

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique  
Université A. MIRA – BEJAIA



Faculté de Technologie  
Département de Génie des Procédés

# Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

## Master

Filière : Génie des Procédés

Option : Génie pharmaceutique

Présenté par :

**ARRASSI Samia**

**DJOUDI Sihem**

Thème :

**Etude des propriétés anti-oxydantes et antifongiques des extraits  
de la plante de *Thymus Vulgaris L.Officinalis***

*Devant les membres du Jury composé de :*

M<sup>me</sup> N. BELHADJ ; Présidente  
M<sup>me</sup> Z. BOUARICHE ; Examinatrice  
M<sup>me</sup> H. BELKACEMI ; Promotrice  
M<sup>elle</sup> F. BENCHALLAL ; Co-promotrice

**Année universitaire : 2020-2021**

# **Remerciements**

*En premier lieu, nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce travail ;*

*Nous tenons à remercier :*

- *M<sup>me</sup> BELKACEMI.H, d'avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, sa patience, ses conseils précieux qu'elle nous a prodigué tout ou long de notre travail et pour le temps qu'elle nous a consacré ;*
- *M<sup>elle</sup> BENCHALLAL .F, notre Co-promotrice pour son aide, sa patience, ses conseils et pour sa disponibilité ;*
- *M<sup>me</sup> BELHADJ.N, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury ;*
- *M<sup>me</sup> BOUARICHE.Z, d'avoir accepté d'examiner notre mémoire ;*
- *M<sup>me</sup> BNESIDHOUM .L, pour son aide dans la réalisation de la partie microbiologique.*
- *L'ensemble du personnel du LABORATOIRE méthode physique d'analyse (MPA) ;*
- *Tous ceux qui nous à aidé de près ou de loin à l'achèvement de ce travail ;*
- *Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.*

*Samia & Sihem*

# *Dédicaces*

*Après avoir rendu grâce au bon dieu le tout puissant qui nous a donné la force de résister et la volonté de travailler et la puissance pour accomplir ce modeste travail que je dédie :*

*A la chandelle de ma vie, à la lumière de mon univers, à la source de tendresse, A la femme qui m'a mise au monde ma mère Farida.*

*A l'être le plus cher de ma vie, mon père qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donnée confiance, courage et sécurité.*

*A mes chers et agréables frères Bezza et Omar pour leurs aide valeureux, leurs conseils. Ils ont su me soutenir par leur gentillesse et leur dévouement tout au long de ce projet.*

*A mes sœurs Nouria et Naima qui ont toujours fait preuve de bravoure, courage et patience. A la petite sœur Kenza et mon agréable neveu Kouceila.*

*A mon amie Sihem, et sa famille.*

*A toute ma famille et mes chers amis.*

***Samia.***

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect et de*

*Reconnaissance à :*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, tendresse,  
soutien et leurs prières tout au long de mes études,*

*A mes chers frères, Abednour, Massi, Kamel, pour leur appui et leur  
encouragement,*

*A mes belles-sœurs, Djida, surtout ma chère Sihem pour son  
encouragement permanent, et son soutien moral,*

*A mes chères neveux Ghiles, Rayan, Rassim, et ma petite nièce Sirine,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,*

*A mes très chers ami(es) : Tahar, Samira, Farida, Thiliyouna, Meriem, qui n'ont  
pas cessé de me conseiller, de m'encourager, me soutenir et de me supporter  
tout au long de la réalisation de ce mémoire,*

*A toute la promotion génie pharmaceutique, surtout ma chère binôme Samia,  
pour sa patience et sa compréhension tout au long de ces derniers mois.*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

***Sihem***



*Liste des abréviations*

**Abs** : Absorbance.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ADP** : Adénosine diphosphate.

**AG** : Acide gallique

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium

**ATP** : Adénosine triphosphate.

**BHT** : Butylhydroxytoluène.

**BHA** : Butylhydroxyanisole.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**CML** : Carboxyméthyllysine.

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

**DCM** : Dichlorométhane.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde .

**EP** : Ether de pétrole.

**EEP** : Extrait éther de pétrole.

**EDCM**: Extrait dichlorométhanique.

**EMeOH** : Extrait méthanolique.

**EOA** : Espèces oxygénées activées.

**GAPDH** : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

**GPxs** : Glutathion peroxydase.

**GSH** : Glutathion réduit.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**HO<sub>2</sub>**: Hydroperoxyde.

**HOCl**: Acide hypocloreux.

**HPLC:** Chromatographie en phase liquide à haute performance.

**IRFT :** Infrarouge à Transformation de Fourier.

**MDA :** Malondialdéhyde.

**NADPH :** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

**NDGA :** Nordihydroguarétique.

**NO:** Monoxyde d'azote.

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxygène singulet.

**O<sub>2</sub>.** : Radical superoxide.

**O<sub>3</sub>:** Ozone.

**OH:** Hydroxyle.

**OH.** : Radical hydroxyle.

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

**ONOO-:** Peroxynitrite.

**PDA :** potato dextrose agar (gélose dextrose à la pomme de terre).

**RO<sub>2</sub>.** : Peroxyle.

**RO.** : Alkoxyde.

**Rf :** Rapport frontal.

**SOD:** Superoxyde dismutase.

**TBARS:** Substances réactives à l'acide Thio barbiturique.

**TBHQ :** Tertiobutylhydroquinone.

**Tr :** Temps de rétention.

**µg Eq AG/mg:** Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

**µg Eq Q/mg d'extrait:** Microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

## Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Numéro de la page
<b>I.1</b>	Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris L. officinalis</i> : <b>A)</b> photo et <b>B)</b> schéma botanique de la plante.	<b>5</b>
<b>I.2</b>	Répartition géographique des espèces de thym dans le monde.	<b>7</b>
<b>I.3</b>	Structure de base des flavonoïdes.	<b>9</b>
<b>I.4</b>	Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes.	<b>10</b>
<b>I.5</b>	structure chimique du thymol.	<b>12</b>
<b>I.6</b>	structure chimique du Carvacrol.	<b>13</b>
<b>II.1</b>	Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.	<b>16</b>
<b>II.2</b>	Origine et cibles des principaux dérivés réactifs de l'oxygène.	<b>19</b>
<b>II.3</b>	Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO.	<b>26</b>
<b>II.4</b>	Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.	<b>27</b>
<b>III.1</b>	Etapas préliminaires de préparation de la plante étudiée ( <i>Thymus vulgaris L officinalis</i> ).	<b>29</b>
<b>III.2</b>	Schéma d'extraction par les solvants organiques des poudres de feuilles de <i>Thymus vulgaris L officinalis</i> .	<b>30</b>

<b>III.3</b>	Photos montrant, <b>A)</b> le mode de dépôt des différentes solutions, <b>B)</b> d'éluion et séparation de substances de différentes colorations (de gauche à droite, le témoin quercétine, le témoin acide gallique, l'extrait EP, l'extrait DCM) sur plaque CCM de gel de silice,	<b>32</b>
<b>III.4</b>	Méthode de calcul du Rf.	<b>33</b>
<b>III.5</b>	Réactions entre le radical DPPH (violet, oxydé (I)) et l'antioxydant pour former le DPPH stable (jaune, réduit (II)).	<b>37</b>
<b>III.6</b>	Test de l'activité antifongique avec la méthode des disques.	<b>39</b>
<b>III.7</b>	Teste de l'activité antifongique	<b>40</b>
<b>IV.1</b>	Photos des plaques de CCM des extraits séparés dans Le premier éluant éther de pétrole- acétate d'éthyle.	<b>42</b>
<b>IV.2</b>	Photos des plaques de CCM des extraits par rapport aux témoins dans le 2 <sup>ème</sup> éluant	<b>44</b>
<b>IV.3</b>	Chromatogrammes d'HPLC enregistrée à 254nm.	<b>47</b>
<b>IV.4</b>	Spectre infrarouge IRFT de la quercétine dans le KBr.	<b>47</b>
<b>IV.5</b>	Spectre infrarouge IRFT de l'acide gallique dans le KBr.	<b>48</b>
<b>IV.6</b>	Spectre infrarouge IRFT de l'extrait EP sec dans le KBr.	<b>48</b>
<b>IV.7</b>	Spectre infrarouge IRFT de l'extrait DCM sec dans le KBr.	<b>49</b>

<b>IV.8</b>	Spectre infrarouge IRFT de l'extrait MeOH sec dans le KBr.	<b>49</b>
<b>IV.9</b>	Structures chimiques du linalol, la chlorophylle a et b, thymol et de carvacrol.	<b>50</b>
<b>IV.10</b>	Courbe d'étalonnage des polyphénols.	<b>52</b>
<b>IV.11</b>	Histogramme de variation des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits de <i>Thymus Vulgaris L. officinalis</i> .	<b>53</b>
<b>IV.12</b>	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.	<b>54</b>
<b>IV.13</b>	Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de <i>thymus vulgaris L. officinalis</i> .	<b>54</b>
<b>IV.14</b>	Histogramme Activité anti-oxydante et pouvoir d'inhibition des extraits de <i>Thymus Vulgaris L. Officinalis</i> .	<b>56</b>
<b>IV.15</b>	L'activité antifongique des extraits de <i>thymus vulgaris L. officinalis</i> sur l' <i>Aspergillus Niger</i> avec la méthode de diffusion sur disques.	<b>56</b>
<b>IV.16</b>	Les diamètres des zones d'inhibition de la souche fongique <i>Candida Albicans</i> .	<b>58</b>
<b>IV.17</b>	Photos des boites de pétri d'extrait de maltensemencées par la souche antifongique d' <i>aspergillus Niger</i> , contenant les différents extraits de thymus.	<b>59</b>

## Liste des Tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de la page
<b>I.1</b>	Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	5
<b>II.1</b>	Principales ERO radicalaires et non radicalaires	17
<b>II.2</b>	Principaux systèmes de production des EOA.	18
<b>III.1</b>	Références de l'échantillon étudié	28
<b>IV.1</b>	Couleurs et rendements massique des extraits de feuilles de <i>Thymus vulgaris L. officinalis</i>	41
<b>IV.2</b>	Valeurs des Rfs et aspects des spots des composés séparés par CCM avec le premier éluant (éther de pétrole-acétate d'éthyle) et révélés par UV	43
<b>IV.3</b>	Valeurs des Rfs et aspects des spots des composés séparés par CCM avec le deuxième éluant (n-butanol, acide acétique, eau) et révélés par UV.	44
<b>IV.4</b>	Les temps de rétention des standards.	45
<b>IV.5</b>	Temps de rétentions des principes actifs des extraits de <i>Thymus Vulgaris L officinalis</i>	45
<b>IV.6</b>	Les principales bandes d'absorption infrarouge identifiées sur les spectres IR des extraits et des standards.	51
<b>IV.7</b>	Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des extraits des feuilles de thym	55
<b>IV.8</b>	Activité antifongique des extraits de <i>thymus vulgaris L:</i> sur la levure <i>Candida Albicans</i>	57

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicaces</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction générale</b> .....	1

## Partie théorique

### Chapitre I : Etude bibliographique sur la plante *thymus vulgaris L officinalis*

<b>Introduction</b> .....	3
<b>I.1.</b> Présentation sur la plante thymus vulgaris L officinalis .....	3
<b>I.2.</b> Généralités sur les plantes médicinales .....	3
I.2.1. Cas de la famille des lamiacées .....	4
I.2.1.1.Historique .....	4
I.2.1.2.Origine et distribution de la plante .....	4
I.2.1.3.Place dans la systématique .....	5
I.2.1.4.Description botanique de la plante.....	5
I.2.1.5.Nom vernaculaire .....	6
I.2.1.6.Habitat .....	6
I.2.1.7. Répartition géographique de la plante .....	6
1. Dans le monde .....	6
2. En Algérie .....	7
I.2.1.8.Propriétés du thym.....	7
<b>I.3.</b> Les métabolites secondaires des plantes.....	8
I.3.1. Les composés phénoliques .....	8
I.3.1.1. Les flavonoïdes .....	8
a. Structure .....	9
b. Classification .....	9
c. Rôles des flavonoïdes dans les plantes.....	10
I.3.2 .Les Terpénoïdes .....	10
I.3.3. Les composés azotés dérivés des acides aminés (Alcaloïdes) .....	11
<b>I.4.</b> Les huiles essentielles .....	11
I.4.1. L'huile essentielle du thym .....	12
I.4.1.1.Thymol .....	12
I.4.1.2.Carvacrol.....	12
<b>I.5.</b> Propriétés pharmacologiques .....	13
I.5.1. Activité antioxydante .....	13
I.5.2.Activité antibactérienne .....	14
I.5.3.Activité antifongique.....	14

---

**Chapitre II : Radicaux libres et stress oxydatif**

**Introduction** .....15

**II.1. Les radicaux libres**.....15

II.1.1.Histoire des radicaux libres.....15

II.1.2.Définition des radicaux libres.....15

II.1.3.Les différentes espèces radicalaires .....16

II.1.4.Production et origine des radicaux libres.....17

**II.2.Le stress oxydatif**.....19

II.2.1.Définition du stress oxydatif.....19

II.2.2.Conséquences biochimiques du stress oxydatif.....20

II.2.2.1.Effets sur les protéines.....20

II.2.2.2.Effets sur les acides gras.....21

II.2.2.3.Effets sur les glucides.....21

II.2.2.4.Effets sur l'ADN.....22

II.2.3.Moyens de défense contre le stress oxydatif.....22

II.2.3.1.Moyens de défense endogène.....23

1-Superoxydesdismutases (SOD).....23

2- Les glutathion peroxydases (GPxs).....23

3-Le cuivre.....23

4- Le zinc.....23

5-Le sélénium.....24

II.2.3.2 Moyens de défense exogène.....24

1-La vitamine C.....24

2-Vitamine E.....24

II.2.4. Les maladies liées au stress oxydatif.....25

**II.3. Les antioxydants**.....25

II.3.1.Les antioxydants enzymatiques .....25

II.3.2. Antioxydants non enzymatiques .....26

II. 3.3.Antioxydants d'origine végétale .....26

II.3.4.Les antioxydants synthétiques .....27



Partie pratique

Chapitre III : Matériels et méthodes

<b>Introduction</b> .....	28
<b>III.1. Matériel végétal</b> .....	28
III.1.1.Cueillette.....	28
III.1.2.Prétraitements de l'échantillon.....	28
III.1.2.1.Lavage, séchage et broyage.....	28
III.1.2.2.Tamisage et conservation.....	29
<b>III.2. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante</b> .....	29
<b>III.3. Détermination du rendement massique d'extraits phénoliques</b> .....	31
<b>III.4. Caractérisation physicochimique et phytochimique des extraits de thymus</b> .....	31
III.4.1.Analyse qualitative et identification des composés phénoliques des extraits par CCM.....	31
III.4.1.1.Principe .....	31
III.4.1.2.Méthode de séparation .....	31
III.4.1.3.Mesure et calcul du rapport frontal Rf.....	33
III.4.2.Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	34
III.4.2.1.Principe et méthode.....	34
III.4.2.2.Préparation de la phase mobile, des solutions standards et des extraits.....	34
III.4.3.Caractérisation par infrarouge IRFT.....	35
III.4.4.Caractérisation par UV-visible.....	35
III.4.4.1.Dosage des polyphénols totaux.....	35
III.4.4.2.Dosage de flavonoïdes.....	36
<b>III.5. Etude de l'activité biologique des extraits</b> .....	36
III.5.1.Activité antioxydante par la méthode du DPPH .....	36
III.5.2.Tests microbiologiques .....	38
III.5.2.1.Activité antifongique .....	38
a- Méthode de diffusion à partir d'un disque de papier Wattman.....	38
b- Autre méthode .....	40

**Chapitre IV : résultats et discussion**

<b>Introduction</b> .....	41
<b>IV.1. Rendement massique en polyphénols de l'extraction</b> .....	41
<b>IV.2. Résultats de l'étude phytochimique</b> .....	42
IV.2.1. Résultats de l'analyse qualitative et quantitative par chromatographie.....	42
IV.2.1.1.Caractérisation et identification des composés extraits par chromatographie sur couche mince(CCM).....	42
IV.2.1.2.Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance(HPLC).....	45
IV.2.1.3.Caractérisation par IRFT.....	47
IV.2.2.Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible.....	52
IV.2.2.1.Dosage des polyphénols totaux .....	52
IV.2.2.2.Dosage des flavonoïdes .....	53
IV.2.3.Activité biologique .....	55
IV.2.3.1.Activité antioxydante par la méthode DPPH.....	55
IV.2.3.2.Activité antifongique.....	56
a-Méthode de diffusion à partir d'un disque de papier Wattman.....	56
b- Autre méthode.....	58
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>60</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>63</b>
<b>Annexe</b>	
<b>Résumés</b>	

# *Introduction*

## **Introduction générale**

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies.

Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire

**(Huillier, L.2007).**

Le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications, lors de leur évolution comme dans le cas du diabète, le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Ces dommages sont réalisés par l'attaque des radicaux libres sur divers biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ayant finalement comme conséquence la dégradation et la mort de cellules **(Moon & Shibamoto. 2009).**

L'utilisation des molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause, en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'antioxydants naturels sont recherchées. En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leurs rôles d'antioxydants naturels suscitent de plus en plus d'intérêts, pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique **(Bougandoura & Bendimerad. 2012).**

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation très riche et diversifiée. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés, dues notamment à la fraction « huile essentielle », peuvent être mises à profit pour traiter les infections mycosiques. A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on

s'est intéressé aux espèces de la famille des lamiacées, qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien.

La plante, sur laquelle est porté notre choix, fait partie d'une espèce de thym (*Thymus Vulgaris L. officinalis*). Ce choix est fondé sur les critères suivants : le thym est parmi les plus populaires des plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, son utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, a été valorisé du fait que leurs huiles essentielles sont très recherchés pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques .Leurs efficacités dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur sont des plus reconnues traditionnellement. Actuellement, elles font l'objet d'études impliquées dans des sujets et travaux de recherche scientifique les plus avancés et d'intérêts nouveaux.

Le but de notre étude est consacré à la réalisation du suivi de l'extraction des principes actifs (le thymol, les flavonoïdes et les polyphénols), par différents solvant d'extraction et d'analyse. Elle sera approfondie par l'évaluation de l'activité anti-oxydante au DPPH et antifongique, par la méthode de diffusion en milieu gélosé des extraits de thymus dans différents solvants.

Dans la première partie, composée de deux chapitres (I et II), nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques et travaux antérieurs réalisés sur la plante, les poly phénols, les flavonoïdes et le stress oxydant.

Dans la partie expérimentale (chapitre III), nous exposerons d'abord le matériel et les méthodes utilisées pour l'extraction, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, les analyses physicochimiques (CCM, HPLC et IR), et les analyses biologiques (l'activité anti-oxydante, et l'activité antifongique).

Les résultats obtenus dans notre étude seront discutés dans le quatrième chapitre.

# *Partie théorique*

## ➤ *Chapitre I*

*Etude bibliographique sur  
thymus vulgaris L officinalis*

## ➤ *Chapitre II*

*Radicaux libres et Stress  
oxydatif*

## Chapitre I :

### Etude bibliographique sur la plante *thymus vulgaris L officinalis*

#### Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons un aperçu bibliographique sur le genre thymus. Ce genre fait partie des lamiacées qui est l'une des familles les plus répondues dans le bassin méditerranéen et spécialement en Algérie .Après une description botanique et géographique de la famille des lamiacées et du genre thymus, à savoir les acides phénolique et les flavonoïdes. Nous terminerons ce chapitre avec les différentes activités biologiques de ce genre .Le thymus fait partie des plantes aromatiques est très riches en huiles essentielles.

#### I.1.Présentation sur la plante *thymus vulgaris L officinalis*

Les plantes aromatiques et médicinales peuvent être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique et agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes.

Ces plantes aromatiques sont, donc, à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...etc) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes, dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation.

Parmi ces plantes à valeurs ajoutées, *Thymus vulgaris L officinalis* (thym) possédant une activité pharmacologique, pouvant conduire à des applications thérapeutiques, et cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives, qui pour plus part agissent sur l'organisme humain (**Fadi, Z. 2011**).

#### I.2. Généralités sur les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales, dont au moins une partie possède des propriété curatives (**Fransworth et al.1986**) .

Environ 35000 plantes sont employées par le monde à des fins médicinales. Ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent à répondre à un besoin important, malgré l'influence croissante du système thérapeutique moderne (**Elqaj et al. 2007**).

### I.2.1. Cas de la famille des lamiacées

La famille des Lamiacées, anciennement appelée Labiées, en raison de la corolle en deux lèvres de ses petites fleurs (**Couplan.2000**), est l'une des familles les plus larges dans le règne végétal. Elle comprend approximativement 240 genres et 7200 espèces (**Harley et al .2010**), qui sont plus ou moins fréquentes, mais particulièrement répandus depuis le bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (**Judd et al., 2002**). Elle est divisée en sept sous-familles : Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroidea, Scutellarioideae, Symphorematoideae et Viticoideae (**Harley et al . 2004**).

C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en pharmacologie. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (**Ghermanet . 2006**).

#### I.2.1.1. Historique

Le genre *Thymus* est l'un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées avec comme forte diversité dans la partie occidentale du bassin méditerranéen en (**Morales. 2002**). Le nom « *Thymus* » dérive du mot grec « thymos » qui signifie « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (**Pariente.2001**). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (**Iserin. 2001**).

#### I.2.1.2. Origine et distribution de la plante

*Thymus vulgaris L officinalis* est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (**Özcan et Chalchat. 2004 ; Amiot. 2005**). Il est maintenant cultivé partout dans le monde comme thé, épice et plante médicinale (**Kitajima et al .2004**).

Le *Thymus vulgaris L* présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (**Kaloustian et al. 2003**). Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne (**Poletti, 1988**).



### I.2.1.3.Place dans la systématique

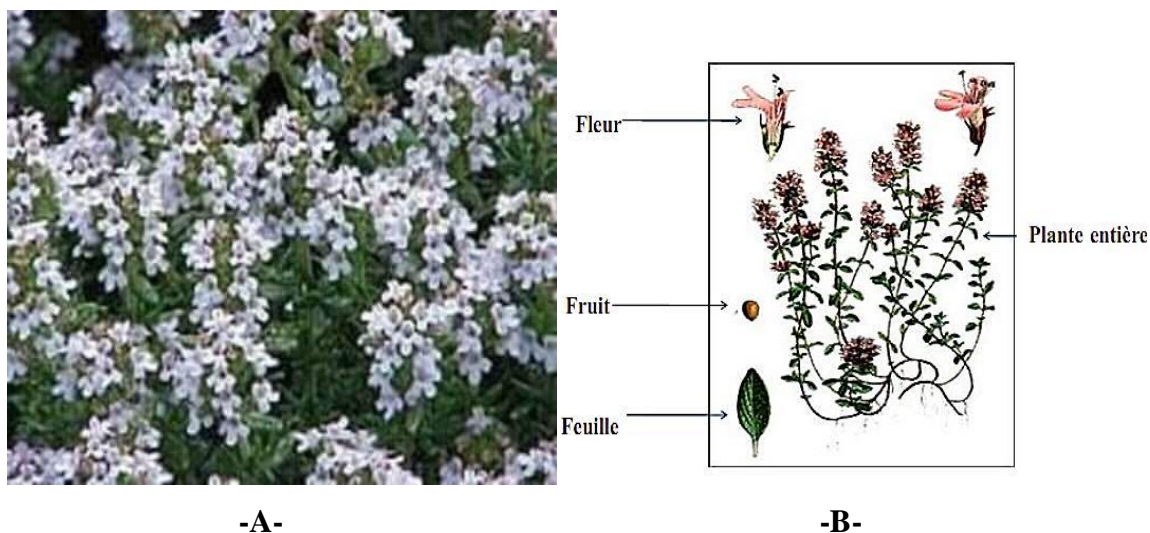
Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (**Morales. 2002**) présentée dans le **tableau I.1.**

**Tableau I.1** : Classification botanique de *Thymus vulgaris L*

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus vulgaris L.</i>

### I.2.1.4.Description botanique de la plante

Le *Thymus vulgaris L* est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur (**voir la figure I.1**).



