

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri Constantine
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie végétale et écologie

N° d'ordre:

N° de série :

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale)
Option : Biotechnologie végétale

Thème

**Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales
d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et
évaluation de leur activité antibactérienne**

Présenté par : Zeghad Nadia

Devant le jury :

Président : Mr Benlaribi M.

Prof. Univ. Constantine

Rapporteur : Mr Merghem R.

Prof. Univ. Constantine

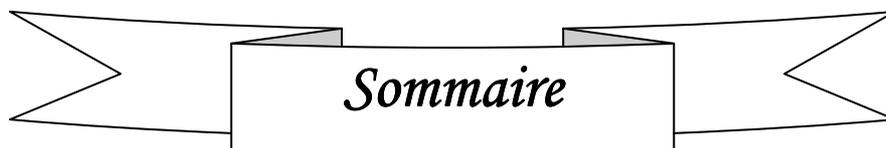
Examineur : Mr Arhab R.

M. C. Univ. Tebessa

Examineur : Mr Belkhiri A. M.

M. C. Univ. Constantine

Année universitaire : 2008 / 2009



Introduction

1^{ère} partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : La phytothérapie et les plantes

I-1 / Définition de la Phytothérapie.....	2
I-2 / Différents types de la Phytothérapie.....	2
I-3 / Les avantages de la phytothérapie.....	3
I-4 / Les plantes médicinales	4
I-5 / Le pouvoir des plantes.....	4
I-6 / Efficacité des plantes entières	4
I-7 / Les plantes médicinales sélectionnées.....	5
I-7-1 / <i>Thymus vulgaris</i>	5
I-7-2 / <i>Rosmarinus officinalis</i>	8

Chapitre II : Les composés phénoliques

II-1 / Généralités	11
II-2 / biosynthèse des composés phénoliques.....	12
II-2-1 / La voie de shikimate.....	12
II-2-2 / La voie de phénylpropanoïde.....	13
II-2-3 / La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	14
II-3 / Principales classes des composés phénoliques.....	15
II-3-1 / Les acides phénoliques simples.....	15
II-3-2 / Les flavonoïdes.....	17
II-3-2-1 / Généralités.....	17
II-3-2-2 / Structure.....	17
II-3-2-3 / Classification.....	18
II-3-2-4 / Localisation.....	19

II-3-2-5 / Distribution.....	19
II-3-2-6/ Propriétés des flavonoïdes.....	22
A- Propriétés antiradicalaires.....	22
B- Propriétés chélatrices des ions métalliques.....	24
C- Propriétés antibactériennes.....	25
D- Propriétés anticancéreuses.....	25
E- Propriétés anti inflammatoires.....	27
F- Propriétés antivirales.....	28
G- Propriétés antiallergiques.....	28
H- Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques.....	29
I- Biodisponibilité des flavonoïdes.....	29
J- Autres propriétés des flavonoïdes.....	32

2^{ème} partie : Matériel et méthodes

Chapitre I : Etude phytochimique

I-1 / Matériel végétal.....	33
I-2 / Extraction des flavonoïdes.....	33
I-3 / La chromatographie analytique sur couche mince.....	35
I-4 / Mise en évidence des flavonoïdes.....	39
I-5 / Dosage des composés phénoliques.....	39
I-6 / Dosage des flavonoïdes.....	40
I-7 / Techniques chromatographiques de séparation des flavonoïdes.....	40
I-7-1 / La chromatographie sur colonne.....	40
I-7-2 / La chromatographie sur papier.....	41
I-8 / La spectrophotométrie.....	41
I-8-1 / Définition.....	41
I-8-2 / Principe.....	42
I-8-3 / Spectre UV-Vis des flavonoïdes.....	42
I-8-4 / Etude spectrale des flavonoïdes.....	44

Chapitre II : Etude des activités biologiques

II-1 / Activité antiradicalaire des flavonoïdes.....	46
II-2/ Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes.....	47

