-168.
- **Guillaume A.** Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours. 2000.
- **Guillaume F.** Étude des mécanismes d'oxydation de flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante : effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. 2000.
- **Guillouty A.** Plantes médicinales et antioxydants ; Université Toulouse III Paul Sabatier Faculté Des Sciences Pharmaceutiques. 2016.
- **Guiraud J.** Microbiologie alimentaire, édition Dunod. 1998 ; 71-75.
- **Guy G.** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse le Harmattan 5-7, rue de l'école polytechnique. 75005 Paris France. 2006.
- **Guy, Gilly.** Les plantes aromatique et huiles essentielles à grasse – botanique-culture-chimie-production et marché.préface de hubert richard ; le harmattan. 2005.
- **Hager T., Howard L.** Berry fruit phytochemicals. Berry Fruit, CRC Press. 2009.
- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne J. O, Charlier C, Chapelle J. P.** Le stress oxydant. Revue médicale de Liège. 2007 ; 62(10), 628-38.
- **Harborne J. B, Williams C. A.** advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry. 2000 ; 55 : 481-504.
- **Hazout A, Menezo Y, Madelenat P, Cohen-Bacrie P.** Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. 2008 ; 36 : 1065-1168.
- **Hellal Z.** Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. 2012.
- **Hermann T.** Drugs targeting. Corrent opinion in Microbiology. 2005 ; 15 : 355-366.
- **Hilan C, Sfeir R, Jawich D, Aitour S.** Journal scientifique Libanais. 2006 ;7 :13-22.

- **Hurtado-Fernandez E, Romero M.G, Pancorbo A.C.** Application and potentiel of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010 ; 53 : 1130-1160.
- **Ignat I, Volf I, Popa I.V.** A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*. 2011 ; 126 : 1821-1835.
- **Ivanisova E, Ondrejovic M, Silhar S.** Antioxidant activity of milling fractions of selected cereals. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2012 ; 11-1 : 45-54.
- **drejovic M, Silhar S.** Antioxidant activity of milling fractions of selected cereals. *Nova Biotechnologica et Chimica*. 2012 ; 11-1 : 45-54.
- **Jiménez- Arellanes A, Martinez R, Garcia R, Léon- Diaz R, Aluna-Herrera J, Molina Soto A, Fernandez S.** *Pharmacologyonline*. 2006 ; 3 :569-574.
- **Kato T, Lijima H, Ishihara K, Kanek T, Hirai K, Naito Y, Okuda K, Kechkar M.** Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. 1990.
- **Khlebnikov A.I, Schepetkin I.A, Domina N.G, Kirpotina L.N, Quinn M.T.** Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorgan. Med. Chem*. 2007 ; 15,1749-1770.
- **Kluczyńska D.** Medicinal properties of thyme. *Wiad Ziel*. 2001 ; 7 : 8 : 13-16.
- **Knežević S.V, Blazekwic B, Stefan M.B, Babac M.** Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In “Phytochemicals as nutraceuticals- global approaches to their role in nutrition and health. Edition Venketeshwer Rao. 2012 ; 155-180.
- **Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre J.P.** Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par

inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. Pathologie expérimentale. 2004. 52 : 314-322.

- **Li-Weber M.** New therapeutic aspects of flavones : The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. Cancer Treat. Rev. 2009 ; 35 : 57-68.
- **Liyana-Pathirana C.M, Shahidi F.** Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. Food Chemistry. 2007 ; 101 : 1151-1157.
- **Ma X.-M, Liu Y, Shi Y.-P.** Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from *Ixeridium gracile* (DC.) SHIH. Chem. Biodiv. 2007 ; 4 : 2172-2181.
- **Macheix JJ, Fleuriet A, Chritian JA.** Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles In « les polyphénols en agroalimentaire ». Édition Lavoisier. 2006 : 1-27.
- **Makslmovic Z, Stojanovic D, Sostaric I, Dajic Z, Ristic M.** Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. J Sci.FoodAgr. 2008 ; 88 : 2036 – 2041.
- **Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez, L.** Polyphenols : food sources and bioavailability. Am.J Clin Nutr. 2004 ; 79 (5) : 727-747.
- **Markham K.R.** Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In “The Flavonoids”. Advances in Research since 1980, Harbone J.B.ed.Chapman and Hall, London. 1988 : 427-468.
- **Martin S, Andriantsitohaina R.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l’endothélium. Annales de cardiologie et d’angiologie. 2002 ; 51, 304-315.
- **Merghem R.** Rôle des polyphénols et tanins condensés dans l’alimentation. Institut des Sciences de la Nature et de la Vie. Université de Constantine. 2000 ; n°3 : 113-118.
- **Merniz N, Rebbas K, Bounar R, Mansouri R, Mammeri N.** Gestion des déchets ménagers de la ville de M’sila (Algérie). 2018. ISSN : 1112-5888.