**Figure I.1** : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris L.officinalis*:**A**) photo et **B**) schéma botanique de la plante (**Iserin. 2001**).

Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono terpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *Thymus vulgaris L* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral, qui a été aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton. 1999 ; Morales. 2002).

#### I.2.1.5.Nom vernaculaire

Les noms vernaculaires de l'espèce *Thymus vulgaris* sont les suivants :

- **Arabe** : saatar, zaatar (en arabe زعتر ou صعتر )
- **Français** : thym vulgaire, thym de jardins, farigoule, farigoule et barigoule.
- **Allemande**: Thymian, EchterThymian, Gartenthymian, Römischerthymian, romischerquendel, welscherthymiankutteeakraut.
- **Anglais** : common thym, garden thym (Teuscher et al. 2005).

#### I.2.1.6.Habitat

Le thym pousse bien sur des endroits naturels, sur sol légers et calcaires mais il prospère tout aussi bien sur sols fertiles argileux mais non détrempés. Il nécessite des endroits bien secs. C'est d'ailleurs sur sols pauvres que se développe le mieux son arôme. Dans des endroits de fortes gelées, une protection est recommandés, en particulier durant l'hiver sa multiplication se fait par semis superficiels (germination à la lumière), réalisée à la mi-avril ou plus rarement en août, en rangées encadrées environ 20 à 30 cm; de préférence sur sol léger et sablonneux (Eberhard et al . 2005) .

#### I.2.1.7. Répartition géographique de la plante

##### 1. Dans le monde

Le thym est réparti entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée (Mabberley.1997).Il est très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest, en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (figure I.2). Il se trouve également en région Macaronésienne (îles Canaries, Madère et les Açores) et en Himalaya. Il peut même atteindre les limites de la région tropicale et dans le nord du Japon, il pousse en Sibérie, en Europe nordique jusqu'aux bords du Groenland (Morales. 1997).

La région de l'ouest méditerranéen, est considérée comme étant le centre de l'origine du genre *Thymus* ; l'espèce *T. vulgaris* provient particulièrement du sud de l'Europe, de l'Espagne à l'Italie

(Morales. 1997; Peter. 2004). Le thym est maintenant très cultivé au Portugal, France, Allemagne, Espagne, Italie, Algérie, Maroc, Tunisie, Egypte, Turquie, Chine, Russie, Angleterre et les Etats-Unis d'Amérique (Wilson. 2002; Raghavan. 2006).

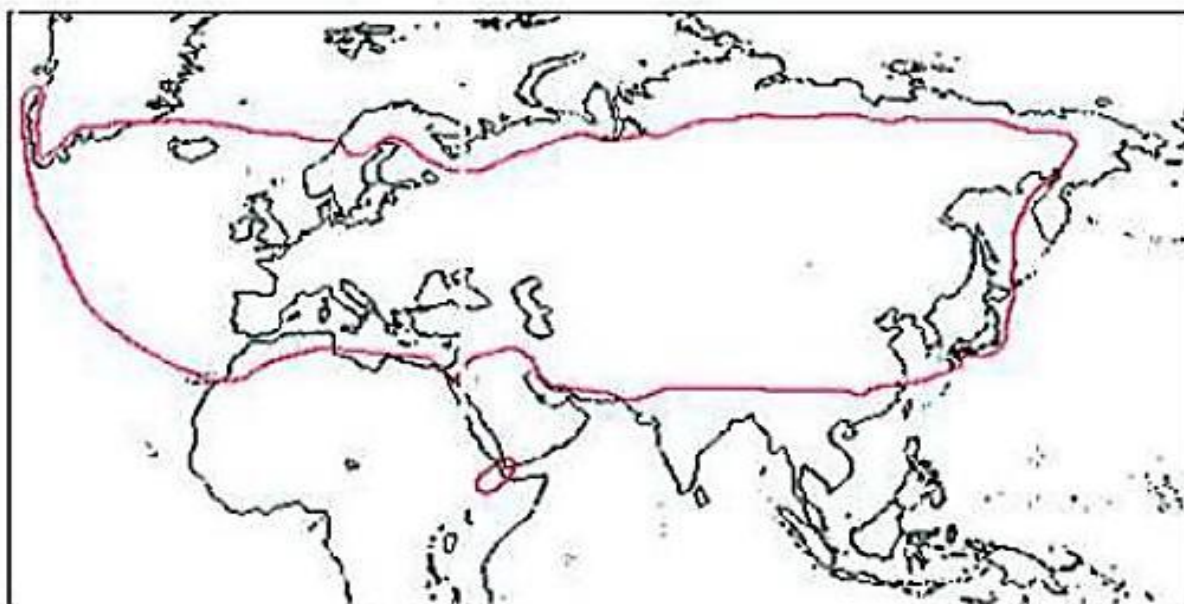


Figure I.2. Répartition géographique des espèces de thym dans le monde (Morales. 1997).

Nous remarquons que la plante de *thymus vulgaris L* est ré pondue en Eurasie et dans une partie de l'Afrique du nord ce qui est explicable par le climat doux et modérée que possèdent ces régions.

## 2. En Algérie

Le thym est représenté par plus de 300 espèces à travers le monde dont 12 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques (Quezel et Santa. 1962). Ces espèces sont réparties le long du territoire national, du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais (Kabouche *et al.* 2005).

### I.2.1.8. Propriétés du thym

Le thym est souvent utilisé dans l'assaisonnement des aliments et des boissons, et il sert aussi comme un antiseptique, désinfectant dermique et c'est un spasmolytique bronchique, indiqué pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures. Les principaux constituants du thym montrent également des propriétés vermifuges et vermicides (Bazylko et Strzelecka. 2007). Il possède entre autres des propriétés antivirale, antifongique, anti-inflammatoire, et antibactérienne. Une étude récente a montré que les extraits méthanoïques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *mycobactérium tuberculosis* (Jiminer *et al.* 2006), et aussi

des propriétés anthelminthiques (**Al-Bayati. 2008**). D'autres travaux on montré également que ces mêmes extraits sont doués de propriétés anti-oxydantes, qui lui permettent d'être utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons durant leur stockage (**Selmi et Sadok. 2008**).

### **I.3. Les métabolites secondaires des plantes**

Les métabolites secondaires sont produits en très faibles quantités. Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (**Vermerris. 2006**).

On distingue trois classes principales :

- 1- Les composés phénoliques
- 2- Les isoprénoïdes (Stéroïdes et Terpénoïdes)
- 3- Les composés azotés dérivés des acides aminés (Alcaloïdes)

#### **I.3.1. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des substances présentes dans tous les végétaux et dans tous les organes de la plante. Ils possèdent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Naczk et Shahidi. 2003 ; Barboni.2006 ; Sun et al. 2011**).

Les composés phénoliques jouent un rôle essentiel dans la structure et la protection des plantes (**Naczk et Shahidi. 2003 ; Stalikas. 2007**). Ils offrent également, pour la santé humaine, une protection contre certaines maladies impliquant un stress oxydatif, comme les cancers et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Sun et al.2011**).

Le terme "composés phénoliques végétaux» englobe les phénols simples, les acides phénoliques, les coumarines, les flavonoïdes, les stilbènes, les tannins, les lignines et les lignanes (**Stalikas.2007**).

##### **I.3.1.1. Les flavonoïdes**

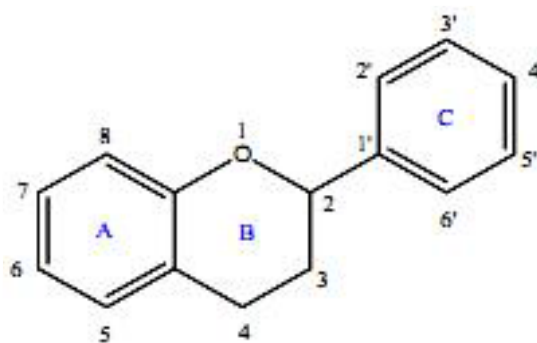
Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal (**Ghedira. 2005**), qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols.

Actuellement, plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir, puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Beecher. 2003**).

### a. Structure

Les flavonoïdes ont un poids moléculaire faible se présentant en 15 atomes de carbone arrangés comme suit : C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Figure I.3). Elles sont composées de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle.

Les substitutions variées au sein de la molécule donnent les différentes sous-classes de flavonoïdes. Les flavones et les flavonols sont les plus connus et les plus divers sur le plan structural. Les substitutions touchant les noyaux A ou B qui peuvent survenir dans chaque classe des flavonoïdes sont : une oxydation, hydroxylation, alkylation, glycosylation, acylation, et sulfonation.



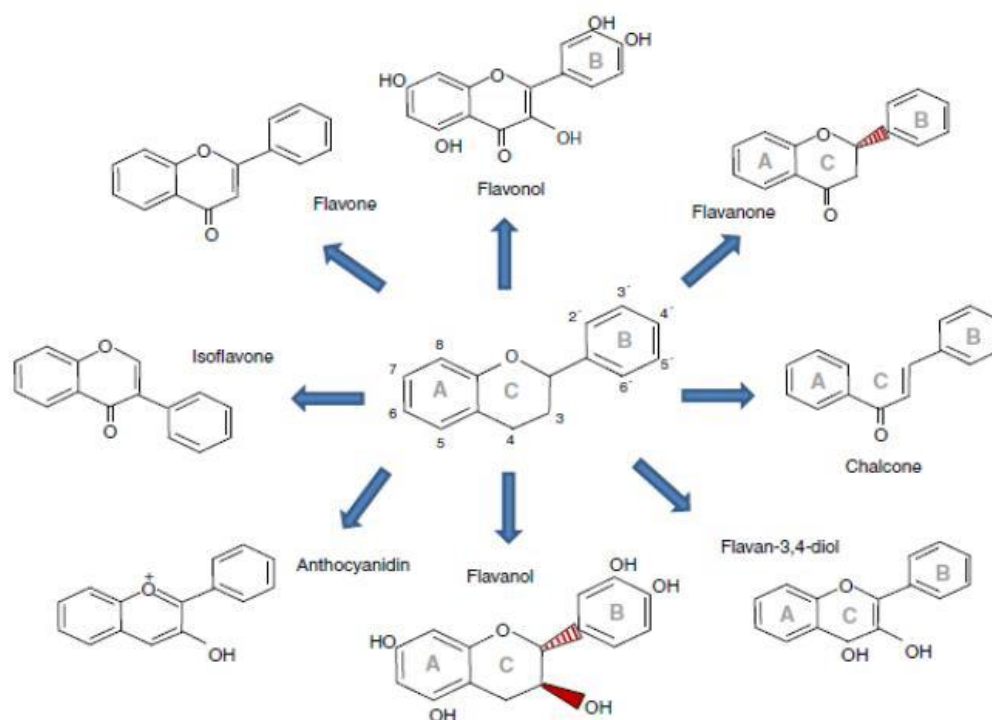
**Figure I.3:** Structure de base des flavonoïdes (**Boudjouref M. 2008**)

### b. Classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base (**Bouakaz. 2006**).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont:

Flavone, flavonol, flavanone, chalcone, flavandiol, flavanol, antocyanidin, isoflavone. (**Figure I.4**).



**Figure. I.4:** Les structures chimiques des principales familles des flavonoïdes (Fraga & Oteiza. 2011).

### c. Rôles des flavonoïdes dans les plantes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Par leur goût désagréable, les flavonoïdes peuvent jouer un rôle de protection des plantes en repoussant certains insectes (Madjour. 2014). Certains flavonoïdes jouent un rôle de lutte contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Madjour .2014). Ces composés phénoliques jouent un rôle très important dans la croissance des plantes, la floraison, la fructification et la défense contre les maladies et les micro-organismes. Ils ont également un rôle très important pour la santé humaine. A titre d'exemple, ils sont efficaces contre l'inflammation chronique, les maladies allergiques, les maladies coronariennes et le cancer (Ebadi. 2001 ;Ghedira. 2005 ).

### I.3.2 .Les Terpénoïdes

Ils constituent sans doute le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux. Ce sont des molécules polyéniques qu'on retrouve également dans le règne animal. Les terpènes sont subdivisés, selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporés dans leurs structures, en monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30) (Kabouche .2005).



### I.3.3. Les composés azotés dérivés des acides aminés (Alcaloïdes)

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène, du point de vue structure, propriétés chimiques et effets biologiques qu'ils manifestent. Ce sont des composés azotés, basiques qui précipitent avec des réactifs iodométriques tels que les réactifs de Mayer, Dragendorff. Ils peuvent être présents dans tous les organes de la plante (**Sahraoui. 2011**). Dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre les herbivores.

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes, parmi lesquels nous pouvons citer: Les phénylalanines ; les Alcaloïdes isoquinoléiques ; les Alcaloïdes quinoléiques ; les Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques ; les Alcaloïdes dérivés du tropane et les Alcaloïdes stéroïdes (**Macheix J-J .2005**). Ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme, comme Anti tumoraux ; Antalgiques ; Spasmolytiques et Antitussifs (**Macheix J-J . 2005**).

### I.4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés, dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation (**Iserin et al .2007**). Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste (**Moro Buronza. 2008**).

En réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif à sa composition (**Clarke. 2008**).

Une huile essentielle contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu'à 300 en synergie, pour donner à l'huile essentielle ses propriétés (**Lahlou. 2004**). Sa composition biochimique n'est par ailleurs jamais rigoureusement identique. Il est impossible de reproduire en laboratoire cette complexité présente à l'état naturel. C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des huiles essentielles, dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons ou les virus (**Chassaing. 2006**).

Elles peuvent être stockées, dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, écorces, racines, graines. Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes, la composition pouvant varier d'un organe à l'autre (**Bakkalia et al. 2008**).

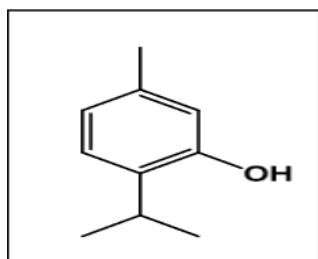
### I.4.1. L'huile essentielle du thym

L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives (**Rasooliet al.2006 ; Naghdiet al. 2004**). Les huiles essentielles de thym sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure.

La variabilité chimique des huiles essentielles de thym dépend de plusieurs facteurs, qui sont généralement d'ordres climatiques et environnementaux mais, qui peuvent être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétale) (**Lozieneet al.2007**). Ainsi, une étude menée par **Dob et al .(2006)** sur les *Thymus* d'Afrique du Nord a montré que le composé majoritaire est le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie.

#### I.4.1.1.Thymol

Le thymol est l'un des principaux phénols reconnus dans l'huile essentielle de quelques lamiacées comme le thym, l'origan et la sarriette, dont le contenu peut atteindre jusqu'à 84% (**Kaloustian et al.2008**). Le thymol a été découvert par **Caspar Neumann** en **1719** et épuré en **1853** par **M. Lallemand** qui lui a donné le nom « thymol » et lui a attribué la formule chimique (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O). Le thymol est un phénol (2-isopropyl-5-méthyl-phénol) et est isomérique avec le carvacrol (**figure I.5**). Le thymol existe dans l'huile de thym et est lié à d'autres hydrocarbures d'une plus grande volatilité comme le p-cymène (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>) et le thymène (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) (**Pauli et Knobloch. 1987**).



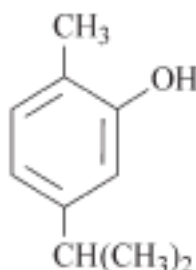
**Figure I.5:** structure chimique du thymol (**Touhami. 2017**)

Plusieurs études ont montré que le thymol possède de nombreuses activités biologiques, telles que l'activité antispasmodique, antimicrobienne, fongicide, insecticide, antioxydant, anti-cancérigène et anti-inflammatoire (**Ipeket al. 2005 ; Szentandrassyet al. 2003**).



#### I.4.1.2. Carvacrol

Le carvacrol (5-isopropyl-2-méthylphénol ; poids moléculaire 150,21) est également un phénol monoterpénoïde présent dans l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et de nombreuses autres herbes aromatiques et épices. Pour le carvacrol, de nombreux effets biologiques sont rapportés, notamment des propriétés antithrombotiques (**Enomoto et al. 2001**), anti-inflammatoires (**Sosa et al. 2005**), antimicrobiennes (**Ben Arfa et al. 2006**) et inhibitrices de l'acétylcholinestérase (**Jukic et al. 2007**).



**Figure I.6** : Structure chimique du Carvacrol (**De Vincenzi et al. 2004**).

#### I.5. Propriétés pharmacologiques

Les propriétés pharmacologiques de la plante *Thymus vulgaris* et de ses différents extraits, en particulier l'huile essentielle et l'extrait aqueux, ont été bien étudiées. En plus de leurs nombreuses utilisations traditionnelles, la plante et ses extraits ont trouvé de nombreuses applications industrielles (principalement comme additifs alimentaires) et médicinales (**Hudaib et al. 2002**).

Les recherches actuelles réalisées sur les effets des extraits de cette plante sur différents systèmes *in vitro* et *in vivo* ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine, la pharmacie et l'industrie moderne, parmi lesquelles on cite les plus importants :

##### I.5.1 Activité antioxydante

*Thymus vulgaris L* se situe parmi les fines herbes séchées contenant les plus grandes capacités antioxydantes. Différents composants du thym lui permettent de posséder un tel statut, comme les phénols (thymol et carvacrol), les flavonoïdes, l'acide caféique et la vitamine E (**Guillén et Manzanos. 1998 ; Kulisicet al. 2006**). Ces constituants inhibent la peroxydation lipidique induite *in vitro* au niveau des mitochondries et des microsomes. Ils inhibent également partiellement la production de l'anion superoxyde (**Bruneton. 1999**). L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été testée pour son activité antioxydante, par deux méthodes distinctes : la technique de décoloration de la  $\beta$  carotène et le test du DPPH (Diphénylpicryl-hydrazyl). Les résultats obtenus montrent que

l'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une grande activité antioxydante in vitro (**Bouhdid et al.2006**).

A côté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* a présenté une activité antioxydante importante. Les caractéristiques antioxydantes observées n'étaient pas seulement entièrement liée à la teneur en phénols de l'huile essentielle dans n'importe quelle méthode analytique, mais vraisemblablement aussi elles sont fortement dépendantes de l'acide rosmarinique C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>, composé phénolique principal dans l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* (**Thuille et al.2003**).

### **I.5.2.Activité antibactérienne**

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

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des micro-organismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases), ou à d'autres interactions pour inactiver les andésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan.1999**).

### **I.5.3.Activité antifongique**

Les infections fongiques sont d'une actualité criante aujourd'hui. En effet, leur extension est largement favorisée par l'utilisation abusive et parfois trop légère des antibiotiques. Ici les groupes moléculaires cités en priorité pour leurs actions antibactériennes se révèlent également actifs sur les champignons. Néanmoins, la durée d'un tel traitement sera plus longue que pour celle d'un traitement antibactérien (**Pierron. 2014**).

L'activité fongistatique des composés aromatiques est liée à la présence de phénols qui sont les plus actifs, suivi des alcools, des aldéhydes (cinnamique et hydrocinnamique), des lactones sesquiterpéniques, des cétones, des éthers et des hydrocarbures. (**Ultee et al.2002**).

## Chapitre II :

### Radicaux libres et stress oxydatif

#### Introduction

Les espèces oxygénées activées (EOA), les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants sont devenus des termes familiers à la fois dans le monde médical et dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement discutées que lors des conférences scientifiques (**Defraigne, J.O. et al. 2008**).

#### II.1. Les radicaux libres

##### II.1.1. Histoire des radicaux libres

**Gerschman et al.** Indiquaient au milieu des années 50 que l'oxygène est indispensable à la vie, il est aussi toxique pour l'organisme (**Gerschman, R. et al. 1954**). S'inspirant de ses travaux, Harman propose la «théorie radicale du vieillissement» (**Harman, D. 1956**) via la production de radicaux libres (entités chimiques très instables et réactives suite à la présence d'un électron libre dans leur structure). L'oxygène est à l'origine du processus du vieillissement cellulaire.

Pour l'histoire du stress oxydant, les américains McCord et Fridovich séparaient, en 1969, à partir des globules rouges humaines, un système enzymatique antioxydant : le superoxyde dismutase (SOD), qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que les radicaux libres sont produits dans notre corps. Ceci est donc le point de départ de recherches sur les sources de production de l'anion superoxyde et sur ses rôles pathologique et physiologique (**McCord, J.M. et al. 1969**).

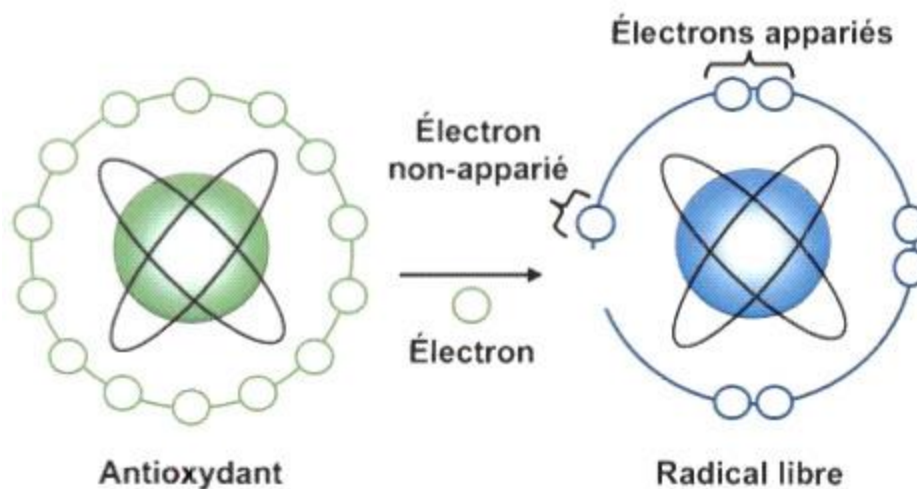
Vers la fin des années 1980, d'autres méthodes plus nécessaires pour l'évaluation des dommages oxydatifs sont apparues au niveau des lipides, de l'ADN ou des protéines. En utilisant toutes ces méthodes, l'efficacité scientifique des molécules antioxydantes peut ensuite être testée *in vivo* dans divers modèles de stress oxydatif, chez l'animal et chez l'homme (**Haleng, J. et al. 2007**).

##### II.1.2. Définition des radicaux libres

L'oxygène est une molécule essentielle à la vie. En tant que source d'énergie, les organismes dits aérobies utilisent des réactions redox (chimiotrophes), impliquant des

interactions entre donneurs d'électrons (agents réducteurs) et accepteurs d'électrons (oxydants) (Koppenol, W.H. 2001).

En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire, car il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron, soit par le transfert de cet électron libre vers une autre molécule (figure II.1). Ce déséquilibre dépend principalement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un deuxième électron est élevée et dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydo-réduction classique. Si, au contraire, cette instabilité est élevée, l'électron libre est rapidement transféré vers une autre molécule. Plus l'instabilité est importante, moins la réaction est spécifique. En d'autres termes, l'électron passe sur une molécule non destinée à cet effet (Oldham, K.M. et al. 1998 ; Goode, H.F. et al. 1993).



**Figure II.1:** Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant (Gilgun-Sherki, Y. et al. 2001).

### II.1.3. Les différentes espèces radicalaires

La chaîne respiratoire mitochondriale, dans la quelle les êtres aérobies puisent leur énergie, joue un rôle capital dans la cellule en couplant l'oxydation de coenzymes, transporteurs d'hydrogène ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP (Adenosine DiPhosphate) en ATP (Adenosine TriPhosphate). Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales :

- En premier lieu, 36 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à fort potentiel énergétique seront générées lors de la réduction de l'oxygène. C'est la mitochondrie qui donne à la cellule une source considérable d'énergie.
- En revanche, approximativement 0,4 à 4% de l'oxygène ne sera pas correctement transféré en eau, en raison de fuites électroniques aboutissant à des imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'oxygène donne naissance à des espèces oxygénées activées (EOA) par réduction monoélectronique (**Knight, J.A. 2001**).

Le radical anion superoxyde se forme (**Tableau II.1**), ce qui conduit ensuite à la production d'autres EOA tels que le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, l'acide hypochloreux et le monoxyde d'azote (NO), (**Coyle, P. et al. 2002**), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) (**Novelli, G.P. 1997 ; Oldham, K.M et al. 1998**).

**Tableau II.1:** Principales ERO radicalaires et non radicalaires (**halliwell, B. 2007**)

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non Radicalaire
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Radical superoxyde <b>O<sub>2</sub><sup>·</sup></b></li> <li>○ Radical hydroxyle: <b>OH<sup>·</sup></b></li> <li>○ Peroxyle: <b>RO<sub>2</sub><sup>·</sup></b></li> <li>○ Alkoxy: <b>RO<sup>·</sup></b></li> <li>○ Hydroperoxy: <b>HO<sub>2</sub><sup>·</sup></b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peroxyde dihydrogène : <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b></li> <li>○ hypochlorite d'hydrogène: <b>HOCl</b></li> <li>○ Ozone : <b>O<sub>3</sub></b></li> <li>○ Oxygène singulet: <b>O<sub>1</sub></b></li> <li>○ Peroxy-nitrite: <b>ONOO<sup>-</sup></b></li> </ul>

Plusieurs mécanismes biochimiques peuvent s'activer dans l'organisme, mais aussi sous l'action d'éléments environnementaux, en produisant des quantités excessives d'EOA, qui vont donc très vite submerger toutes nos défenses antioxydantes (**Hayflick, L. 1985**).

#### II.1.4. Production et origine des radicaux libres

Lors du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, le radical superoxyde (**·O<sub>2</sub><sup>-</sup>**) est produit par réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone dans les mitochondries.

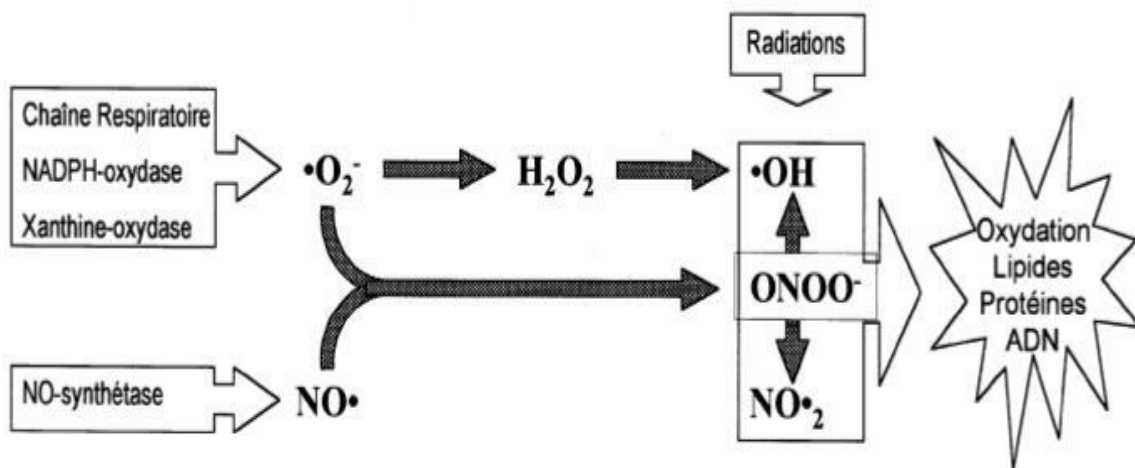
Ce pendant, il est probable qu'au cours d'une agression cellulaire, les mitochondries seront secondairement endommagées et produiront ensuite des quantités considérables de superoxyde. Les cellules phagocytaires comportent une enzyme membranaire appelée NADPH oxydase qui est responsable dans la production du radical superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), elle est activée quand la cellule phagocytaire est stimulée. Cette production de superoxyde est à l'origine de la production de molécules, telles que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou l'hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) indispensables à la destruction du matériel phagocyté.

Une enzyme ubiquitaire appelée la xanthine-deshydrogénase est impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Cette enzyme sera modifiée en xanthine-oxydase au cours des phénomènes d'ischémie-reperfusion (**Tableau II.2**), qui produit du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine.

**Tableau II.2:** Principaux systèmes de production des EOA (**Hayflick, L. 1985**).

Dans l'organisme	Extérieurs à l'organisme
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altération du transport des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (ischémie-reperfusion).</li> <li>• Biosynthèse des prostaglandines (prostanoides et leucotriènes inflammatoires).</li> <li>• Oxydation de l'hémoglobine.</li> <li>• Oxydation du glucose.</li> <li>• Libération du fer de ses protéines de transport.</li> <li>• Agrégation des plaquettes.</li> <li>• Activation des cellules endothéliales.</li> <li>• Activation des globules blancs.</li> <li>• Cythochrome p 450.</li> <li>• Fumée de cigarette.</li> <li>• Alcool.</li> <li>• Médicaments.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exposition au soleil (UV).</li> <li>• Exposition aux irradiations (rayon <math>\gamma</math>).</li> <li>• Amiante.</li> <li>• Pollution.</li> <li>• Ozone.</li> <li>• Alimentation.</li> </ul>

Le fer et le cuivre sont des ions métalliques qui transforment le  $H_2O_2$  en radical hydroxyl ( $OH\cdot$ ). De nombreuses cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO) à partir d'arginine et d'oxygène dans une réaction catalysée par la NO synthétase. Il existe une deuxième forme de NO-synthétase (figure II.2), qui produit de grandes quantités de  $NO\cdot$ , a des concentrations élevées, le  $NO\cdot$  devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec un radical superoxyde ( $\cdot O_2^-$ ) pour former un oxydant puissant : le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ). De plus, le peroxydinitrite peut se décomposer secondairement en d'autres oxydants ( $NO_2$ ,  $OH\cdot$ , etc.) (Oldham, K.M et al.1998 ;Halliwell, B. 1994).



**Figure II.2:** Origine et cibles des principaux dérivés réactifs de l'oxygène (Fontaine, E. et al.2002)

## II.2. Le stress oxydatif

### II.2.1. Définition du stress oxydatif

De petites quantités de dérivés réactifs de l'oxygène seront produites par le métabolisme cellulaire en continu. Cette production est fortement élevée dans certaines situations entraînant un stress oxydatif, qui sera défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. A cause de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les dérivés réactifs de l'oxygène ont été impliqués dans un nombre important de pathologies. La production de dérivés réactifs de l'oxygène augmente en réponse à toute attaque infectieuse, le développement d'un stress oxydatif incontrôlé a été proposé comme l'un des facteurs secondaires contribuant au mauvais pronostic de ces pathologies (Gutteridge, J.M. 1993).



## II.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif

Les EOA qui interagissent avec une variété de substrats biologiques importants sont toxiques. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des ruptures d'ADN et des processus de peroxydation lipidiques peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule (Coyle, P. et al.2002).

### II.2.2.1. Effets sur les protéines

L'oxydation des protéines est une conséquence naturelle de la vie aérobique. Cependant, la plupart des protéines oxydées seront dégradées par protéolyse, sous l'action du protéasome (protéases 20S et 26S) qui joue un rôle clé dans le maintien des fonctions physiologiques de la cellule (Friguet, B. et al. 2000). Les activités protéolytiques diminuent fortement sous l'effet du stress oxydant (Naskalski, J.W. et al. 2000).

Les dommages oxydatifs aux protéines peuvent être importants *in vivo* à la fois, en affectant la fonction des récepteurs, des enzymes, des protéines de transport, et éventuellement en générant de nouveaux antigènes susceptibles de provoquer des réponses immunitaires (Halliwell, B. 1978; Casciola-Rosen, L. et al. 1997). Ceci, parce qu'ils peuvent contribuer à des dommages secondaires à d'autres biomolécules, par exemple l'inactivation des enzymes de réparation de l'ADN (Wiseman, H. et al. 1996).

L'attaque des radicaux libres sur les protéines peut générer des radicaux d'acides aminés, qui peuvent se réticuler ou réagir avec l'O<sub>2</sub> pour donner des radicaux peroxydes. Ceux-ci peuvent faire abstraction de H<sup>•</sup>, en déclenchant plus de radicaux libres et en formant des peroxydes de protéines, qui peuvent se décomposer de manière complexe, accélérée par des ions de métaux de transition, pour générer encore plus de radicaux (Headlam, H.A. et al. 2003).

Les protéines peuvent également être attaquées par des espèces réactives de chlore, de brome et d'azote, donnant des produits tels que la 3-chlorotyrosine, la 3-bromotyrosine et la 3-Nitrotyrosine (Hazen, S.L. et al.1997; Wu, W. et al. 1999 ; 2000; Winterbourn, C.C. et al. 2000; Greenacre, S. A. et al. 2001; Himmelfarb, J. et al. 2001; Aldridge, R.E. et al.2002; Gaut, J.P. et al.2002a). On pense souvent que la 3-nitrotyrosine est un marqueur spécifique de l'attaque de l'ONOO<sup>-</sup> sur les protéines, mais en fait, elle peut être formée à partir de la tyrosine par une gamme d'espèces azotées réactives. Sa production *in vivo* dépend souvent de la production d'espèces telles que le radical de dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) par l'amyéloperoxydase ou d'autres peroxydases (Halliwell, B. et al. 1999; Greenacre, S. A. et al.2001; MacPherson, J.C. et al. 2001; Gaut, J.P. et al. 2002b).



### II.2.2.2. Effets sur les acides gras

Les scientifiques développent de multiples expériences *in vitro* dans le sillage de la découverte de la SOD, qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables de dommages cellulaires importants, via le déclenchement de ruptures et de mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et induction de la peroxydation lipidique (**Haleng, J. et al.2007**).

Le test TBARS ("thiobarbituric reactive substances") a été développé au milieu des années 70, pour la détection du processus de peroxydation lipidique (**Haleng, J. et al. 2007**) qui est un processus complexe et une large gamme de produits formés en quantités variables (**Halliwell, B. et al. 1999**). Les cibles préférées des EOA sont les lipides et, plus spécifiquement, les acides gras polyinsaturés. Une fois formés, les lipides oxydés donnent naissance à des sous-produits tels que le malonaldéhyde, le 4-hydroxynonéal, les lipofuschines («pigment d'âge») ou le pentane (**Knight, J.A. 2001**). La méthode TBARS mesure par colorimétrie le produit de la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le malondialdéhyde (MDA), un sous-produit des lipides oxydés. Cependant, le grand nombre d'artefacts associés à la technique la rend peu fiable (**Haleng, J. et al. 2007**).

### II.2.2.3. Effets sur les glucides

L'excès de glucose et d'acides gras libres induit une production mitochondriale accrue d'EOA (en particulier l'anion superoxyde) au niveau cellulaire en plus des dommages mitochondriaux et une altération de la chaîne de transport d'électrons. La production d'anion superoxyde et d'oxyde nitrique (NO) est augmentée et ils réagissent l'un avec l'autre pour former des peroxydites. En raison de leur caractère particulièrement oxydant, ils altèrent l'ADN, un processus important dans l'activation de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP). Cette enzyme permet une fois activée, de réduire l'activité du glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), indispensable à la glycolyse, notamment au niveau des muscles.

En présence de fer, le glucose sera facilement oxydable. Il est également une source importante de stress oxydatif. Des EOA seront formés par cette oxydation en produisant la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal qui se fixe rapidement sur les protéines, dans lesquelles un groupement qui capte facilement le cuivre apparaît appelé : résidu carboxyméthyllysine (CML). Ce qui déclenche des réactions produisant des radicaux libres (réaction de Fenton) : il en résulte une augmentation accrue de la peroxydation lipidique (**Wautier, M.P. et al.2003**).

Des «produits Amadori» se forment lorsque le glucose réagit avec les groupes amines libres dans les protéines. Ces produits sont relativement instables et se dégradent en produits de glycation avancés (AGE). Ces derniers jouent un rôle important dans le développement des complications du diabète (**Hudson, B. I. et al. 2005**).

#### II.2.2.4. Effets sur l'ADN

L'ADN est une cible de choix pour les EOA. La 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) sera formée lorsque la guanine, par exemple, réagit avec l'OH<sup>•</sup>. (8-OH-dG) qui, au lieu de s'associer avec la cytosine, s'associera à l'adénine, entraînant des mutations dans l'ADN et entraînant des altérations du message génétique impliquées dans le développement du cancer et le vieillissement (**Atkin, M. A. et al.2005**).

Les dommages oxydatifs de l'ADN semblent être liés à un risque accru de développement de cancer plus tard dans la vie (**Halliwell, B. 2002**). L'ADN soumis à une attaque par un radical hydroxyle génère une vaste gamme de produits de modification de bases et de sucre (**Dizdaroglu, M. et al.2002**).

Les produits initiaux de l'attaque radicalaire des purines, des pyrimidines et du désoxyribose subissent une transformation en produits finaux stables dont les quantités relatives dépendent des conditions de réaction (**Dizdaroglu, M.1992; Alam, Z.I. et al.1997; Halliwell, B.1999b; Dizdaroglu, M. et al. 2002**).

#### II.2.3. Moyens de défense contre le stress oxydatif

Le corps dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes pour se protéger des effets nocifs de l'EOA. Il existe deux sources d'antioxydants: l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, l'autre est endogène comprend des enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), des protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et des systèmes de réparation des dommages oxydatifs tels que les endonucléases. A cela s'ajoutent des oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Hozawa, A. et al.2007**).

### II.2.3.1. Moyens de défense endogènes

#### 1-Superoxydes dismutases (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif, assurent l'élimination de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  par une réaction de dismutation qui sera transformé en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, 3 isoenzymes sont décrites : Cu/Zn-SOD1 cytosolique, Mn-SOD2 mitochondriale et Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur teneur en métal, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire.

La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le principal système antioxydant de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par des facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine (Hozawa, A. et al. 2007).

#### 2- Les glutathion peroxydases (GPxs)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes au détriment de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle majeur est l'élimination des peroxydes lipidiques, résultant de l'action du stress oxydatif sur les acides gras polyinsaturés. Le GPx s'effondre en cas de carence majeure en sélénium, c'est donc un bon reflet de cette carence. Cependant, pour un approvisionnement adéquat en sélénium, les niveaux de GPx atteignent un plateau. Le test GPx ne peut donc pas être utilisé comme marqueur d'intoxication au sélénium. Toutefois, sa synthèse étant rénale et hépatique, d'autres facteurs comme l'insuffisance rénale ou la cytolyse hépatique peuvent modifier sa concentration (Hozawa, A. et al. 2007).

#### 3-Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est un cofacteur d'enzymes telles que la SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine  $\beta$ -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle essentiel dans le déclenchement des réactions pour produire les EOA (réactions de Fenton) et peut lorsqu'il est à haute concentration devenir pro-oxydant. L'apport journalier recommandé est d'environ 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau (Defraigne, J. O. 2005 ; Vincent, H. K. et al. 2006).

#### 4- Le zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreuses enzymes et est donc impliqué dans de nombreuses fonctions, telles que le métabolisme des nucléotides, la synthèse des

prostaglandines et le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Tout comme le cuivre, le zinc est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège aussi les groupements thiols des protéines et il peut stopper les réactions de formation des EOA induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu/Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un meilleur indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les viandes, les poissons, les céréales complètes et les légumes secs sont les aliments les plus riches en zinc (**Defraigne, J.O.2005 ; Vincent, H. K. et al. 2006**).

### **5-Le sélénium**

Le sélénium n'est pas un antioxydant en soit, car il ne peut pas piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle clé en tant que cofacteur du GPx. Dans l'alimentation, on trouvera principalement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit un métabolisme hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs tels que le GPx. La dose journalière recommandée est de 5070 µg/jour. Les noix de Brésil, les brocolis, l'ail... sont les aliments les plus riches en sélénium (**Defraigne, J. O. 2005 ; Vincent, H. K. et al. 2006**).

## **II.2.3.2. Moyens de défense exogène**

### **1-La vitamine C**

La plupart des mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur foie ou dans leurs reins. Ce n'est pas le cas pour l'homme, qui doit assurer un apport quotidien d'environ 100 mg à partir d'une alimentation riche en fruits. La vitamine C est avant tout un piègeur fondamental d'EOA ( $\text{OH}^\bullet$  ou  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ). Elle arrête également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E, à partir de la forme radicalaire résultant de sa réaction avec les radicaux lipidiques. Ses fonctions sont multiples : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes du métabolisme du fer (**Hozawa, A. et al.2007**).

### **2-Vitamine E**

Ce terme comprend un ensemble d'isomères, des tocophérols (composés d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et des tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale). D'un point de vue biologique, deux isomères présentent un intérêt particulier, l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -

tocophérol permet de s'insérer dans des membranes riches en acides gras polyinsaturés grâce à leur caractère hydrophobe, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxy ( $\text{ROO} \bullet$ ) pour former un radical tocophéryle, pour éviter ainsi la propagation de la peroxydation lipidique (**Hozawa, A. et al. 2007**).

#### II.2.4. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (**Atawodi. 2005 ; Georgetti et al. 2003**).

Par exemple, l'oxydation des lipides est un facteur favorisant l'apparition de maladies cardiovasculaires, alors que celle de l'ADN se retrouve à différents stades qui conduisent au développement de cancers (**Magder, S. 2006**).

### II.3. Les antioxydants

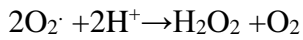
Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO (**Favier. 2003**). Il est clair que tous les systèmes biologiques, dans leurs environnements oxygénés, ont élaboré des mécanismes pour contrer les conséquences potentiellement délétères des agents pro oxydants (**Rizzo et al. 2011**).

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule:

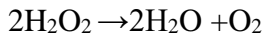
#### II.3.1. Les antioxydants enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes : le superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH-Px et la catalase. Ces enzymes (figure II.3) ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al. 2001**).

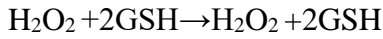
- Superoxyde dimutase :



- Catalase :



- Glutathion peroxydase :



**Figure II.3:** Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO  
(Halliwell. 2006)

### II.3.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique (Kohen et Nyska.2002).

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydant est appelé piégeur « scavenger » pour les Anglo-saxons. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes .... Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• (Favier. 2003 ; Flora.2009).

### II. 3. 3. Antioxydants d'origine végétale

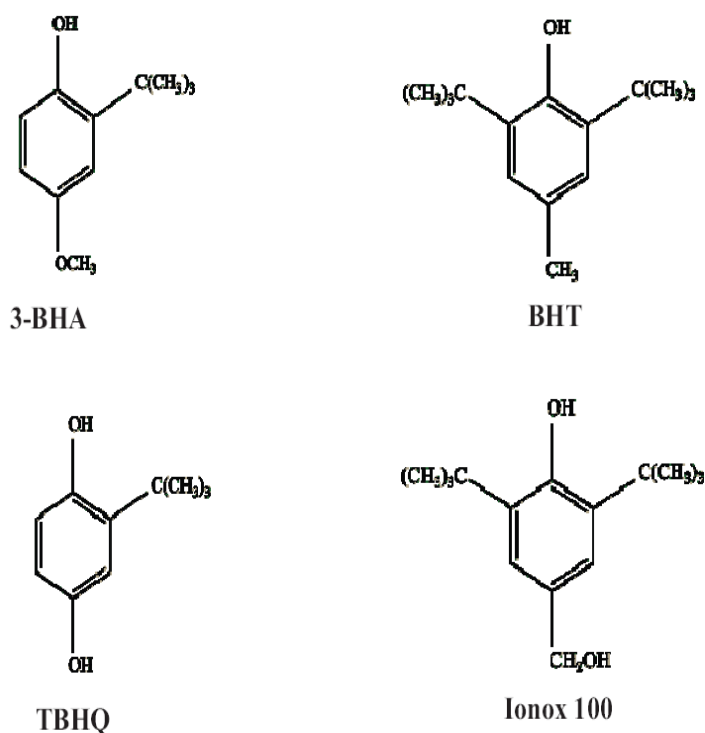
Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi les quels se trouvent le β-carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH• et peroxydes RO<sub>2</sub>•. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidiques, mais d'une manière moins efficace que celle de l'α-tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet O<sub>2</sub>, ce qui leur

permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert *et al.* 2003).

### II.3.4. Les antioxydants synthétiques

Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT), du butylhydroxyanisole (BHA) et des esters de l'acide gallique : gallate de propyle, gallate doctyle, et de dodécyle. Le BHT est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT.

Il existe d'autres antioxydants synthétiques peu utilisés tels que la TBHQ (tertiobutylhydroquinone) utilisée pour la conservation des huiles brutes, l'acide nordihydrogualarétique (NDGA). Ce dernier est utilisé dans les produits à usage topique et le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol ou Ionox 100 (figure II.4), dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT (Johnson.1988).



**Figure II.4:** Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques (Johnson. 1988).

# *Partie pratique*

## ➤ *Chapitre III*

*Matériels et méthodes*

## ➤ *Chapitre IV*

*Résultats et discussion*



## Chapitre III: Matériels et Méthodes

### Introduction

Ce travail a été réalisé au laboratoire de MPA au niveau de « L'université A- Mira, Bejaïa ».

Cette partie expérimentale décrit le matériels et méthodes utilisées dont :

- l'extraction par les solvants organiques à polarité croissante de la plante étudiée, détermination du rendement, caractérisation par CCM, HPLC, spectroscopie infrarouge, suivi par la détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- Etude de l'activité antioxydantes par DPPH et microbiologique (activité antifongique on utilisant deux souches déférentes *Aspergillus Niger* et *Candida Albicans*).

### III.1. Matériel végétale

#### III.1.1. Cueillette

La plante de thymus a été récoltée sur les hauteurs d'AKBOU (Col de Chellata), le 24 avril 2021, l'identification botanique a été réalisée par un herboriste à Bejaïa. Les informations concernant le type, l'origine et la partie de la plante étudiée sont regroupées dans le **tableau III.1**.

**Tableau III.1** : Références de l'échantillon étudié.

Nom scientifique	Date de récolte	Lieu de récolte	Partie étudiée
<i>Thymus vulgaris L officinalis</i>	24 avril 2021	Wilaya de Bejaïa	feuilles

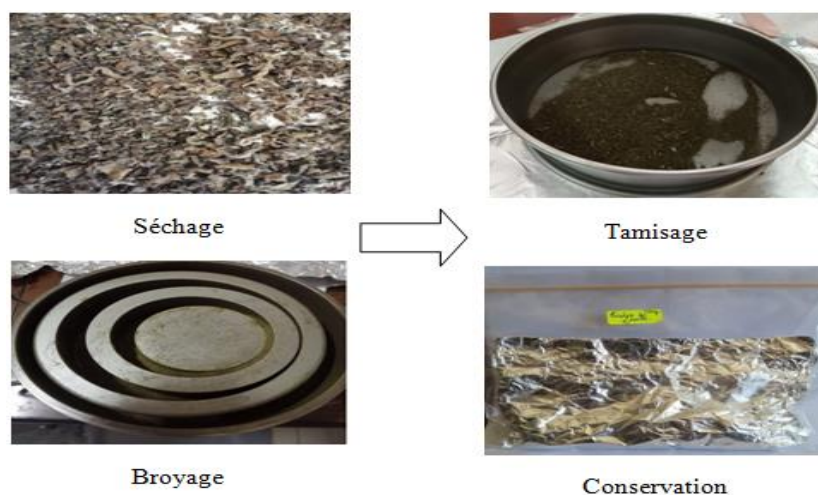
#### III.1.2 Prétraitements de l'échantillon

##### III.1.2.1. Lavage, séchage et broyage

Les feuilles de la plante étudiée ont été nettoyées avec l'eau du robinet, puis étalées sur une surface sèche et propre, pour un séchage à l'air libre pendant 6 jours. Ensuite, les feuilles ont été séparées des tiges, ces dernières ont été découpées à une dimension d'environ 1 cm. Les masses des feuilles sèches et de tiges découpées ont été pesées séparément avec une balance de précision. On note les poids des deux parties. Par la suite, les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur pulverisette (FRITSCH) jusqu'à l'obtention d'une poudre fine (**figure III.1**).