- **Mevius D, Rutter J, Hart C, Imberechts H, Kempf G, Lafont J, Luthman J, Moreno M, Pantosti A, Pohl P, Willadsen C.** Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products. 1999 ; 1-57.
- **Michels G, Mohamed G.A, Weber N, Chovolou Y, Kampkötter A, Wätjen W, Proksch P.** Effects of Methylated Derivatives of Luteolin Isolated from *Cyperus alopecuroides* in Rat H4IIE Hepatoma Cells. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2006 ; 98 : 168-172.
- **Mikhail T.** pioneer of chromatography—150 years from his birth. *Struct Chem.* 1906 ; 33 : 1–3. <https://doi.org/10.1007/s11224-021-01804-z>.
- **Milenkovic D.** Polyphenols in human nutrition : from the in vitro antioxidant capacity to the beneficial effects on cardiometabolic health and related inter-individual variability – an overview and perspective. 2019.
- **Miller N, Diplock A, Rice Evans C, Davies J, Goppinathan V, Milner A.** Novel method for measuring antioxidant capacity and its application monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science.* 2006 ; 84 : 407-412.
- **Miller R.E, Conville M.J, Woodrow I.E.** Glycosides from the rare Australian endemic rainforest *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae). *Phytochemistry.* 2006 ; vol67 : 43-51.
- **Mishra K, Ojha H, Chaudhury N.K.** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH<sup>o</sup> assay : A critical review and results. *Food Chemistry.* 2012 ; 130 : 1036-1043.
- **Mohammed Z.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. 2006 ; 85.
- **Morales R.** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In : *Thyme : the Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. Evolution des composés secondaires.
- **Newman D, Cragg G, Snader K.** Natural products as sources of new drugs over. 2003.

- **Ogawara H.** Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. *Microbial. Rev.* 1981 ; 45 : 591-619.
- **OMS.** Aide-mémoire. Maladies cardiovasculaires. 2015.
- **Pereira Nunes X, Souza Silva F, Alneida J.R.G.** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1ère édition Venketeshwer Rao. 2012 ; 1-20.
- **Pereira-Nunes X, Souza Silva F, Alneida J.R.G.** Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. Chapter1. In “phytochemicals as Nutraceuticals Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health”. 1ère édition Venketeshwer Rao. 2012 ; 1-20.
- **Pham-Huy C.** *International Journal of Biomédical Médecine.* 2008.
- **Piquet M.** Hébuterne Nutrition en pathologie digestive. Wolters Kluwer Ed. France. 2007.
- **Prescott M, Harley P, Klein A.** Microbiologie 2ème édition française, traduction de la 5ème édition américaine par Claire Michelle Bacq Calberg et Jean Dusart (Univ de Liège) products. *Biochem. Pharmacol.* 2003 ; 71 : 106-115.
- **Quezel P, Santa S.** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. TomeI. C.N.R.S. Paris. 1963.
- **Rambaran T, Bergman J, Nordström P, Nordström A.** Effect of Berry Polyphenols on Glucose Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. 2020.
- **Rezaei, Taghizadeh M, Astaneh S, Rasooli I.** *Food Chemistry.* 2007 ; 102 : 259-260.
- **Rosengren A, Perk J, Dallongeville J.** Prevention of Cardiovascular Disease in The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine. Camm AJ, Luscher TF and Serruys PW. Oxford University Press. 2009, 2nd edition.
- **Rota M, Herrera A, Martinez R, Sotomayor J, Jordán M.** Antimicrobial rutin by complexation with transition metals. *Biochem. Pharmacol.* 2001 ; 61 : 677-684.

- **Sahr M, Nielson E.** Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Thymus ciliatus* eu *ciliatus* (Zaitra) de la région de Tlemcen. 2003.
- **Saidj F.** Extraction de L'huile essentielle de thym. *Thymus numidicus kabilica*. 2007 ; 02.
- **Scherver R, Godoy H.T.** Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2- diphenyl-1-picryl hydrazyl method. *Food Chemistry*. 2009 ; 112 : 654-658.
- **Sertel S, Eichhorn T, Plinkert, P.K, Efferth T.** Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Towards Human Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma, *Anticancer Research*. 2011 ; 31 : 81-7.
- **Société française de cardiologie** : Prévention du risque cardiovasculaire, dans « *Cardiologie et risque cardiovasculaire* », Masson. 2007.
- **Soto-Mendivil E A, Morenno-Rodriguez J F, Estarron-Espinoza M Garcia Fajardorj A, Obleilo-Vazquez N.** Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *thymus vulgaris* against *alternaria citri*-E-Gnosis. 2006.
- **Sroka Z.** Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch.* 2005 ; 60 : 833-843.
- **Stevanovic T.** Chimie du bois. CHM-22170. Université Laval. Québec. 2005.
- **Technique d'extraction des composés phénoliques.** [www.pagesperso-orange.fr.com](http://www.pagesperso-orange.fr.com). Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier. 2002 : 1-43. *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. (Région de Djelfa). 2019.
- **Valls J, Millan S, Marti M.P, Borrás E, Arola L.** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of chromatography A*. 2009 ; 1216 : 7143-7172.
- **Vitaglione P, Napolitano A, Fogliano V.** Cereal dietary fiber: a natural functional.
- **Wang Y.** Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol*. 2008 ; 21 : 276-281.
- **Winkel-Shirley B.** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*. 2002 ; 5 : 218-223.

- **Wolfe K.L, Liu R.H.** Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular.
- **Zeba B.** Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. African journal of biotechnology. 2005 ; 13 :155-156 pp.
- **Zghib A.** Etude phytochimique et activités antioxydantes, antiprolatives, antibactérienne et anti -virales d'extraits et des huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre Thymus. Thèse de doctorat, Université de Constantine I. 2013 ; 07.
- <http://fsnv.univ-tiaret.dz/index.php/13-la-revue/10-la-revue>.
- <http://umvf.univ-nantes.fr/cardiologie-et-maladies-vasculaires/enseignement/card>.
- <http://www.doctissimo.fr.com>.
- <http://www.soinducorps.ooreka.fr.com>.
- <http://www.vitamedz.org/thym/.com>.