### III.1.2.2. Tamisage et conservation

La poudre obtenue à partir des feuilles de la plante étudiée a été tamisée avec un tamis de 100 $\mu$ m, pesée avec précision, puis conservée dans un sachet de congélation, entouré avec du papier aluminium à l'abri de la lumière et de l'humidité.

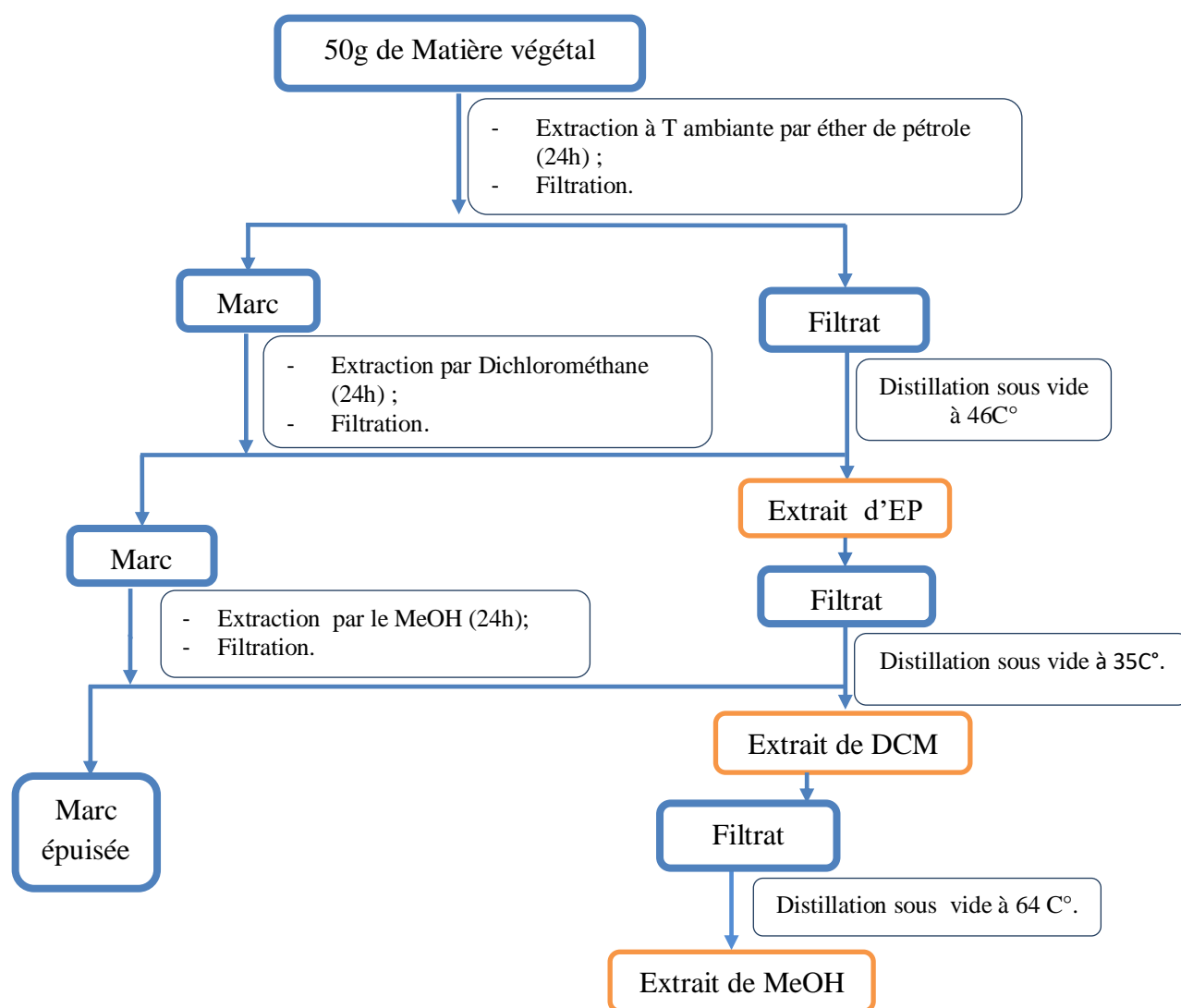


**Figure III.1** : Etapes préliminaires de préparation de la plante étudiée (*Thymus vulgaris* L officinalis).

### III.2. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants, appelées molécules bioactives (principes actifs), mélangés dans la poudre de plante de thymus, dans un solvant approprié (**Chemat. 2014**).

L'extraction est effectuée par épuisement successif du matériel végétal, en utilisant trois solvants à polarité croissante : l'éther de pétrole (EP), le Dichlorométhane (DCM) et le méthanol (MeOH), selon la méthode décrite par **Biallo et al. (2004)** avec quelques modifications. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale, dont nous disposons (dans notre cas, 500ml de solvant pour 50 g de poudre végétale). L'extraction est effectuée sous agitation continue à 600 tours / min et à température ambiante durant 24 heures. Après filtration, le filtrat est ensuite concentré par distillation sous vide des solvants. La **figure III.2**. Illustre les étapes suivies lors de l'extraction des molécules bioactives.



**Figure III.2 :** Schéma d'extraction par les solvants organiques des poudres de feuilles de *Thymus vulgaris L officinalis*

La série d'extraction permet d'obtenir trois extraits de composés phénoliques : extrait de l'éther de pétrole (EEP), extrait de Dichlorométhane (EDCM) et extrait méthanolique (EMeOH).

Les extraits obtenus ont été récupérés dans des tubes secs et propres entourés par un papier d'aluminium et conservés à l'abri de la lumière à température ambiante jusqu'à utilisation et analyse.

### III.3. Détermination du rendement massique d'extraits phénoliques

Après l'étape d'extraction, le calcul du rendement est exprimé en pourcentage de masse de l'extrait sec par rapport au poids du matériel sec initial, par l'équation suivante (**Clémence et Dongmo. 2009**):

$$\%R = \frac{M_{ext}}{M_{éch}} * 100$$

- **R** : Rendement massique (%)
- **M<sub>ext</sub>** : la masse de l'extrait sec après l'évaporation du solvant (g)
- **M<sub>éch</sub>** : la masse de la poudre de l'échantillon de plante de thymus(g)

### III.4. Caractérisation physicochimique et phytochimique des extraits de thymus

#### III.4.1. Analyse qualitative et identification des composés phénoliques des extraits par CCM

##### III.4.1.1.Principe

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée pour la séparation et de l'identification en général de composés organiques, et en particulier des métabolites et des colorants naturels des extraits de plantes. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage qui dépendent des différences de polarités et de solubilités des substances à séparer vis-à-vis des deux phases, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile). Donc la séparation est fonction des différences d'affinités (polarités) des composants de l'échantillon vis-à-vis de la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile (**Braithwaite et Smith. 1999**).

##### III.4.1.2. Méthode de séparation

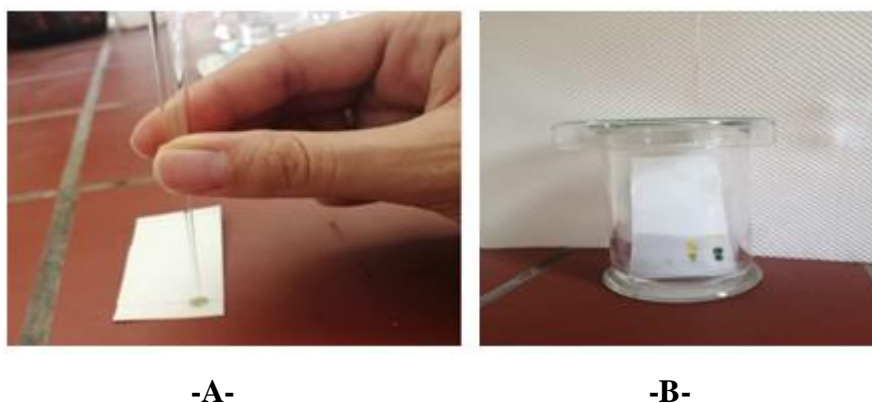
- **La phase stationnaire** : Les analyses qualitatives et de séparation par CCM sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silicagel 60 F254, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur feuille d'aluminium, (**biallo et al. 2004**).
- **La phase mobile** : l'éluant se prépare à différents gradients de polarités (**gwenola et al. 2011**).
  - **Préparation de l'éluant**

Dans notre cas, Deux système de solvants utilisés (**Biallo et al. 2004**) (**Annexe I**) :

- Ether de pétrole - Acétate d'éthyle (8ml: 2ml) (V/V) pour les substances apolaires (EEP, EDCM).
- n-butanol, Acide acétique, et eau (6ml,1.5ml,2.5ml)(v/v/v) pour les substances polaires (EMeOH).

### ○ Dépôt de l'échantillon

Pour déposer l'échantillon sur la plaque, il est recommandé de tracer avec un crayon deux lignes droites parallèles (ligne de dépôt à 1cm du bord inférieur et ligne de fin de migration ou limite à 0,5cm du bord supérieur). Ce dépôt est effectué à l'aide d'une pipette pasteur. Les microgouttes des solutions des extraits ou des témoins (quercétine, acide gallique, catéchine à 2 mg/ml) ne doivent être déposées perpendiculairement en effleurant doucement la surface de la plaque, et appliquées en différents points de la ligne de départ, espacés d'au moins 0,5 à 1 cm, et 0,5 cm des deux bords latéraux de la plaque. On doit concentrer chacun des dépôts en faisant 2 applications pour chacun des dépôts. On dépose la plaque sur une surface propre et sèche pour évaporer pendant quelques minutes les solvants, ensuite la plaque est placée dans la cuve pour séparation et identification (**voir image de la figure III.3**).



**Figure III.3 :** Photos montrant, **A)** le mode de dépôt des différentes solutions, **B)** l'élution et la séparation de substances de différentes colorations (de gauche à droite, le témoin quercétine, le témoin acide gallique, l'extrait EP, l'extrait DCM) sur plaque CCM de gel de silice.

### ○ La révélation par UV

Après développement, les plaques CCM sont séchées, observées sous lampe UV à 254 nm et à 366nm, puis pulvérisées par un mélange vanilline sulfurique (réactif de Godin) qui est un réactif à spectre large permettant de caractériser des terpenoïdes, des dérivés de type phénylpropanes et des phénols. Elle est formée d'un mélange (V/V) d'une solution éthanolique d'acide sulfurique (V/V) et d'une solution éthanolique de vanilline à 1%. La révélation chimique par la vanilline doit se poursuivre à chaud à 60°C pendant 5 minutes à fin de révéler les spots de différentes couleurs (acide gallique et polyphénols de couleur rouge brun, le linalol, le thymol et le carvacrol de couleur jaune orangé, les flavonoïdes de couleurs variables bleue-gris, vert ou jaunes), issus de la séparation (**Biallo et al. 2004**). Les huiles essentielles moins polaires (linalol, thymol et carvacrol migrent en

tête, suivies des flavonoïdes et des polyphénols (très polaires et protiques) qui migrent très lentement ou pas avec le premier éluant mais plus rapidement avec le deuxième éluant).

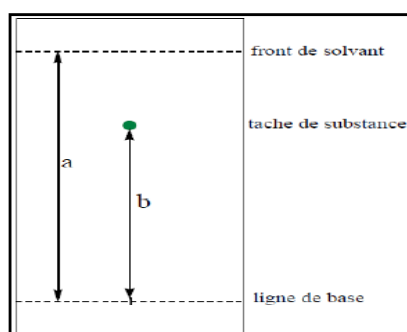
### III.4.1.3 .Mesure et calcul du rapport frontal Rf

Le Rf (rapport frontal) est défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par la substance et la distance parcourue par le front du solvant.

Le Rf est une caractéristique d'un composé dans des conditions chromatographiques données ; éluant, température, phase stationnaire (**Jurd.1962**). Les valeurs des Rf effectués sur des systèmes chromatographiques peuvent apporter beaucoup d'indications sur la nature chimique du composé (Polaire, apolaire, protique, poids moléculaire, type de groupement fonctionnel) (**Benguerba. 2008**). On détermine pour chaque constituant le rapport frontal qui est compris entre 0 et 1.

$$Rf = \frac{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le spot du composé}}{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant}} = \frac{b}{a}$$

La comparaison des Rf entre les tâches des substances séparées de chacun des extraits, avec celles des témoins connus (**figure III.4**) permet l'identification de la nature des composés (**Hainque et al. 2008**).



**Figure III.4:** Méthode de mesure et de calcul du Rf (**Hainque et al. 2008**).

### III.4.2. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC

#### III.4.2.1 .Principe et méthode

L'analyse est réalisée par une technique HPLC (UHPLC<sup>+</sup>focused, Ultimate 3000 autosampler column compartiment).

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques (**Gomez-Caravaca et al. 2006**).

- **Protocole expérimental**

20 µl de chaque extrait ont été injectés dans une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. La phase mobile (éluant) est constituée de trois solvants : l'eau distillée, méthanol, acide acétique (50 : 47 : 2.5) (V /V /V). Le gradient d'éluion appliqué est de type isocratique pour un temps d'analyse de 15 min. Le débit est de 1 ml / min (**Amarowicz et al. 2005**). La détection a été effectuée par un détecteur UV à une longueur d'onde égale 254nm. Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Débit: 1 ml/min ;
- Pression de travail : 100-150 bars ;
- Volume d'injection:20µl ;
- Longueur d'onde: 254 nm ;
- Temps d'analyse : 15 min ;
- Colonne C18

#### III.4.2.2. Préparation de la phase mobile, des solutions standards et des extraits

La phase mobile est composée de trois solvants polaires : l'eau distillée, méthanol et l'acide acétique (500ml, 470ml, 25ml) respectivement.

L'étalon préparé en mélangeant un volume (0.7ml) de méthanol, et un volume (0.4ml) de chaque standard (acide gallique, quercitine).

0.4ml de chaque extraits (dilués 20 et 200 fois dans le méthanol) est ajouté à 1.1ml de méthanol.

### III.4.3. Caractérisation par infrarouge IRFT

La spectrophotométrie infrarouge est une technique d'analyse qualitative et quantitative, utilisée pour l'identification des groupements fonctionnels des composés, qui sont caractérisés par leurs bandes d'absorption. Elle consiste à soumettre la molécule au rayonnement IR.

Dans notre étude, l'ensemble des spectres IR ont été enregistrée à l'aide d'un appareil spectrophotométrie infrarouge de modèle SHIMADZU FT IR-8400S, piloté par un ordinateur muni d'un logiciel.

- **Protocole**

L'analyse se fait sur des échantillons sous forme des pastilles préparées sous une pression de 80 KN pendant 2min, avec un mélange de 80 mg de KBr sec et 2mg de chaque poudre des extraits (EP, DCM, MeOH) secs, ainsi que des poudres des standards de quercétine et d'acide gallique purs.

### III.4.4. caractérisation par UV-visible

#### III.4.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de feuilles de *Thymus vulgarisa* été effectué par spectrophotométrie UV-visible selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al. 1999**).

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Cicalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon. 1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle, selon le principe de la loi de Beer-Lambert, à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot& Charpentier. 2006**).

- **Mode opératoire**

0.4ml d'extrait (préparé dans l'eau distillée avec une dilution de 200 fois) est ajouté à 1.6ml de la solution de  $Na_2CO_3$ .Après agitation, 2ml de la solution de Folin-Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) (**Annexe I**) est ajouté à l'ensemble. Après 2h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 765 nm par rapport à un blanc (sans extrait).

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-200 $\mu$ g/ml), comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon.



Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de feuilles en poudre (mg Eq AG/g Ex Sec).

#### III.4.4.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) cité par (Djeridane *et al.* 2006) et (Boudiaf.2006) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

- **Mode opératoire**

0.4ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol avec une dilution de 20 fois) est ajouté à 2ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (à 2% dans le méthanol) (Annexe I). Le mélange est vigoureusement agité puis laissé au repos. Après 15 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm par rapport à un blanc (sans extrait).

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ) réalisée par un standard "la quercétine" à différentes concentrations (0-300 $\mu\text{g/ml}$ ) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

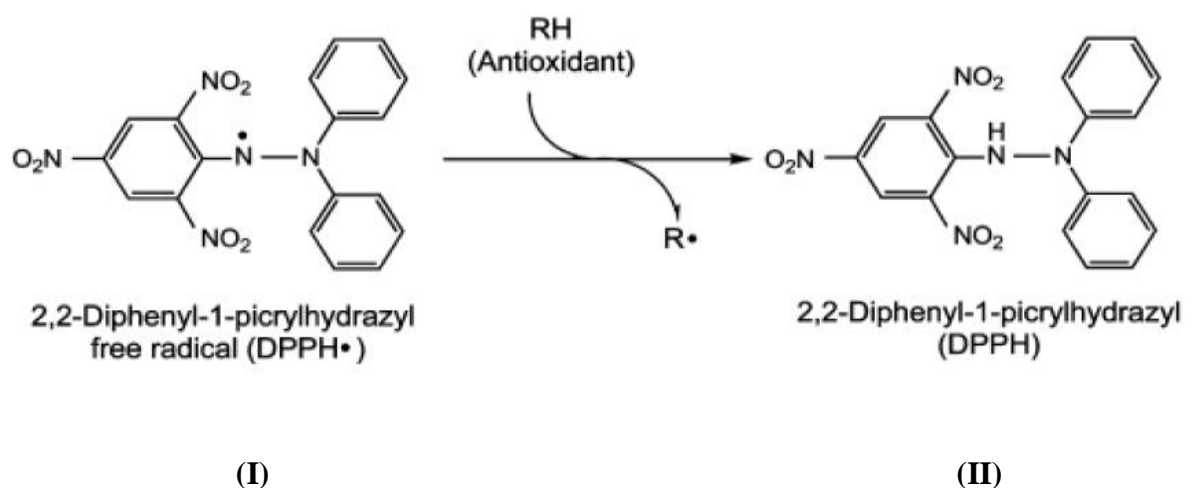
Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EqQ/g Ex Sec).

### III.5. Etude de l'activité biologique des extraits

#### III.5.1. Activité antioxydante par la méthode du DPPH

- **Principe**

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante. En effet, le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres stables. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La présence de ces radicaux DPPH $\cdot$  donne lieu à une coloration violette foncée (Figure III.5), de la solution. La réduction des radicaux DPPH $\cdot$  par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution en jaune (Molyneux.2004). Le changement de couleur peut être suivie par spectrophotométrie à (516nm- 517nm) et de cette façon le potentiel antioxydant d'une substance ou d'un extrait de plante peut être déterminé (Popovici *et al.* 2010 ; Molyneux.2004).



**Figure III.5:** Réactions entre le radical DPPH<sup>•</sup> (violet, oxydé (I)) et l'antioxydant pour former le DPPH stable (jaune, réduit (II)) (Moon et Shibamoto.2009).

- **Mode opératoire**

Ce test a été évalué suivant la méthode de (Brand et al.1995) avec quelque modification.

- ✓ 100µl d'échantillon d'extrait dilué 20 fois ou 200 fois ont été additionnés à 2.90ml de la solution méthanolique de DPPH<sup>•</sup> (6.10<sup>-5</sup>M) (Annexe I).
- ✓ 100 µl de méthanol ont été additionnés avec 2.90 ml de DPPH pour la préparation du témoin. Après 30min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, les absorbances des deux solutions sont mesurées par un spectrophotomètre UV-visible à 516nm par rapport à un blanc (méthanol +DPPH).

Ainsi, l'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH, et calculée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{AbsTémoin} - \text{Abséchantillon})}{(\text{AbsTémoin})} * 100$$

- **Inhibition%** : pourcentage d'inhibition des radicaux libres.
- **Abs Témoin** : absorbance du témoin.
- **Abs échantillon** : Absorbance de la solution contenant l'échantillon.

### III.5.2. Tests microbiologiques

#### III.5.2.1. Activité antifongique

Afin de tester le pouvoir antifongique des extraits de *Thymus vulgaris* on utilise deux méthodes

**a- Méthode de diffusion à partir d'un disque de papier Wattman (Essawi et Sour. 2000)**

- **Souche utilisée**

L'activité antifongique des extraits a été testé sur deux souches déférentes « **Aspergillus Niger, candida albicans** » fournie par le laboratoire de maitrise des énergies renouvelables de l'université de Bejaia, sur deux milieux différents, gélose PDA (potatos dextrose agar) pour l'aspergillus Niger et l'extrait de Malt pour la levure (candida albicans).

➤ **Champignon (Aspergillus Niger)**

Ce sont des champignons saprophytes, c'est-à-dire qui tirent leur nourriture de substances organiques en décomposition. Le genre *Aspergillus* comprend aujourd'hui quelque 185 espèces, dont une vingtaine est retrouvée en pathologie humaine. Ce champignon pousse rapidement (2 à 3 jours) sur les milieux de culture classique (géloses au malt et sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25C° et 30C°, mais *A.Niger* peut se développer jusqu'à 42C°. Les colonies d'*A.Niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et à maturité, elles deviennent noires (**Tabuc. 2007**).

➤ **Levure (Candida Albicans)**

Les levures sont typiquement unicellulaires, quoique très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire (**Fuerst. 1976**).

*Candida albicans* est la seule levure prise dans notre étude. Elle est principalement à l'origine de la candidose disséminée. C'est un champignon fréquemment retrouvé au niveau de la bouche et du tractus gastro-intestinal de plusieurs personnes normales. Parmi les conditions favorisant une infection à candida, notons le diabète, la grossesse, les antibiotiques, les cortico- stéroïdes et toute maladie pouvant affecter l'état général d'un individu. La nystatine (Mycostatin) est très efficace dans le contrôle des infections muco-cutanées (**Pieri et Kirkiacharian .1992**).

- **Témoins négatives : DMSO**

Les étapes de réalisation du test microbiologique avec la méthode des disques sont illustrées dans la (figure III.6) et résumées comme suit :

- **Préparation des boîtes**

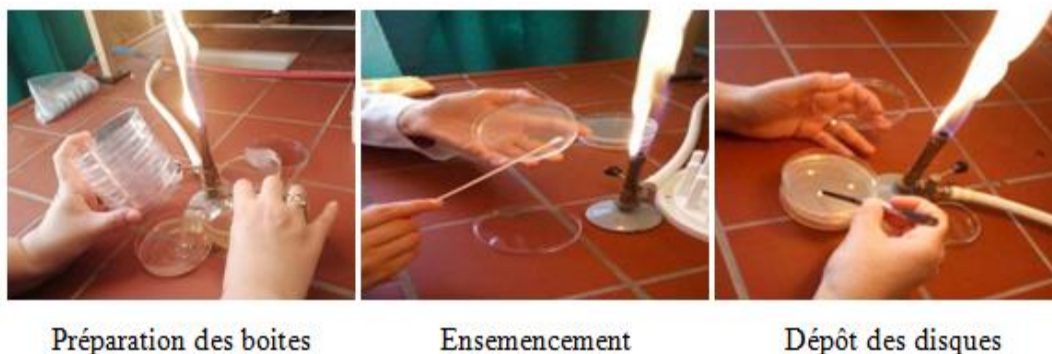
La gélose (PDA) et l'extrait de malt stérile sont d'abord liquéfiées dans un bain marie à 100C° pendant un temps suffisant, ensuite coulée directement dans des boîtes de pétries stérilisées et laissées solidifier.

- **Ensemencement**

Les boîtes gélosées, sont ensemencées par étalement à l'aide d'un écouvillon stérile, d'une suspension de souches. Deux boîtes sont utilisées pour chaque extrait et une boîte pour chaque témoin (DMSO). L'ensemencement est réalisé de telle sorte à assurer une distribution homogène de la souche.

- **Dépôt des disques**

Les disques stériles de papier wattman sont préparés, déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu ensemencé, puis imbibés de 10 µl de chaque extrait, cette opération est réalisée auprès de bec benzène. Les boîtes de pétries sont incubées à 25C° pendant trois jours. La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition pour chaque souche à l'aide d'une règle.



**Figure III.6:** Test de l'activité antifongique avec la méthode des disques.

**b- Autre méthode**

- **Souche utilisé** : Aspergillus Niger
- **Milieu de culture** : Gélose extrait de malt
- **Témoin positives** : Antifongique commercial, et cyclo
- **Préparation des boîtes de gélose** :

La gélose extrait de malt stérile est d'abord liquéfiée dans un bain marie à 100C° pendant un temps suffisant, ensuite on réalise un mélange de 1ml de chaque extrait avec 20ml de la gélose tiède dans un flacon stériles, Après agitation des tubes, le milieu est coulée dans des boites de pétries stérilisées et laissées solidifier.

Une boîte de Pétrie contenant 20 ml de milieu de malt sans extrait est inoculer pour servir de témoin.

- **Ensemencement** :

L'ensemencement a été réalisé en utilisant un écouvillon au niveau de la surface du substrat. Chacune des boîtes a étéensemencée de telle sorte à assurer une distribution homogène de la souche. Enfin, l'incubation a été réalisée à température de 25°C pendant trois jours. Chaque essai est répété deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

**Préparation des boites****Ensemencement****Figure III.7:** Test de l'activité antifongique

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### Introduction

Nous allons pour présenter l'essentiel de nos résultats obtenus après extraction, étude phytochimique et de quelques propriétés biologiques (anti-oxydante, antifongique) des extraits du *thymus vulgaris L. officinalis* du nord de l'Algérie.

### IV.1. Rendement massique en polyphénols de l'extraction

Pour l'obtention des différents extraits de la poudre de feuilles de *Thymus Vulgaris L. Officinalis*, nous avons réalisé une extraction par épuisement avec des solvants à polarité croissante, selon la méthode de **Biallo et al. (2004)**, en opérant successivement avec les solvants : EP, DCM, MeOH.

Le calcul des rendements, par rapport au poids total de la poudre de feuilles, montre que les extraits apolaires (EP et DCM), ont donnés les proportions les plus élevées estimés à 58.76% et 57.49%, respectivement dans EP et dans DCM. Ces valeurs peuvent être expliquées par le fait que les substances bioactives extraites de la plante, sont très solubles dans les solvants apolaire ou moins polaires et aprotiques (EP et DCM), en comparaison avec l'extrait polaire et protique (MeOH), pour lequel on observe le rendement d'extraction de substances utiles le plus faible (13.61%). Les rendements des extractions et les colorations des extraits sont reportés dans le **tableau. IV.1** ci-après.

**Tableau. IV.1 :** Couleurs et rendements massiques des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris L. officinalis*.

Les extraits	Aspect de la couleur	Le rendement %
EP	Marron foncé	58.76
DCM	Vert foncé	57.49
MeOH	Vert foncé	13.61

Les rendements massiques des extraits ne sont que relatifs et dépendent de la méthode et des conditions dans lesquelles les extractions sont été effectuées .La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante (**Lee et al., 2003**).

## IV.2. Résultats de l'étude phytochimique

### IV.2.1. Résultats de l'analyse qualitative et quantitative par chromatographie

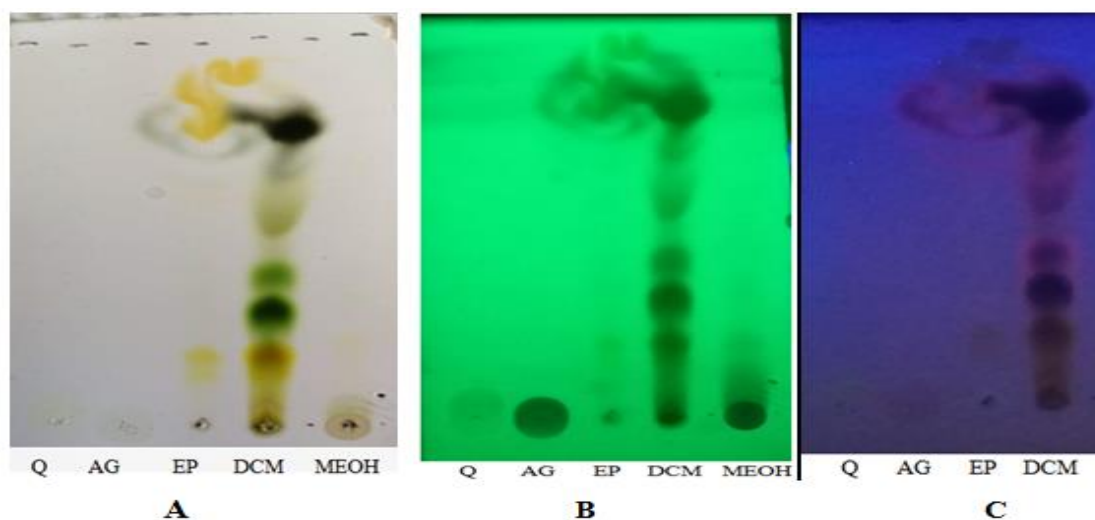
#### IV.2.1.1. Caractérisation et identification des composés extraits par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse chromatographique par CCM des extraits a mis en évidence la présence de nombres de spots relatifs à chaque type de métabolites (**Tableau IV.2 ; IV.3**). Ces spots se distinguent par la valeur du rapport frontal **R<sub>f</sub>** et par la couleur observée à l'œil nu ou par UV à 254 et à 365 nm, et révélée chimiquement par la solution acide de vanilline.

##### ➤ 1<sup>er</sup> Eluant :

Les témoins utilisés dans cette analyse n'ont pas migré avec le système de solvant apolaire (éther de pétrole et acétate d'éthyle). Par conséquent, on ne peut pas comparer leurs **R<sub>f</sub>** avec les composés des extraits (EP, DCM, MeOH) qui ont migré dans ce système de séparation.

Dans notre étude, la phase stationnaire est polaire (gel de silice), et la phase mobile est apolaire (éther de pétrole + acétate d'éthyle). C'est la chromatographie en phase normale, les composés les moins polaires migreront plus rapidement et en tête, avec des **R<sub>f</sub>** plus élevés, tandis que les composés les plus polaires et protiques ne migreront pas ou lentement avec des **R<sub>f</sub>** plus faible :



**Q** : quercétine ; **AG** : acide gallique ;

**EP** : extrait à l'éther de pétrole ; **DCM** : extrait au Dichlorométhane ; **MeOH** : extrait au méthanol.

**A** : chromatographie avant l'observation sous la lampe UV ; **B** : Chromatographie photographié sous lampe UV à 254nm **C** : chromatographie photographié sous lampe UV à 365nm.

**Figure IV.1:** Photos des plaques de CCM des extraits séparés dans le premier éluant « éther de pétrole- acétate d'éthyle ».

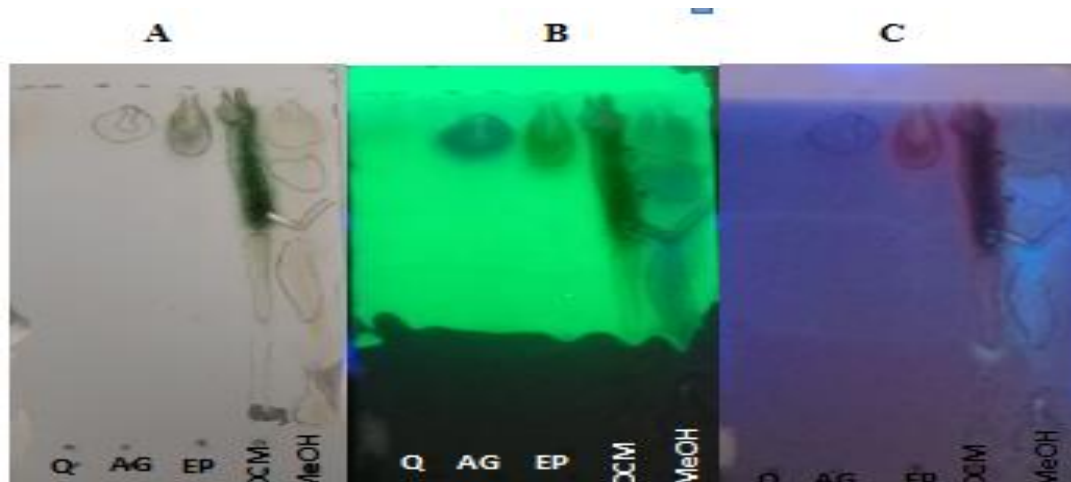


D'où, le thymol et le carvacrol ainsi que d'autres huiles essentielles migreront en premier lieu avec des Rf de valeurs les plus élevées, suivi de l'acide gallique et de la quercétine, et par d'autres polyphénols et flavonoïdes de poids moléculaires plus élevées, comme les dimères tels que l'épicatéchine, l'isoflavonide et les tocophérols.

**Tableau IV.2 :** Valeurs des Rf et aspects des spots des composés séparés par CCM avec le premier éluant (éther de pétrole-acétate d'éthyle) et révélés par UV.

Extrait	Rf	Plaque révélée à la vanilline	Fluorescence à 254nm	Fluorescence à 365 nm	Composés identifiés
EP	0	Jaune et marron clairs	-	-	Quercétine, acide gallique
	0,18	Jaune	Gris foncé	-	Catéchine,
	0,72	gris	-	Rose	Carvacrol
	0,8	gris	-	-	Thymol
	0,92	Jaune orangé	-	-	linalol
DCM	0,07	Marron	-	-	polyphénols
	0,18	Jaune	-	Jaunâtre	quercétine
	0,29	Jaune orangé	-	Jaunâtre	Catéchine
	0,4	vert foncé	-	Bleu foncé	Chlorophylle B
	0,54	vert clair	-	Rose	-
	0,62	jaune verdâtre	-	Rose clair	Chlorophylle A
	0,69	Gris clair	-	Gris sombre	Carvacrol
0,78	gris foncé	-	-	Thymol	
MeOH	0,06	-	Marron clair	-	Acide gallique,
	0,12	-	Vert clair	-	catéchol,
	0,15	-	Jaune clair	-	Chlorophylle A et B
	0,31	-	-	-	-
	0,38	-	-	-	-
	0,69	-	Gris clair	-	Carvacrol
	0,83	-	-	-	thymol
Témoin	0,06	Marron clair	Gris clair	incolore	Acidegallique
	0	Jaune très clair	Gris foncé	Jaune terne	Quercétine



➤ 2<sup>ème</sup> éluant

**Q** : quercétine ; **AG** : acide gallique ; **EP** : extrait à l'éther de pétrole ; **DCM** : extrait au dichlorométhane ; **MeOH** : extrait au méthanol ; **A** : chromatographie avant l'observation sous la lampe UV ; **B** : chromatographie photographiée sous lampe UV à 254nm ; **C** : chromatographie photographiée sous lampe UV à 365nm.

**Figure IV.2:**Photos des plaques de CCM des extraits séparés dans le deuxième éluant « n-butanol, acide acétique, eau ».

**Tableau IV.3 :** Valeurs des Rfs et aspects des spots des composés séparés par CCM avec le deuxième éluant (n-butanol, acide acétique, eau) et révélés par UV.

Extrait	Rf	Plaque révélée à la vanilline	Fluorescence à 254nm	Fluorescence à 365 nm	Composés identifiés
EP	0	Jaune et marron clair	-	-	Quercétine, AG Chlorophylle Quercétine thymol
	0.14	-	Jaune clair	-	
	0.18	Jaune	-	Jaunâtre	
	0.81	gris	-	-	
DCM	0.15	-	Jaune clair	-	Chlorophylle A et B Catéchine Chlorophylle B Chlorophylle A linalol
	0.22	Jaune	-	Jaunâtre	
	0.43	Vert foncé	-	Bleu	
	0.63	Jaune verdâtre	-	Rose	
	0.92	Jaune orangé	-	-	
MeOH	0.23	Jaune	-	Jaunâtre	Catéchine - - -
	0.43	-	-	-	
	0.49	-	-	-	
	0.74	gris	-	-	
témoins	0	Marron clair	Gris foncé	incolore	Acide gallique
	0.04	Jaune très clair	Gris foncé	Jaune terne	quercétine

#### IV.2.1.2. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Deux composés phénoliques purs (acide gallique et quercitine) ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme témoin. Leur temps de rétention sont mentionnés dans le **tableau IV.4**, et **Tableau IV.5**.

Les chromatogrammes de l'analyse HPLC sur colonne C18 (apolaire), des extraits de thymus étudié sont présentés sur le **tableau IV.5**. Différentes substances ont été identifiées dans nos extraits par comparaison des chromatogrammes des échantillons avec ceux des substances purs témoins.

**Tableau .IV.4:** Les temps de rétention des standards.

Standard	Temps de rétention (min)	Aire relative %
<b>Acide gallique</b>	<b>5.409</b>	<b>65.78</b>
<b>quercitine</b>	<b>1.689</b>	<b>34.22</b>

**Tableau IV.5:** Temps de rétentions des principes actifs des extraits de *Thymus Vulgaris L. officinalis*.

Temps de rétention (min)							
Extrait dilué 200 fois		Extrait dilué 20fois					
DCM	MeOH	EP	Composé	DCM	Composé	MeOH	Composé
5.507	3.505	5.989	AG	5.549	AG	3.2	Catéchine
11.793	4.868	8.679	-	7.576	-	4.785	-
12.557	-	11.869	Thymol	11.64	Thymol	7.238	-
-	-	-	-	1	-	10.825	Carvacrol
-	-	-	-	-	-	12.127	Thymol

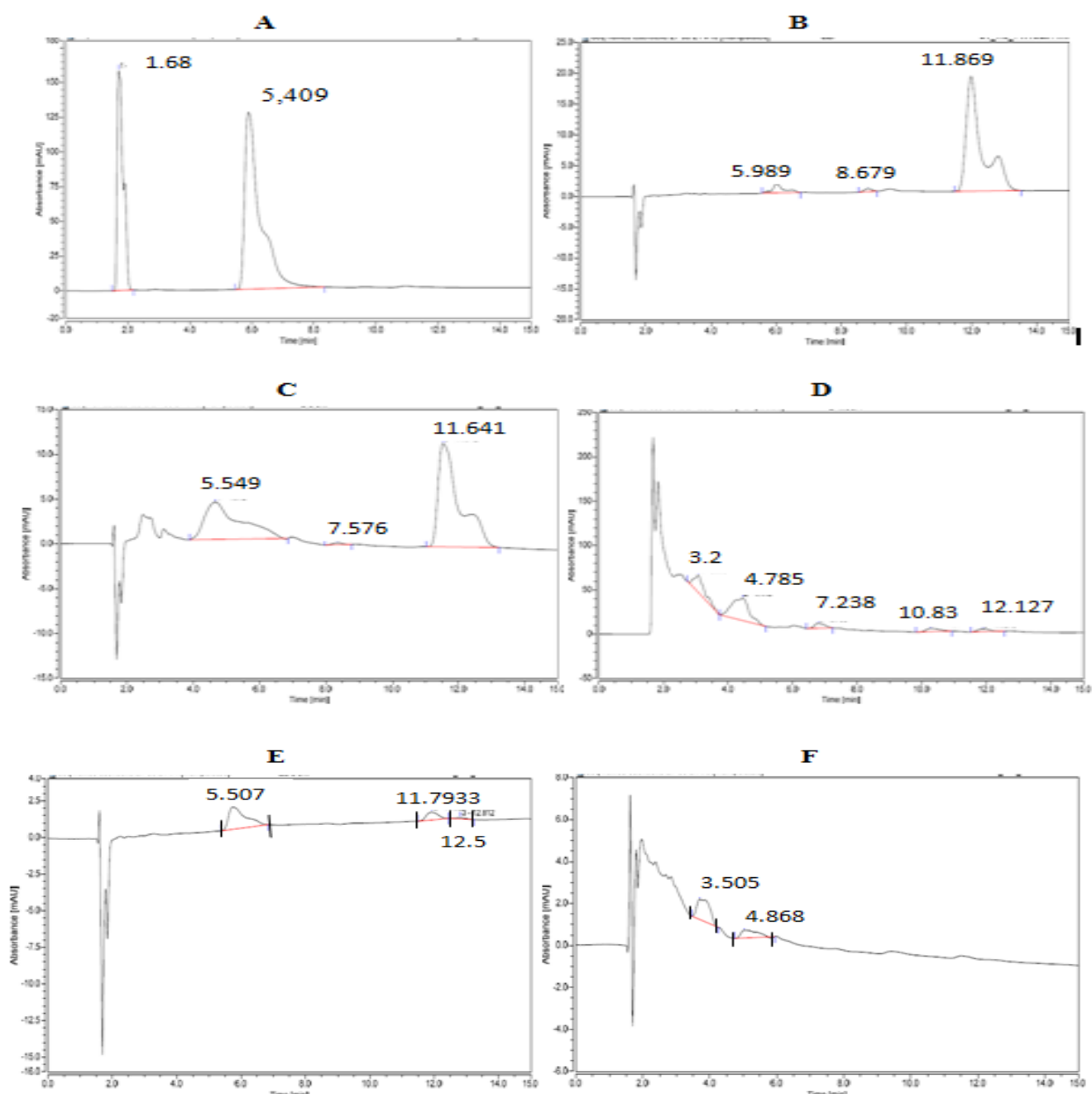
Dans notre étude, on a utilisé une phase stationnaire (colonne C18) apolaire, et une phase mobile polaire et protique (eau, méthanol, acide acétique).

L'ordre d'affinité est que les composés les plus polaires et protiques qui vont migrer en premier, avec des temps de rétentions plus faibles comme la quercétine, la catéchine et l'acide gallique. Par

contre les composés les moins polaires ayant une affinité vis-à-vis à la phase stationnaire vont migrer plus lentement, et avec des temps de rétentions plus grands (carvacrol, thymol et linalol).

Ce qui signifie, le thymol et le carvacrol sont les deux composés phénoliques (isomères) qui contiennent un seul OH et plus de substituant alkyles (isopropyle, méthyles) auront des temps de rétentions plus élevés et proche de 11 et 12min respectivement ((Merkenet *al.*, 2000).

L'acide gallique possède plus de OH et une fonction acide, ce qui fait il va migrer plus rapidement que le thymol mais moins rapidement que la quercétine, qui est très polaire possédant plus de groupements OH (5) que l'acide gallique (3) et a dans sa structure un noyau quinoléique, qui lui confère une très grande polarité en plus des OH sur les cycles.

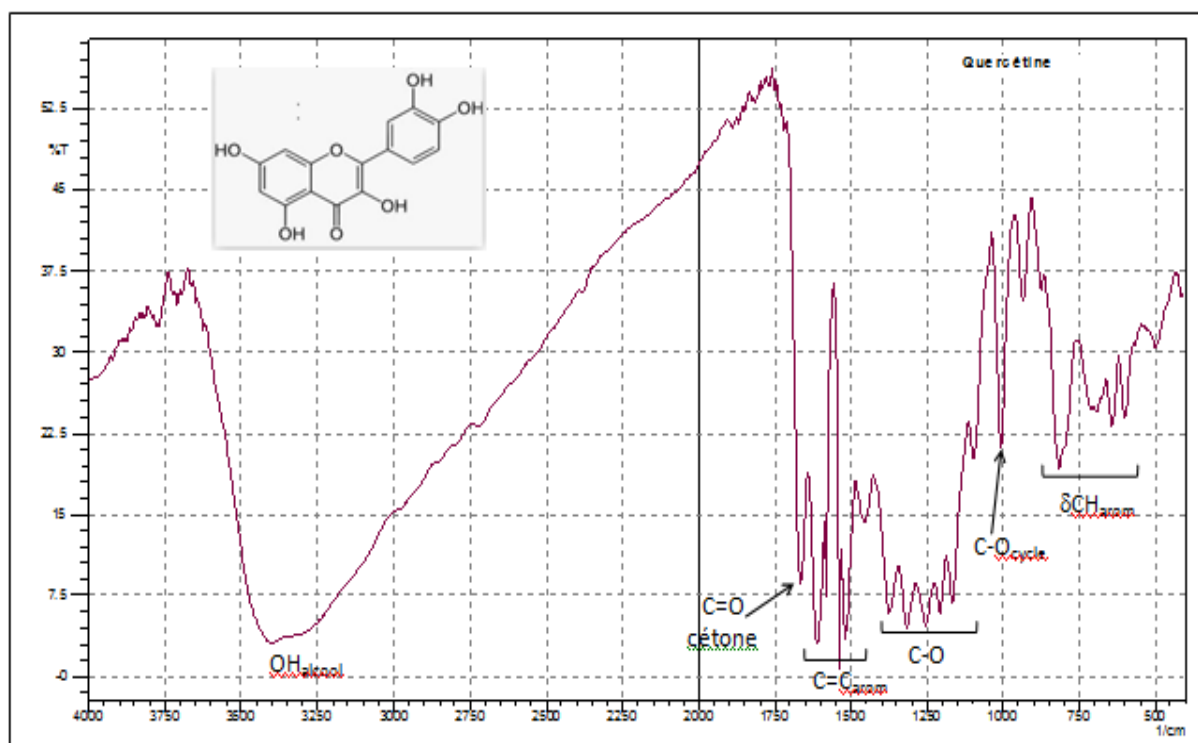


- A** : chromatogramme HPLC des standards acides gallique et quercétine ;  
**B** : chromatogramme HPLC d'extrait éther de pétrole dilué 20fois ;  
**C** : chromatogramme HPLC d'extrait Dichlorométhane dilué 20fois ;  
**D** : chromatogramme HPLC d'extrait méthanol dilué 20fois ;  
**E** : chromatogramme HPLC d'extraits Dichlorométhane dilué 200 fois ;  
**F** : chromatogramme HPLC d'extrait méthanol dilué 200 fois.

**Figure. IV.3** : Chromatogrammes d'HPLC enregistrés à 254nm.

#### IV.2.1.3 Caractérisation par IRFT

Les spectres IR des extraits de *thymus vulgaris L Officinalis* obtenus ont été enregistrés dans le domaine  $[4000-400 \text{ cm}^{-1}]$ . L'analyse des spectres IR (**figures IV.4, IV.5, IV.6, IV.7, IV.8**), par comparaison avec les références standards qui sont l'acide gallique et la quercétine.



**Figure IV.4** : Spectre infrarouge IRFT de la quercétine dans le KBr.

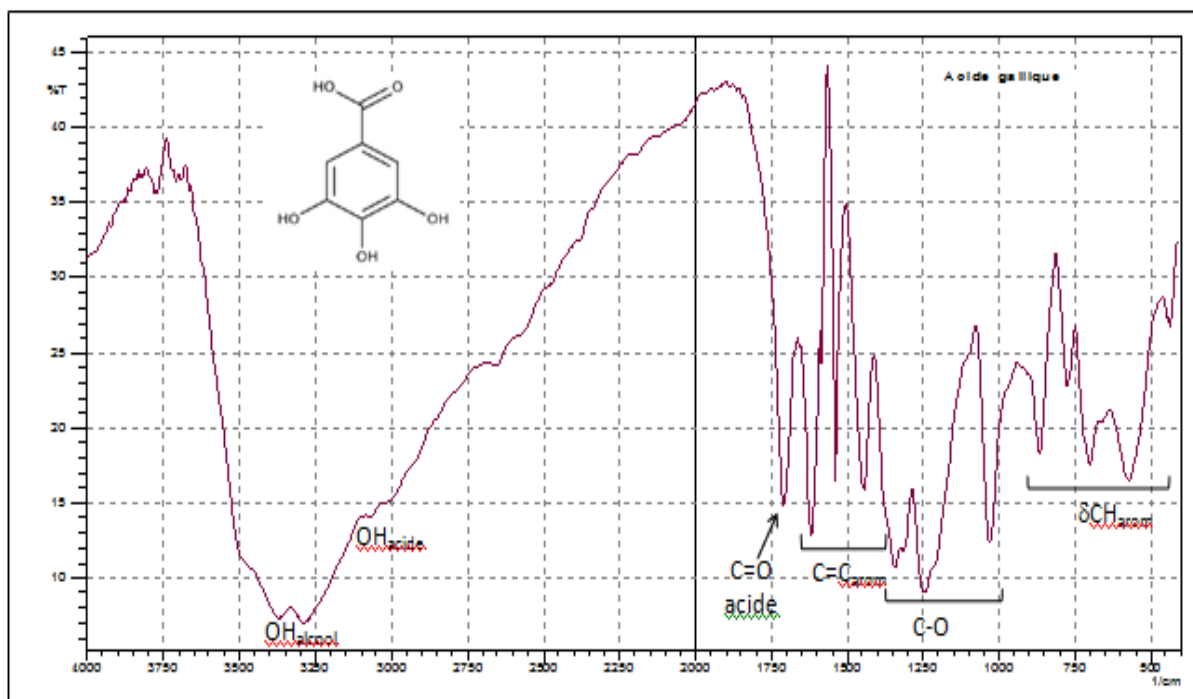


Figure IV.5 : Spectre infrarouge IRFT de l'acide gallique dans le KBr.

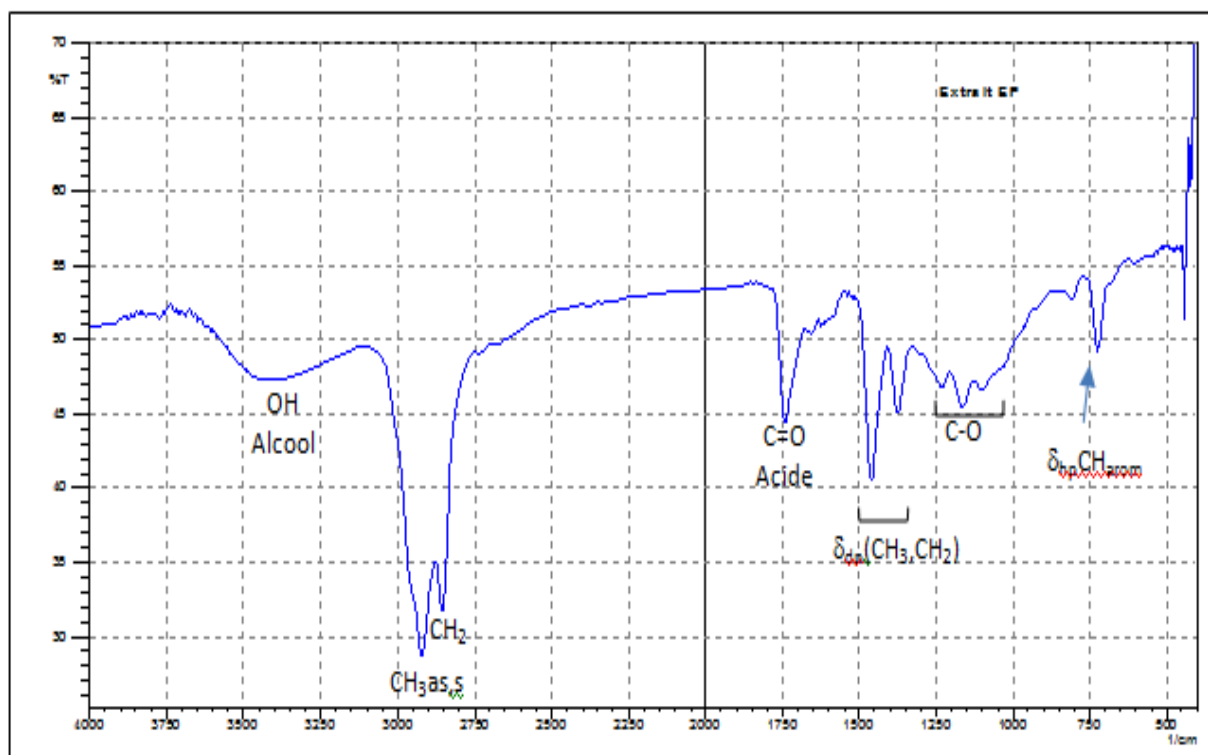
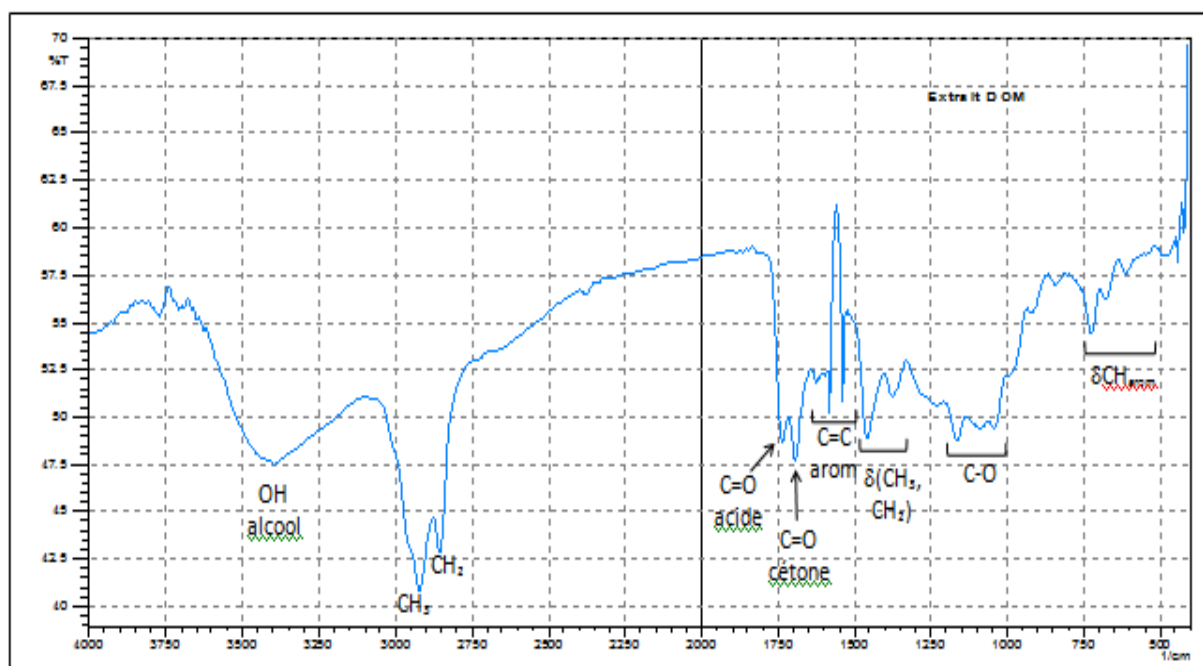
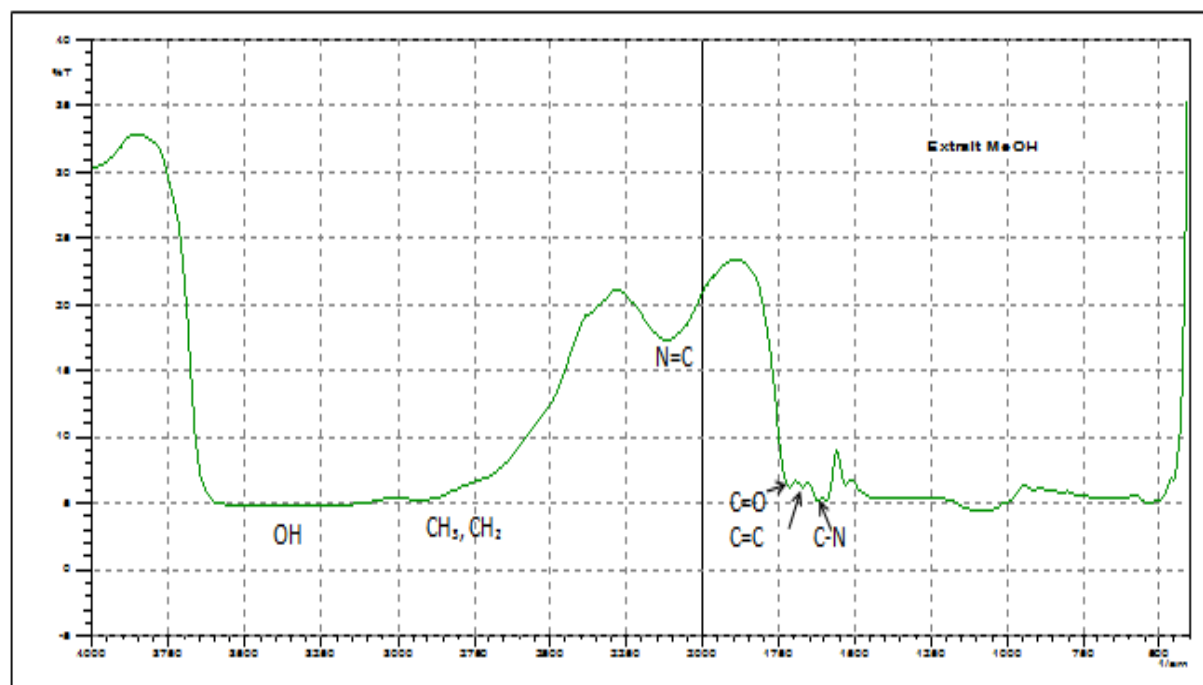


Figure IV.6 : Spectre infrarouge IRFT de l'extrait EP sec dans le KBr.



**Figure IV.7:** Spectre infrarouge IRFT de l'extrait DCM sec dans le KBr

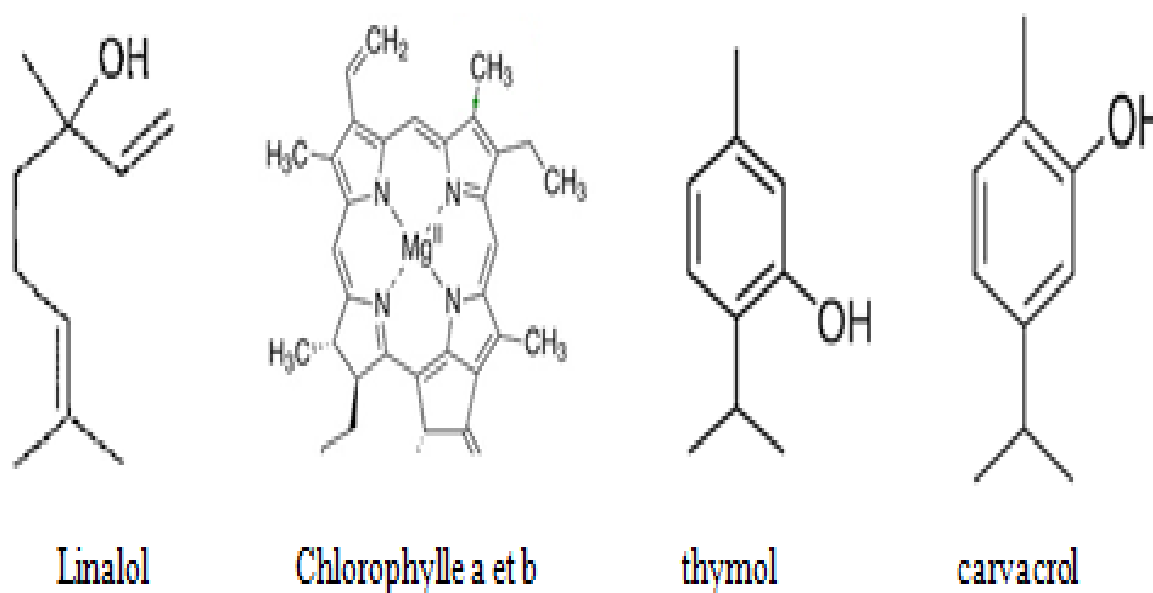


**Figure IV.8 :** Spectre infrarouge IRFT de l'extrait MeOH sec dans le KBr.

Dans le (**tableau IV.6**), nous avons résumé les principales bandes d'absorption IR caractéristiques des liaisons chimiques des composés existant dans les extraits, comparés à celles des standards.

Nous concluons, d'après les résultats des analyses infrarouge, que l'extrait EP est plus riche en huiles essentielles linalol, thymol et carvacrol, avec la présence d'un peu d'acide gallique .

Par contre, l'extrait DCM est plus enrichi par les flavonoïdes comme la quercétine, et d'acide gallique. On note la présence également d'une quantité plus faible de thymol, carvacrol. Contrairement, l'extrait MeOH renferme beaucoup de composés plus lourds et plus polaires tels que les chlorophylles a et b (**Figure IV.9**), ainsi que des tannins galliques de poids moléculaires très élevés et très protiques.



**Figure IV.9:** Structures chimiques du linalol, la chlorophylle a et b, thymol et de carvacrol.

**Tableau IV.6 :** Les principales bandes d'absorption infrarouge identifiées sur les spectres IR des extraits et des standards.

Nombres d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Types de liaisons ou groupement chimique	Types de vibration	Echantillon	Composés
3600-3250 1670 1620-1450 1400-1100 1000 950-600	OH (alcool) C=O cétone C=C aromatique C-O des alcools C-O-C cycle C-H aromatique	Elongation // // // // Déformation dans le plan et hors plan	standard	Quercétine
3500-3250 3200-3000 1700 1620-1400 1350-1000 850-650	OH alcool OH acide C=O acide C=C aromatique C-O alcool C-H aromatique	Elongation // // // // Déformation dans le plan et hors plan	standard	Acide gallique
3600-3250 2950-2850	OH alcool CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub>	Elongation // assymétrique et symétrique	<b>Extrait EP</b>	Thymol, carvacrol, linalol
1750	C=O acide	//		acidegallique
1450-1350 720	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> CH aromatique et CH vinylique	Déformation dans le plan Déformation hors plan		Thymol, Carvacrol, Linalool
3600-3250 2950-2850	OH (alcool) CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub>	Elongation //	<b>Extrait DCM</b>	Thymol, Carvacrol, linalol
1750	C=O acide	//		Acidegallique
1660 1620-1500	C=O cétone C=C aromatique	// //		Quercétine
1450-1350 1250-1000 750-600	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> C-O CH aromatique	Déformation dans le plan Elongation Déformation hors plan		Thymol, Carvacrol
3700-3000 3000-2800 2400-2000	OH très large CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> N=C cycle corinne	Elongation // //	<b>Extrait MeOH</b>	Chlorophylle // //
1720	C=O acide	//		Tannins galliques
1660	Cétone cyclique	//		Flavonone
1600	N-C, C=C aromatique	//		Chlorophylle

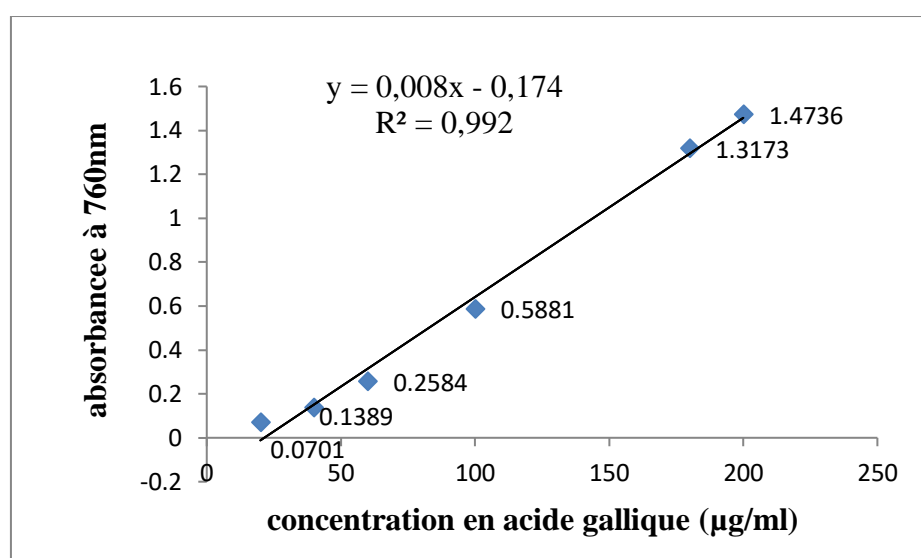


## IV.2.2. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible

### IV.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux extraits sont estimés par dosage avec la méthode de Folin-Cicalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard, les absorbances des solutions étalons sont mesurées à la longueur d'onde de 765 nm (Ribeau-Gayon et al, 1982). Une courbe d'étalonnage a été établie et linéaires avec un coefficient de régression linéaire de l'ordre de  $R^2=0.992$ , à partir des résultats obtenus pour l'acide gallique **figure (IV.10)**, son équation est comme suit :

$$Y=0.008X-0.174$$



**Figure IV.10:** Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

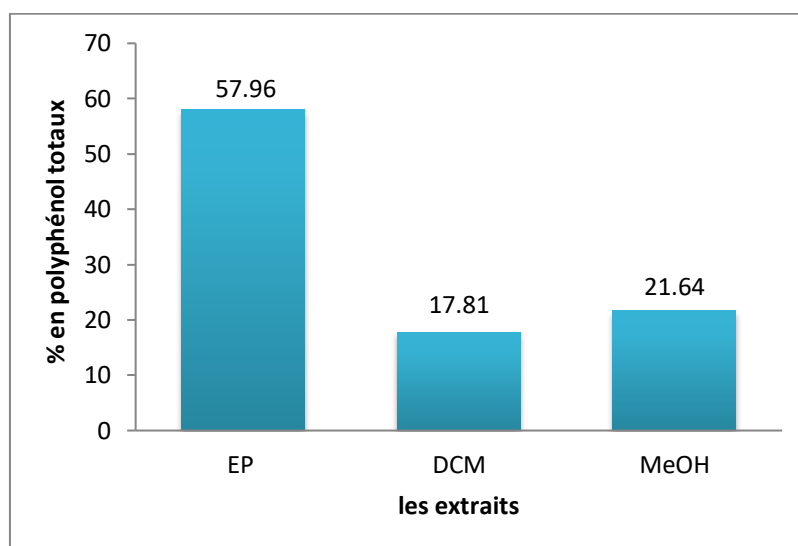
Cette droite d'étalonnage a permis l'évaluation de la quantité en polyphénols totaux dans les feuilles de la plante étudiée, et cette quantité a été rapportée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec.

D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols totaux mais avec des quantités variables d'un extrait à un autre.

**La figure(IV.11)** montre que l'extrait d'éther de pétrole possède la plus haute teneur en polyphénols (**579,59 mg Eq AG/ g Ex Sec**), suivi par l'extrait méthanolique (**233,35 mg Eq AG/ g Ex Sec**) et enfin l'extrait Dichlorométhane (**178, 08 mg Eq AG/ g Ex Sec**).

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs, parmi lesquels la variété de la plante, le climat, la localisation géographique (Ryan et al., 1999), les

différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante ,la température et le solvant d'extraction (Sousa et al., 2008 ; Conde et al., 2009) .



**Figure IV.11:** Histogramme de variation des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits de *Thymus Vulgaris L. officinalis*.

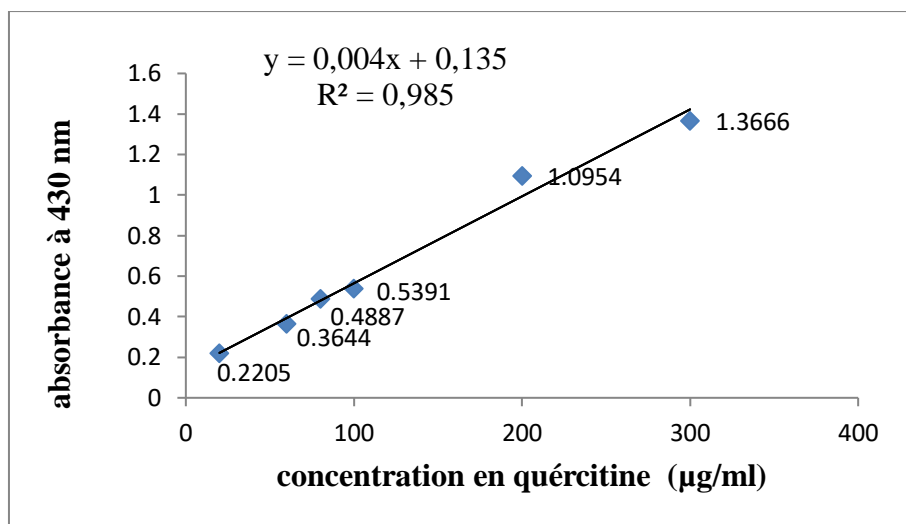
Cependant, le contenu phénolique dans les extraits de la plante dépend également du type de l'extrait, c'est-à-dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires aboutit à une concentration très importante de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction.

#### IV.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de complication par le chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Des solutions de quercétine à différentes concentrations ont été utilisées comme étalons pour réaliser la courbe d'étalonnage. Les absorbances des étalons de quercétine ont été mesurées à la longueur d'onde de 430 nm (Ribeau-gayon, 1986).

La courbe d'étalonnage a été tracée à partir des résultats obtenus pour la quercétine **figure (IV.12)** et exprimée par l'équation suivante :

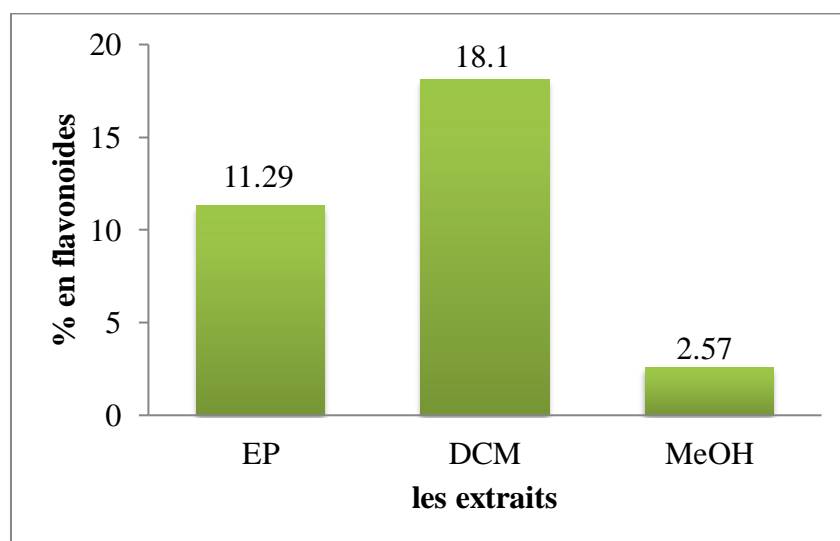
$$Y=0.004X+0.135, \quad R^2=0.985$$



**Figure IV. 12:** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.

Cette droite d'étalonnage a permis l'évaluation de la quantité en flavonoïdes totaux dans les feuilles de la plante étudiée, et cette quantité a été rapportée en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec.

Les résultats obtenus, **figure(IV.13)**, montrent que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait au dichlorométhane est enrichi un maximum de flavonoïdes (**181,01 mg Eq Q / g Ex Sec**), suivi par l'extrait d'éther de pétrole qui renferme des teneurs moins élevées (**112,94 mg Eq Q / g Ex Sec**). Tandis que la plus basse teneur en flavonoïdes a été retrouvée dans l'extrait méthanolique avec seulement **25,66 mg Eq Q / g Ex Sec**.



**Figure IV.13:** Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits de *thymus vulgaris L. officinalis*

On remarque que la concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante, dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits, conformément aux travaux réalisés par **J.G.Marco et al. en 1968**.

### IV.2.3. Activité biologique

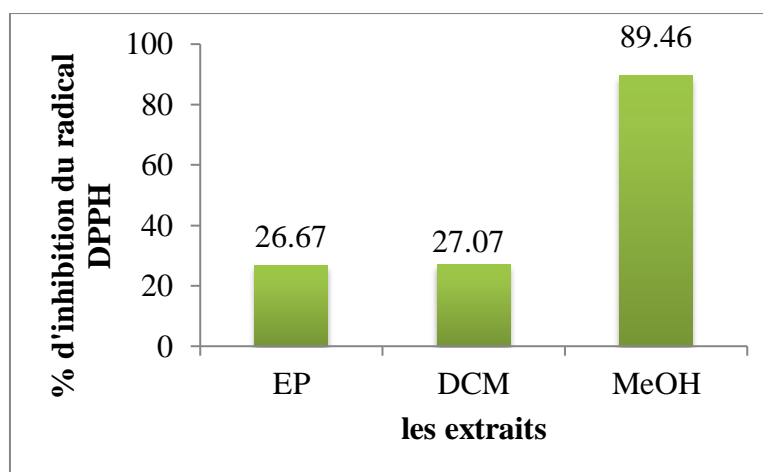
#### IV.2.3.1. Activité antioxydante par la méthode DPPH

L'étude de l'activité anti-oxydante des extraits de feuilles de thym a mis en évidence des pourcentages d'inhibitions plus ou moins importants. Les différents résultats sont résumés dans le **tableau IV.7**.

**Tableau IV.7** : Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH° en fonction des extraits des feuilles de thym.

Extraits	EP	DCM	MeOH
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH %	<b>26,67</b>	<b>27,07</b>	<b>89,46</b>

Les résultats de cette expérience (**Figure IV.14**) révèlent que les extraits de feuilles de la plante étudiée possèdent une activité antioxydante plus importante (**89,46%**) dans l'extrait méthanolique. Celle-ci est attribuée à l'existence d'un composé phénolique dominant, plus particulièrement dans l'extrait méthanolique, où on trouve pratiquement que des polyphénols, qui sont mieux extraits par ce solvant très polaire et protique. Par contre, dans les autres solvants moins polaires et aprotiques (Dichlorométhane, éther de pétrole), l'activité anti-oxydante diminue nettement (**27.07%et 26,67 %**), du fait que pour ces extraits ils existent d'autres molécules bioactives autres que les polyphénols, comme les huiles essentielles et certains flavonoïdes, qui sont majoritaires comparés aux polyphénols.



**Figure IV.14:** Histogramme de l'activité anti-oxydante et pouvoir d'inhibition des extraits de *Thymus Vulgaris L. Officinalis*.

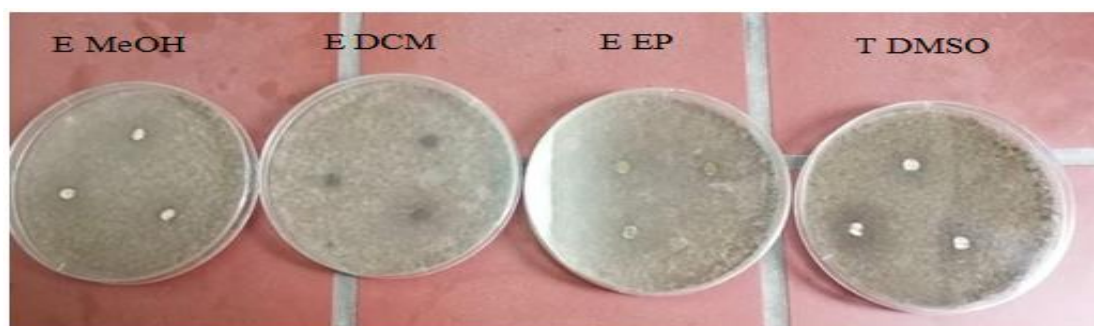
#### IV.2.3.2. Activité antifongique

##### a-Méthode de diffusion à partir d'un disque de papier Wattman

###### ➤ Pour l'*Aspergillus Niger*

Aucune zone d'inhibition n'a été constatée autour des disques imprégnés des différents extraits (EP, DCM, MeOH). Cela est peut être expliqué par la nature de l'extrait, la variété de la plante, des protocoles d'extraction et par la région où a été effectuée la récolte, qui influencent d'une manière significative les activités biologiques des extraits. Ou bien la souche est très puissante.

A la lumière de ces résultats ont dit que les extraits sont très dilués comparés aux souches antifongiques utilisées (**Figure IV.15**).



**T DMSO** : témoin Diméthylsulfoxyde, **E EP** : extrait éther de pétrole


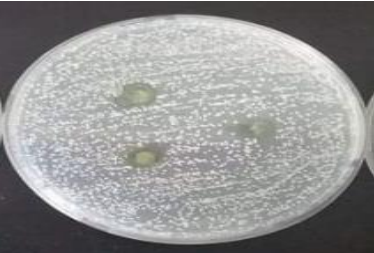

**EDCM** : extrait Dichlorométhane, **EMeOH** : extrait méthanolique.

**Figure IV.15:** L'activité antifongique des extraits de *thymus vulgaris L. officinalis* sur l'*Aspergillus Niger* avec la méthode de diffusion sur disques.

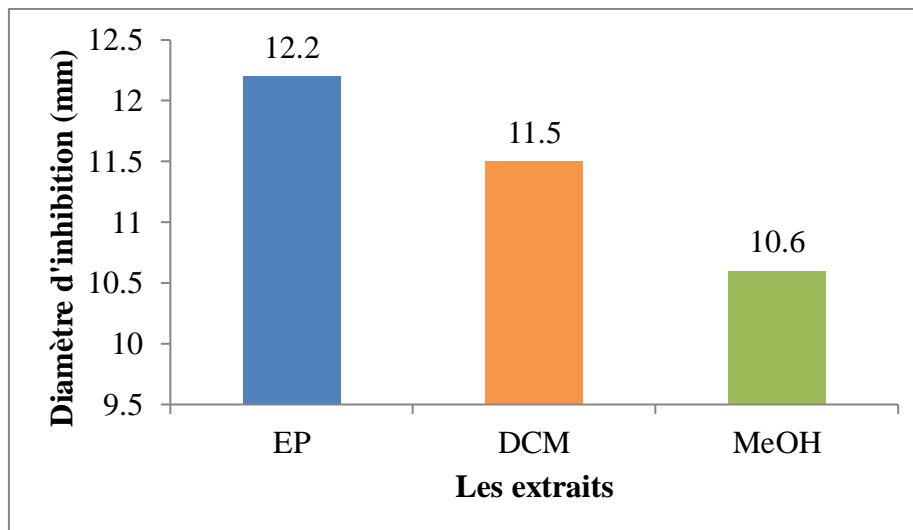
➤ *Pour la levure candida albicans*

Les résultats du test montrent la sensibilité fongique des trois extraits de la plante étudiée sont représentés dans le **tableau IV.8** (Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois mesures):

**Tableau IV.8** : Activité antifongique des extraits de *Thymus Vulgaris L. Officinalis* sur la levure Candida Albicans.

Les extraits	Moyenne des zones d'inhibition (disques) Ø (mm)	Observation
EP	D1=12.2± 1,52	
DCM	D2=11.5±3,04	
MeOH	D3=10.6±0,76	

Un histogramme comparatif de l'efficacité antifongique des métabolites contenus dans les extraits de la plante étudiée, par rapport à la souche fongique (*Candida Albicans*) testée est illustré sur la (figure IV.16).



**Figure IV.16:** Les diamètres des zones d'inhibition de la souche fongique *Candida Albicans*.

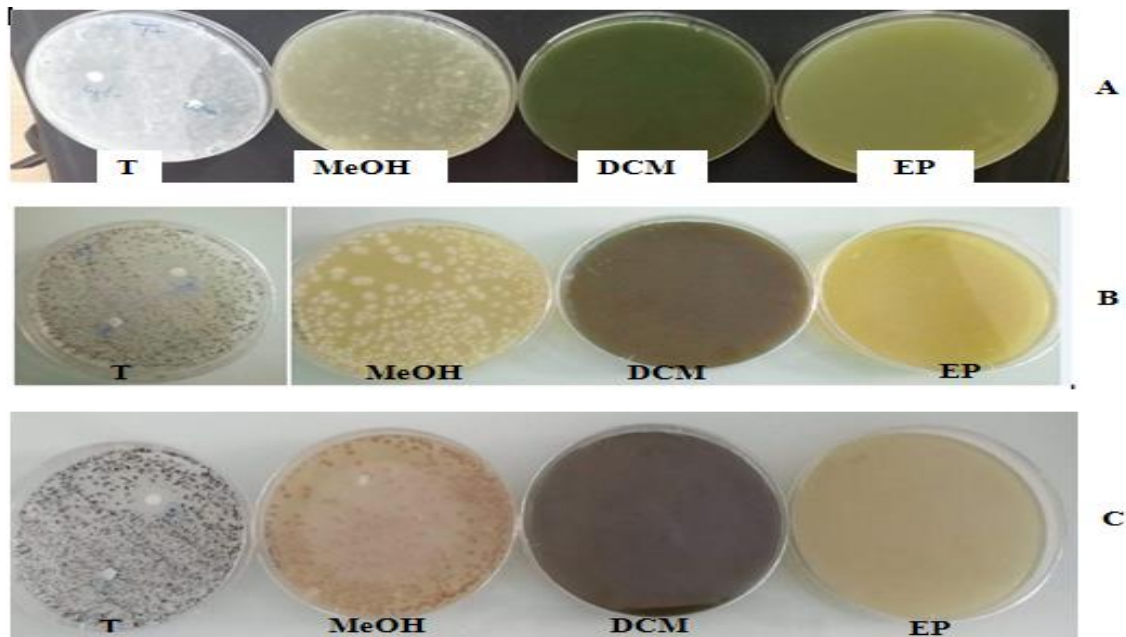
D'après les résultats obtenus, il apparaît que les extraits du thymus présentent une activité antifongique très puissantes sur la levure (*Candida Albicans*). Il est évident que la levure est plus sensible aux extraits (EP et DCM), par rapport à l'extrait (MeOH). Ceci peut être expliqué par le fait que l'extrait (EP) qui inhibe davantage la prolifération, contient beaucoup plus des composés phénoliques de type huiles essentielles comme, le linalol, le thymol et le carvacrol qui ont un effet positif sur les *candidas albicans*, tandis que l'extrait au DCM est plus riche en flavonoïdes et en chlorophylles pourraient compromette ce même effet.

#### **b- Autre méthode**

Cette méthode est réalisée on mélangeant la gélose extrait de malt avec les solutions des extraits, puis ceux-ci sontensemencés par la souche *Aspergillus Niger*. Les boîtes sont ensuite incubées à 25 °C pendant 6 jours.

Après 2 jours d'incubation, on remarque l'apparition des spores dans l'extrait MeOH (**photos A de l'extrait MeOH de la figure IV.17**). Contrairement aux extraits EP et DCM, où on note l'absence totale de spores (**photos A des extraits EP et DCM de la figure IV.17**). Donc, on peut conclure, qu'au bout de 2 jours d'incubation, ces extraits développent une activité antifongique vis-à-vis de l'*Aspergillus Niger*, en inhibant l'apparition des spores.

Au cours du 3<sup>ème</sup> jour d'incubation, les spores continuent à mieux proliférer dans l'extrait MeOH ainsi qu'au 6<sup>ème</sup> jour, où les spores de la souche *Aspergillus Niger* ont atteint un niveau de développement considérable (**photos B et C de l'extrait MeOH de la figure IV.17**). A l'opposé de l'extrait EP qui ne développe aucune souche antifongique de la même espèce (**photos EP, B et C**), alors que quelques souches commencent à apparaître dans l'extrait de DCM (**photo DCM, C**).



**T** : témoin, **MeOH** : extrait méthanolique, **DCM** : extrait Dichlorométhane,  
**EP** : extrait éther de pétrole

**A-** Observation des boîtes au cours de 2<sup>ème</sup> jour ;

**B-** Observation des boîtes au cours 3<sup>ème</sup> jour ;

**C-** Observation des boîtes au cours de 6<sup>ème</sup> jour.

**Figure IV.17:** Photos des boîtes de pétri d'extrait de maltensemencées par la souche antifongique d'*Aspergillus Niger*, contenant les différents extraits de thymus.

Les résultats obtenus montrent que l'*Aspergillus Niger* est plus sensible aux extraits EP et DCM de thymus vulgaris L, en revanche aucune activité n'a été observée avec l'extrait polaire MeOH. Ce qui met en évidence l'existence de molécules bioactives, qui ont une propriété fongicide vis-à-vis de la souche *Aspergillus Niger*, attribuée surtout au Thymol et au carvacrol et aussi à certains flavonoïdes comme la catéchine ou la quercétine.



# *Conclusion*

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en industrie pharmaceutique a suscité un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Elles représentent d'une part une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs, et d'autre part un besoin incessant pour la recherche d'une meilleure médication, par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les produits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles, aux quels on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes, des virus et des pouvoirs antioxydants contre le stress oxydatif des radicaux libres souvent cancérogènes.

Dans le présent travail, on s'est intéressé aux effets antifongiques et antioxydants des extraits bruts (EP, DCM et MeOH) de feuilles de *thymus vulgaris L. officinalis*, plante largement utilisés en médecine traditionnelles à travers le monde.

- La détermination des rendements en extraits bruts a montré une rentabilité importante en extraits apolaires (EP et DCM) 58.76%,57.49% respectivement, alors qu'elle s'affaiblit en passant à l'extrait polaire (MeOH).Ce dernier possède le plus faible rendement avec 13.61 %, qui dépend de la polarité des solvants utilisés lors de l'extraction.
- La présence des polyphénols et des flavonoïdes dans nos extraits est mise en évidence par des essais de caractérisation, qui ont été identifiés par CCM, HPLC et IFRT.

Ces techniques d'analyse ont permis l'identification de trois composés phénoliques et la présence des huiles essentiels dans les feuilles de *Thymus vulgaris*, à savoir : l'Acide gallique, la quercétine, la catéchine, le thymol et le carvarcrol, qui caractérisent le plus cette variété de plante.

- L'activité antioxydante in vitro est étudiée avec la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl-hydrasyl (DPPH).L'extrait polaire (MeOH) possède une capacité de neutralisation du radical libre DPPH plus puissante, puisque il contient des composés phénoliques dominant qui sont les polyphénols de poids moléculaires plus élevés. Par contre dans les autres extraits (DCP, EP), l'activité antioxydante diminue, puisque ces extraits contiennent d'autres molécules, comme les flavonoïdes et les huiles essentielles, qui présentent d'autres propriétés qui risquent de masquer celle-ci.

- Les extraits bruts du *thymus vulgaris L officinalis* ont été testés aussi in vitro pour déterminer leur pouvoir inhibiteur, contre un champignon (*Aspergillus Niger*) et une levure (*Candida Albicans*), par deux méthodes : la méthode de diffusion à partir d'un disque solide et l'autre en mélangeant l'extrait avec le milieu de culture.

Dans la première méthode, les extraits (EP), (DCM) et (MeOH) de *Thymus Vulgaris L. Officinalis*, n'avaient manifesté aucune activité antifongique vis-à-vis de la souche *Aspergillus Niger*. Ceci est expliqué par le fait que les extraits diffusent mal dans le disque et le milieu et aussi ils sont moins concentrés, la souche est très puissante.

Par contre, malgré leur forte dilution les trois extraits ont développé une activité antifongique assez importante à l'égard des levures *Candida Albicans*. Les diamètres des zones d'inhibition sont de l'ordre de 12.2, 11.5 et 10.6 mm respectivement pour les extraits (EP), (DCM) et (MeOH).

Pour la deuxième méthode, les résultats ont montré que seuls les deux extraits (EP) et (DCM) ont développé une activité anti-fongique considérable vis-à-vis de l'*Aspergillus Niger*. La plus importante est celle de l'extrait (EP), qui ne permet aucune prolifération de la souche jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour d'incubation. Par contre aucune activité n'a été observée avec l'extrait polaire MeOH, due probablement aux faibles teneurs en certains principes actifs (huiles essentielles) comme le thymol et le carvacrol, ainsi qu'en quercétine ou catéchine (analyses CCM, HPLC et IRTF).

Ces résultats sont en corrélation avec les teneurs en polyphénols (EP) et en flavonoïdes (DCM) respectivement plus élevés dans ces extraits. Par contre, l'extrait (MeOH) ne développe aucune activité anti-fongique. Ceci dû à l'existence de certains composés polyphénoliques (chlorophylle a et b) de poids moléculaires et de concentrations plus élevés dans cet extrait, ce qui empêche l'inhibition des souches d'*Aspergillus Niger*, par le thymol et le carvacrol ainsi que les flavonoïdes comme la quercétine.

On peut conclure, que ce travail a permis d'extraire de la plante de *Thymus* des principes actifs cibles (thymol, carvacrol, catéchine, quercétine) et de cerner certaines de leurs principales activités biologiques, comme antioxydante et anti-fongique.

## Perspectives

D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois administrée à l'organisme ; Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus précise sur l'activité anti-oxydante et antifongique des extraits testés.
- Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes physico-chimiques plus spécifiques.
- Evaluer les activités anti-oxydante et antifongique des composés phénoliques des autres parties de cette espèce (tiges, racines et fleurs) et sur d'autres souches de microorganismes.
- Tester d'autres activités biologiques des différents extraits tels que l'activité antivirale.

*Références  
bibliographiques*

A

- **Alam, Z.I., Jenner, A., Daniel, S.E., Lees, A.J., Cairns, N., Marsden, C.D., Jenner, P. & Al-Bayati, F. A. (2008).** Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology.*, 166 (3) : 403-406.
- **Aldridge, R.E., Chan, T., Van Dalen, C.J., Senthilmohan, R., Winn, M., Venge, P.,Town, G.I. & Kettle, A.J. (2002).** Eosinophil peroxidase produces hypobromous acid in the airways of stable asthmatics. *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 847–856.
- **Amarowicz, R., Troszynska, A., Shahidi, F. (2005).** Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J food lipids.* **12**: 344-358.
- **Amiot, J. (2005).** *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- **Atawodi S. E. (2005).** Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.* , Vol.4 (2); pp 128-133.
- **Atkin, MA., Gasper, A, Ullegaddi R, et al. (2005).** — Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 51, 2138-2144.

B

- **Bagetta, G., L.A. Morrone, L. Rombolà, D., Amantea, R., Russo and e.a. L. Berliocchi. (2010).** Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, 81: 453-461
- **Bakkali, F, Averbeck, S., Averbeck, D. (2008).** Review MI-Biological effects of essential oils-A review *Food and Chemical Toxicology*; Vol; 46; pp 446-475..
- **Barboni, T. (2006).** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie, Thèse de doctorat, Université de Corse, pp.21.
- **Bazytko, A., et Strzelecka, H. (2007).** A HPTLC densitometry determination of lutéoline in *Thymus vulgaris* and its extracts. *Fitoterapia.*, 78 : 391-395.
- **Beecher, G. R. (2003).** Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 133 (10), 3248S-3254S.
- **Benguerba, A. (2008).** - Etude Phytochimique et de la Phase Butanolique de L'espece *Inula crithmoides L.* Thèse de magister, Univ. Mentouri, Constantine, 25P.

- **Ben Arfa, A., S. Combes, L., Preziosi-Belloy, N., Gontard and Chalier, P. (2006).** Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 149-154.
- **Biallo, D., Sanogo, R., Yasambou , H., et al. (2004).** Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus Mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). *C. R. Chimie.* 7 : 1073-1080.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79 – 82.
- **Boudiaf, K. (2006).** Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister .Setif.
- **Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2012).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*,(9), 14 – 19.
- **Bouhdid, S., Idaomar, M., Zhiri, A.; Bouhdid, D., Skali, N. S., Abrini, J. (2006).** Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies*, Agadir. 324-327.
- **Brand-williams., cuvelier, M.E., et Breset,C.(1995).**Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.*Journal of LWT-Food science and technology* ,28,25-30.
- **Braithwaite, A., Smith, F.J. (1999).** *Chromatographic Methods*. 5ème Ed Kluwer Academic Publishers.London. 548 p.
- **Bruneton, J. (1999).** *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales*. 3 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p

## C

- **Casciola-Rosen, L., Wigley, F., & Rosen, A. (1997).** Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J. Exp. Med.*, 185, 71–79
- **Chassaing, V. (2006).** *L'Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval*; Ed: VIOLAINE CHASSAING ; pp: 4- 8.
- **Chemat, F. (2014).** Éco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs. *Coll. Technique et ingénierie*, Paris, 336 p.
- **Clarke, S. (2008).** *Essential oils*; Ed 2: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; pp: 42- 77

- **Clémence Rosine., Dongmo Momo. (2009).** Clinique et pharmacologie Evaluation de l'activité antidermatophytique des l'extraits au methanol et fraction d'acalyphamanniana (euphorbiacées) et tristemma hirtum (mélastomatacées). Université de Dschang- Master en biochimie. P34.
- **Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro., E. & Dominguez, H. (2009).**Antioxidantactivity of the phenolic compoundsreleased by hydrothermal treatments of olive treepruning. Food Chemistry, **114** (3), 806 – 812
- **.Couplan, F.(2000).** Dictionnaire d'étymologie de botanique : Comprendre facilement tous les noms scientifiques. Edition Lausanne : Delachaux et Nestlé, Paris, 238p.
- **Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev, 12(4), 564-
- **Coyle, P., Philcox, JC., Carey, LC., Rofe, AM. (2002).** Metallothionein: the multipurpose protein. Cell Mol Life Sci; 59:627–47.

. D

- **Daels-rakotoarison, D. (1999).** Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 172 (64).
- **De Vincenzi, M., Stamatii, A., Vincenzi, A.D., and Silano, M. (2004).** Constituents of aromatic plants: Carvacrol. Fitoterapia, 75: 801-804.
- **Defraigne, J-O. (2005).** Un mécanisme physiopathologique central à l'origine des complications du diabète, Rev Med Liege, 60, 472-478.
- **Defraigne, J.O., Pincemail, J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités.10-19.
- **Dizdaroglu, M. (1992).** Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. Mutat. Res.,275, 331–342.
- **Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. (2002).** Free radical-induceddamage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic. Biol. Med., 32, 1102–1115.
- **Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem. **97**: 654-660.



- **Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C. (2006).** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*- Journal of pharmaceutical biology (Pharm. Bio.); Vol.44; N°8; pp 607-612.

### E

- **Eberhard, T., Robert, A., Annelise, I. (2005).** Plantes aromatiques p 475-480.
- **Elisabetsky, E., Coelho de Souza, G.P., Dos Santos, M.A.C., Siqueira, I.R., and T.A. Amador, T.A. (1995).** Sedative properties of linalool. *Fitoterapia*, 66(5): 407-414.
- **Elqaj, M., Ahami, A., et Belghyti, D. (2007).** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- **Enomoto, S., Asano, R., Iwahori, Y., Narui, T., and Okada, Y. (2001).** Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *nigella sativa* l. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 24(3): 307-310.
- **Essawi, T., Sour, M. (2000).** Screening of some. Platinian medical plants for anti bacterial activity. *J Ethnopharm* 70; 344-9.

### F

- **Fadi, Z. (2011)** .The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal *rosmarinus officinalis*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed VRABAT. 45p
- **Farnsworth, N., Akerele, R., Bingel, O., A. Soejarto, D. D., ET Guo, Z. (1986).** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé* 64(2): 159-164.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*, pp 108-115.
- **Flora, SJS. (2009).** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxi Med Cel Long*. Vol.2: (4); pp 191 – 206.
- **Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., Leverage, X. (2002).** Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique.

- **Fraga, C. J., & Oteiza, P. I. (2011).** Dietary flavonoides: Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, **51**, 813–823p.
- **Friguet, B., Bulteau, AL., Chondrogianni, N., et al. (2000).** Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann NY Acad Sci USA* ; 908 : 143-54.
- **Fuerst, F. (1976).** *Microbiologie Clinique. Ed HRW Québec. 507 p.*

## G

- **Gardès-Albert, M., Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh., Abedinzadeh, Z., et Daniel Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l’oxygène: Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ? *L’actualité chimique*. pp: 91-96.
- **Gaut, J.P., Byun, J., Tran, H.D. & Heinecke, J.W. (2002a).** Artifact-free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 300, 252–259.
- **Gaut, J.P., Byun, J., Tran, H.D., Lauber, W.M., Carroll, J.A., Hotchkiss, R.S., Belaouaj, A., & Heinecke, J.W. (2002b).** Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J. Clin. Invest.* 109, 1311–1319.
- **Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V.** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* **2003**, Vol. 5 (2): pp 5.
- **Gerschman, R., Gilbert, DL., Nye, SW., et al. (1954).** Oxygen poisoning and X – irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119, 623-626. 2.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, Vol 3(4) ; pp 162-169.
- **Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., and Offen, D. (2001).** Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40: 959-975.
- **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2006)** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **41**: 1220-1234.

- **Goode, HF., Webster, NR. (1993).** Free radicals and antioxidants in sepsis. Crit Care Med; 2 :1770-6.
- **Greenacre, S.A., & Ischiropoulos, H. (2001).** Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein functions and signal transduction. Free Radic. Res., 34, 541–581.
- **Guillén, M.D., Manzanos, M.J. (1998).** Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris L. plqnt. Food chemistry.* **63** (3): 373-383.
- **Gutteridge, JM. (1993).** Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. Free Radic Res Commun; 19: 141-58.
- **Gwenola. (2011).** Le Naour, Thomas Brugnot, Quand les syndicats deviennent « prestataires » in Les mobilisations sociales à l’heur du précaire. Chabanet Didier, Dufour Pascale, Royall Frédérie (ED), p. 61-80, ISBN 978-0745-2935-9.

## H

- **Hainque, B., bruno, B., et philippe, I. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Ed.Médecine sciences flammariion, Paris, 449p.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, JO., et al. (2007).** Le stress oxydant. Rev Med Liège, 62,628-638.s
- **Halliwell, B. (1978).** Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: the key role of superoxide dismutase. Cell Biol. Int. Rep., 2, 113–128.
- **Halliwell, B. (1994).** Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence Lancet; 344: 721-4.
- **Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1999b).** Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford,U.K.: Oxford University Press.
- **Halliwell, B. (1999b).** Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. Mutat. Res., 443, 37–52.
- **Halliwell, B. (2002).** Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage abiomarker, Free Radic. Biol. Med., 32, 968–974.
- **Halliwell, B, Gutteridge, JMC. (2006).** Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Oxford: Clarendon Press.
- **Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007).** Free Radicals in Biology and Medicine, (3rdéd. pp. 31-98). Oxford: Oxford University Press.

- **Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P.H., Conn, B., Grayer, R., Harley, M.M., Kok, R., Krestovskaja, T., Morales, A., Paton, A.J., Ryding, O., Upson, T., labiatae, In., Kadereit, J.W. (2004).** The families and genera of vascular plants (Kubitzki, K: ed). Volume 7, p 167-275.
- **Harman, D. (1956).** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Geront*, 11, 298-300. 3.
- **Hayflick, L. (1985).** Theories of biological aging. *Exp Gerontol*; 20: 145-59.
- **Hazen, S.L., & Heinecke, J.W. (1997).** 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* 99, 2075–2081.
- **Headlam, H.A., & Davies, M.J. (2003).** Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic. Biol. Med.*, 34, 44–55.
- **Himmelfarb, J., Mcmenamin, M.E., Loseto, G., & Heinecke, J.W. (2001).** Myeloperoxidase-catalyzed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients. *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 1163–1169.
- **Hozawa, A., Jacobs, D., Steffes, M., et al. (2007).** Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/ Young Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. *Clin Chem*, 53, 1-9.
- **Hudaib, M., Speroni, E., Pietra, A. M. D., Carvin, V. (2002).** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 691-700.
- **Hudson, B.I., Wendt, T., Bucciarelli, L.G., et al. (2005).** Diabetic vascular disease : it's all the RAGE. *Antiox Rep Signal*, 7, 1588-1600.

## I

- **Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M., Can Baser, K.H. (2005).** Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/ microsomal test-Food Chemistry; Vol. 93; pp 551-556.
- **Iserin, P., Vican, P. (2001).** Encyclopédie des plantes médicinales/ Identification, préparations, soins. Larousse édition, Paris, 335p.
- **Iserin, P. et al. (2007).** Encyclopédie des plantes médicinales ; Ed 2 : LAROUSSE, pp 1-14.

## J

- **Marco, J.G. (1968).** "A rapid method for evaluation of antioxidants" *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Vol. (45), page : 594.
- **Jiménez-Arellanes, A., Martínez, R., García, R., León-Díaz, R., Aluna-Herrera, J., Molina – Salinas, G., et Saïd-Fernández, S. (2006).** *Thymus vulgaris* as a potential source of anti tuberculosis compounds. *Pharmacology online*. 3 : 569-574.
- **Johnson, D.R., Gu, L.C. (1988).** *In* Autoxidation and Antioxidants, *John Wiley, New York*, pp 433-448.
- **Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. (2002).** Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. De Boeck université, Paris-Bruxelles, 467p.
- **Jukic, M., O. Politeo, M., Maksimovic, M., Milos and Milos, M. (2007).** In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21(3): 259-26.
- **Jurd L. (1962).** The Chemistry of Flavonoid Compounds. Ed. GEISSMAN, T.A, Pergamon Press, Oxford, 107-155.

## K

- **Kabouche, A., Kabouche, Z., Bruneau, C. (2005).** Analysis from the essential oil of thymus numidicus (Poiret) from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 20: 235-236.
- **Kaloustian, J., El-Moselhy, T.F., Portugal H. (2003).** Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* **401**: 7786.
- **Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, MF. (2008).** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne-Phytothérapie ; Vol. 6 ; pp 160-164
- **Kitajima, J., Ishikawa, T., Urabe, A., Satoh, M. (2004).** Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry.* **65**: 3279-3287.
- **Knight, JA. (2001).** The biochemistry of aging. *Adv Clin Res* **2001**; 35: 1-62.
- **Kohen, R., Nyska, A. (2002).** Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol.*

- **Koppenol, WH. (2001).** The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep*; 6:229–34.
- **Kueny-Stotz, M. (2008).** Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur Strasbourg, France.
- **Kulšić, T., Dragovic-Uzelac, V., Miloš, M. (2006).** Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* **44** (4): 485-492.
- **Kuntie, V., Pejie, N., Ivkovic, B., Vugie, Z., Ilie, K., Micie, S., Vukojevic, V. (2007)** Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* **43**: 718-721.

## L

- **Laginika, I. (2005).** Étude photochimique et activité biologique de substances naturelle isolée de béninoise. Thèse de doctorat, Univ. Louis Pasteur, Strasbourg, Bénin, 267 p.
- **Lahlou, M. (2004).** Methods of Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential oils; *Phytotherapy Research* 18; WILEY & SONS; pp: 435- 448.
- **Lee, H.J., et Lee, C. Y. (2003).** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 7292-7295.
- **Lehucher-Michel, MP, Lesgards, JF, Delubac, O., et al. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* Vol. 30; pp 1076 – 1081.
- **Lhuillier, A. (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.
- **Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A., Labokas, J. (2007).** Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes- *Food Chemistry*; Vol. 103; pp 546-559.

## M

- **Mabberley, D, J. (1997).** The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, 858p.
- **Macheix, J-J, Fleuriet, A., Jay- Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; Presses polytechniques et universitaires Romandes
- **Macpherson, J.C., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., Klein, D.F., Lipscomb, M.F., Kavuru, M.S., Samoszuk, M.K. & Hazen, S.L. (2001).** Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J. Immunol.*, 166, 5763–5772.
- **Magder, S. (2006).** Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care*, 10, 208-216.
- **Markowicz Bastos, D.H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I.B.S., Carvalho, P.O., Eberlin, M.N. (2007).** Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. **12**: 423-432.
- **Mc Cord, J.M., Fridovich, I. (1969).** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-6055.
- **Merken, H.M., Beecher, G.R. (2000).** Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatography A*. **897**: 177-184.
- **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J .Sci .Technol*, **26**, 211 – 219.
- **Moon, J.K., & Shibamoto, T. (2009).** Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **57**: 1655–1666.
- **Morales, R.(1997).** Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagasalia*, 19(1- 2), 249-262p.
- **Morales, R. (2002).** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.
- **Moro Buronzo, A. (2008).** Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être; Ed : HACHETTE PRATIQUE; pp 14- 43.



N

- **Naczki, M., and Shahidi F. (2003).** Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press.
- **Naghdi, B.H., Yazdani, D., Mohammed Ali, S., Nazari, F. (2004).** Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme. *Thymus vulgaris* L-Industrial Crops and Products; Vol.19; pp 231-236.
- **Naskalski, JW., and Bartosz, G. (2000).** Oxidative modifications of protein structures. *Adv Clin Chem* ; 35: 161-253.
- **Novelli, GP. (1997).** Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol*; 48: 517-27.

O

- **Oldham, KM., Bowen, PE. (1998).** Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc* ; 98: 1001-8.
- **Özcan, M., et Chalcha, J. C. (2004).** Aroma profile of *Thymus vulgaris* L growing wild in Turkey. *Bulgarian journal of plant physiology*. 30 (3-4) : 68-73.

P

- **Pariente, L. (2001).** Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. *Académie nationale de pharmacie. Paris* 1643 p.
- **Pauli, A., Knobloch, K. (1987).** Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi-Z *Lebensm Unters Forsch* ;Vol.185 ; pp 10-13.
- **Peter, K.V. (2004).** Handbook of herbs and spices. Elsevier, 376p.
- **Pieri, F., Kirkiacharian, S. (1992).** Pharmacologie et Thérapeutique, 2ème édition *Marketing. Paris*. 443 p.
- **Pierron, C. (2014).** Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France: exemples d'applications en gériatrie gériatologie et soins palliatifs, Sthèse de doctorat, 257p.
- **Poletti, A. (1988).** Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed. *Delachaux & Nislé S. A. Suisse*. Pp : 103 et 131.
- **Popovici, C., Saykova, I., & Tylkowskib. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 1– 8.



Q

- **Quezel, P., Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris, 636p.

R

- **Raghavan, S. (2006).** Handbook of spices, seasonings, and flavorings. 2 nd edition, CRC Press, 330p.
- **Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A. (2006).** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*-International Journal of Infectious Diseases; Vol. 10; pp 236-241.
- **Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp.
- **Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P., et Ribereau-Gayon, P. (1982).** Composés phénoliques. « Traité d'œnologie, science et techniques du vin ».Edition : Dound, 477-499.
- **Ribéreau-Gayon, P et Gautheret, R.J. (1986).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition :Dund, Paris, 273p.
- **Rispail, N., Robert, N., and Jodith, K. (2005).** Secondary métabolite profiling. Lotus japonicas, Handbook, 341.348.
- **Rizzo, AM., Berselli, P., Zava, S., et al. (2011).** Endogenous antioxidants and radical scavengers. Adv Exp Med Biol **2011**, Vol. 698; pp 52-67.
- **Ryan, M. T., Muller, H., & Pfanner, N. (1999).** Functionalstaging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J BiolChem* , **274** (29), 20619 – 20627.

S

- **Sahraoui. (2011).** UN1901 Laboratoire de pharmacognosie univ.ency eduation. Com/ uploads/1/3/1/0/13102001/ pharm3an\_pharmacognosie 19-alcaloides.pdf
- **Selmi, S., et Sadok, S. (2008).** The effect of natural antioxidant (*Thymus vulgaris* Linnaeus) on flesh quality of tuna (*Thunnus* Linnaeus) during chilled storage. Pan–American Journal of aquatic sciences, 3 (1): 36-45.
- **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*.**299**: 152-178.

- **Sosa, S., G. Altinier, M., Politi, A., Braca, I., Morelli and Logia, R.D. (2005).** Extracts and constituents of lavandulamultifidawith topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*, 12(4): 271-277.
- **Stalikas, C D. (2007).** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.*J.Sep. Sci.*2007,30,3268-3295
- **Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L., and Zhang, Y. (2011).** E valuation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon ( *Diospyros Kaki L.*) leaves . *Food Chem Toxicol.*49:2689-2696
- **Szentandrassy, N., Szentesi, P., Magyar, J., Nanasi, P.P., and Csernoch, L. (2003).** Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle- *BMC Pharmacology*; Vol.3; pp 9.

### T

- **Tabu,c C . (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines, Thèse de doctorat, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 190p.
- **Teuscher, E., Anton, R., Lobstein, A. (2005).** Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 521p.
- **Thuille, N., Fille, M., Nagl, M. (2003).** Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health.* **206** : 217-221.
- **Touhami, A. (2017).** Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement , Thèse de doctorat , Universitébadjimokhtarannaba , algérie , 173p.

### U

- **Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R.(2002).** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, **68**(4), 1561-1568p.

### V

- **Vermerris, W. (2006).** Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1- 4020-5163-8 (HB).

W

- **Wautier, MP., Massin, P., Guillausseau, PJ., et al. (2003).** N (carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*, 29, 44-52.
- **Williams, C.A., Grayer, R.J. (2004).** Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, Vol. 21(4); pp 539-573.
- **Wilson, R. (2002).** *Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty.* Penguin edition, 340p.
- **Winterbourn, C.C., & Kettle, A.J. (2000).** Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 403–409.
- **Wiseman, H., & Halliwell, B. (1996).** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313, 17–29.
- **Wu, W., Chen, Y., D'avignon, A. & Hazen, S.L. (1999).** 3Bromotyrosine and 3,5-dibromotyrosine are major products of protein oxidation by eosinophil peroxidase: potential markers for eosinophil-dependent tissue injury in vivo. *Biochemistry*, 38, 3538– 3548.
- **Wu, W., Samoszuk, M.K., Comhair, S.A., Thomassen, M.J., Farver, C.F., Dweik, R.A., Kavuru, M.S., Erzurum, S.C., & Hazen, S.L. (2000).** Eosinophils generate brominating oxidants in allergen- induced asthma. *J. Clin. Invest.* 105, 1455–1463.

## 1. Matériels et réactifs utilisés

### 1.1 : Réactifs et verreries de la partie physico-chimique

verrerie	Réactifs
- Eprouvettes graduée, pipette graduée, Erlenmeyer, Fioles jaugées, Béchers ; - Plaque de silice, Cuve à CCM, micropipette, un ballon, réfrigérant ; Verres de montre, Entonnoirs, spatules, barreau magnétique, pissette ; tubes à essais ; Broyeur à anneaux ; - Balance analytique ; - Agitateur magnétique ; - Chambre noire à UV ; - Spectrophotomètre UV-visible ; - Chauffe ballon, pompe à vide ;	- Eau distillée ; - Ether de pétrole (EP) ; - Dichlorométhane (DCM) ; - Méthanol (MeOH) ; - Ethanol (EtOH) ; - Acétate d'éthyle - Acide acétique - Acide sulfurique - Standards (acide gallique, quercétine) ; - FolinCiucalteu - DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) ; - Chlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> ) ; - Carbonate de sodium (NaCO <sub>3</sub> ). - Vanilline - HCl - NaOH

### 1.2 : Matériels et réactifs de la partie microbiologique

- Bain marie ; micropipette ;
- Boites pétri, écouvillon ; Pince ;
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) ;
- Gélose PDA ;
- Gélose extrait de malt ;

## 2. Préparation des solutions :

### 2.1 caractérisation par CCM :

#### ➤ préparation de premier éluant :

- Éther de pétrole.....8ml
- Acétate d'éthyle.....2ml

➤ **Préparation de deuxième éluant :**

- n-butanol.....6ml
- acide acétique.....1.5ml
- eau distiller.....2.5ml

➤ **Préparation de révélatrice vanilline :**

- vanilline.....0.5g
- éthanol.....50ml
- acide sulfurique(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).....1ml

➤ **préparation des standards :**

<b>solution</b>	<b>préparation</b>
Acide gallique	Une petite quantité d'acide gallique dissout dans 5ml de méthanol
quercétine	Une petite quantité de quercétine dissout dans 5ml de méthanol

## 2.2 caractérisation par HPLC :

➤ **Préparation de la phase mobile:**

- Eau distillé.....500ml
- Méthanol.....470ml
- Acide acétique.....25ml

➤ **Préparation de l'étalon (V<sub>T</sub>=1.5ml) :**

- Acide gallique .....0.4ml
- Quercétine..... 0.4ml
- Méthanol.....0.7ml

➤ **Préparation des extraits (V<sub>T</sub>=1.5ml) :**

- Méthanol .....1,1ml
- Extraits (EP, DCM, MeOH).....0.4ml

### 3. Dosage des composés phénoliques :

**Tableau 1: préparation des solutions pour le dosage des polyphénols totaux**

solutions	Préparation des solutions
Folin-Ciocalteu (1 /10)	1ml de folin-Ciocalteu dilué dans 9ml
Solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	18 ,75g de ( $\text{Na}_2\text{CO}_2$ )sont dissouts dans 250 ml d'eau distillée
Acide gallique à 2mg/ml	20mg d'acide gallique dissout dans 10 ml d'eau distillée

**Tableau 2 : préparation des solutions pour le dosage des flavonoïdes**

solutions	Préparation des solutions
Solution de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) à 2%	2g de ( $\text{AlCl}_3$ ) dissouts dans100 ml de méthanol
Quercétine a 2mg	15 mg de quercétine dissouts dans 7,5 ml de méthanol

### 4. Activité antioxydant :

**Tableau 3 : Préparation de la solution 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

solutions	Préparation des solutions
DPPH ( $6.10^{-4}\text{M}$ )	1.8 mg sont dissouts dans 50 ml de méthanol.

## Résumé

Notre travail a porté sur l'étude des extraits bruts de feuilles de la plante aromatique *Thymus vulgaris* (Lamiacée). L'analyse de ces extraits a révélée la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols totaux, flavonoïdes, huiles essentielles) susceptibles d'exprimer les activités recherchées et leurs teneurs ont été déterminées par des méthodes spectrophotométriques.

Les extraits ont été également soumis à un ciblage pour leur activité antifongique possible *in vitro*, contre les souches fongiques *Aspergillus Niger* et *Candida Albicans* (levure), en employant la méthode de diffusion d'un disque solide et une autre en mélangeant l'extrait et le milieu de culture. Dans la première méthode, les extraits (EP), (DCM) et (MeOH) de *Thymus Vulgaris L. Officinalis*, n'avaient manifesté aucune activité antifongique vis-à-vis de la souche *Aspergillus*. Par contre, les trois extraits ont développé une activité antifongique assez importante vis-à-vis à la levure *Candida Albicans*. Pour la deuxième méthode, les résultats ont montré que seuls les deux extraits (EP) et (DCM) ont développé une activité antifongique considérable vis-à-vis de l'*Aspergillus Niger*. Par contre aucune activité n'a été observée avec l'extrait polaire MeOH. L'activité antioxydante *in vitro* a été étudiée avec la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphényl-2-picryl-hydrasyl (DPPH). Les résultats obtenus ont montré que les extraits peuvent agir en tant que piègeurs de radicaux. L'extrait polaire (MeOH) possède une capacité de neutralisation du radical libre (DPPH) plus puissante par rapport aux extraits apolaires (DCM et EP) de *Thymus vulgaris L officinalis*.

**Mots clés :** thymus, extraction, principes actifs, activité antioxydante, activité antifongique, huiles essentielles.

## Abstract

Our work focused on the study of crude extracts from the leaves of the aromatic plant *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). Analysis of these extracts revealed the presence of a few chemical groups (total polyphenols, flavonoids, essential oils) capable of expressing the desired activities and their contents were determined by spectrophotometric methods. The extracts were also subjected to targeting for their possible antifungal activity *in vitro*, against the fungal strains *Aspergillus Niger* and *Candida Albicans* (yeast), employing the method of diffusion of a solid disc and another by mixing the extract and the culture medium. In the first method, the extracts (EP), (DCM) and (MeOH) of *Thymus Vulgaris L. Officinalis*, showed no antifungal activity against the *Aspergillus* strain. On the other hand, the three extracts developed a fairly significant antifungal activity against the yeast *Candida Albicans*. For the second method, the results showed that only the two extracts (EP) and (DCM) developed considerable anti-fungal activity against *Aspergillus Niger*. On the other hand, no activity was observed with the polar extract MeOH. Antioxidant activity *in vitro* was studied with the free radical reduction method 1,1-diphényl-2-picryl-hydrasyl (DPPH). The results obtained showed that the extracts can act as radical scavengers. The polar extract (MeOH) has a more potent free radical neutralization capacity (DPPH) compared to the nonpolar extracts (DCM and EP) of *Thymus vulgaris L officinalis*.

**Keywords:** thymus, extraction, active ingredients, antioxidant activity, antifungal activity, essential oils.

## المخلص

ركز عملنا على دراسة المستخلصات الخام من أوراق النبات العطري *Thymus vulgaris* (Lamiaceae). أظهر تحليل هذه المستخلصات وجود عدد قليل من المجموعات الكيميائية (البوليفينول الكلي، الفلافونويد، الزيوت العطرية) القادرة على التعبير عن الأنشطة المرغوبة وتم تحديد محتوياتها بالطرق الطيفية. كما خضعت المستخلصات لاستهداف نشاطها المضاد للفطريات في المختبر ضد السلالات الفطرية *Aspergillus Niger* و *Candida Albicans* (الخميرة)، باستخدام طريقة نشر قرص صلب وآخر عن طريق خلط المستخلص ووسط الاستزراع. في الطريقة الأولى، لم تظهر مستخلصات (EP) و (DCM) و (MeOH) من *Thymus Vulgaris L. Officinalis* أي نشاط مضاد للفطريات ضد سلالة الرشاشيات. خميرة المبيضات البيض. بالنسبة للطريقة الثانية، أظهرت النتائج أن المستخلصين فقط (EP) و (DCM) طوروا نشاطًا كبيرًا مضادًا للفطريات ضد *Aspergillus Niger*. من ناحية أخرى، لم يلاحظ أي نشاط مع المستخلص القطبي MeOH. تمت دراسة نشاط مضادات الأكسدة في المختبر باستخدام طريقة تقليل الجذور الحرة 1،1-diphényl-2-picryl-hydrasyl (DPPH). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلصات يمكن أن تعمل كقمامة جذرية. يحتوي المستخلص القطبي (MeOH) على قدرة تحييد الجذور الحرة الأكثر فاعلية (DPPH) مقارنة بالمستخلصات غير القطبية (DCM و EP) من *Thymus vulgaris L officinalis*.

الكلمات الدالة: الغدة الصعترية، استخلاص، مكونات نشطة، النشاط المضاد للأكسدة، نشاط مضاد للفطريات، الزيوت الأساسية.