3^{ème} partie : Résultats et discussion

Chapitre I : Etude phytochimique

I-1 / Extraction.....	49
I-2 / Chromatographie analytique sur couche mince.....	49
I-3 / Mise en évidence des flavonoïdes.....	54
I-4 / Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes.....	55
I-5 / Les fractions obtenues par les techniques chromatographiques de séparation....	56
I-5-1 / Les flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i>	56
I-5-2 / Les flavonoïdes isolés de <i>Rosmarinus officinalis</i>	57
I-6 / Identification structurale des flavonoïdes isolés.....	58
I-6-1 /Analyse spectrale des flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i>	58
*Molécule 1.....	58
*Molécule 2.....	60
*Molécule3.....	62
*Molécule 4.....	64
*Molécule 5.....	65
*Molécule 6.....	66
I-6-2 / Analyse spectrale des flavonoïdes isolés de <i>Rosmarinus officinalis</i>	67
* Molécule A.....	67
* Molécule B.....	68
* Molécule C.....	69

Chapitre II : Etude des activités biologiques

II-1 / Evaluation du pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i>	72
II-2 / Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i>	77
Conclusion	82
Références bibliographiques	84

Annexes

Introduction

Introduction :

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis*, des labiées très fréquemment employées dans le pourtour méditerranéen.

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de nos plantes en flavonoïdes et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Il porte également sur le diagnostic et la séparation des principaux flavonoïdes par l'utilisation des différentes techniques chromatographiques.

Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante des flavonoïdes vis-à-vis du radical libre DPPH. Un test antibactérien est également réalisé afin de déterminer l'efficacité des produits flavoniques contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp* pouvant être pathogènes pour l'homme.

Chapitre I

La phytothérapie et

Les plantes

Si l'on ne sait pas précisément ce que nos ancêtres mangeaient au début de l'humanité il y'a 5 à 7 millions d'années, il est certain que les plantes faisaient partie de leur alimentation quotidienne. Ils découvraient très tôt dans leur évolution que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies.

Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (Hans, 2007). Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y'a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé (Farnsworth *et al*, 1986). En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales (Millogo *et al*, 2005)

I-1 / Définition de la Phytothérapie :

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces.

I-2 / Différents types de la Phytothérapie :

- **Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- **Gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicelles.
- **Herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des

méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

- **Homéopathie** : a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... (Strang, 2006)

I-3 / Les avantages de la phytothérapie :

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (Iserin *et al*, 2001)

I-4 / 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 propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al*, 1986). Environ 35 000 espèces de 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 de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj *et al*, 2007)

I-5 / Le pouvoir des plantes :

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIII^{ème} siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels.

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Iserin *et al*, 2001)

I-6 / Efficacité des plantes entières :

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives (Iserin *et al*, 2001)

I-7 / Les plantes médicinales sélectionnées :

Les plantes étudiées ont été choisies en fonction de leur emploi très fréquent en Algérie.

I-7-1 / *Thymus vulgaris* (Lamiacées)

I-7-1-1 / Origine du nom : le nom thym proviendrait aussi bien du latin que du grec

Thymus : «parfumer» (latin)

Thumus : «courage» (grec)

I-7-1-2 / Description botanique :

Thymus vulgaris, est un sous arbrisseau, vivace, touffu et très aromatique de 7-30 cm de hauteur, d'un aspect grisâtre ou vert grisâtre. Ses tiges ligneuses à la base, herbacées supérieurement sont presque cylindriques, ces tiges ligneuses et très rameuses sont regroupées en touffe ou en buisson très dense. Ses feuilles sont très petites, ovales, à bord roulés en dessous à nervures latérales distinctes, au pétiole extrêmement court et blanchâtres à leur face inférieure. Ses fleurs sont presque roses ou presque blanches, font de 4 à 6 mm de longueur, sont pédicellées et réunies ordinairement au nombre de trois à l'aisselle des feuilles supérieures. Le limbe du calice est bilabié, un peu bossu. La corolle de taille variable, un peu plus longue que le calice mais la partie tubulaire de la corolle ne dépasse pas celle du calice, les étamines sont incluses. La période de la floraison commence en mai-début de juin (Wikipédia, 2008)



Figure 1 : Photo de *Thymus vulgaris* (Wikipédia, 2008)

I-7-1-3 / Classification :**a / Classification classique :**

Règne : Plantae
S / règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
S / Classe : Asterdae
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae
Genre : *Thymus*
Espèce : *Thymus vulgaris*

b / Classification phylogénétique :

Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae

I-7-1-4 / Distribution géographique :

Le thym est une plante originaire de l'ouest des régions méditerranéennes (Özcan et Chalchat, 2004) et aussi autochtone du sud d'Europe (Takeuchi *et al*, 2004). Plus précisément, le thym commun préfère un sol légèrement acide, bien drainé et rocailleux (calcaire), en plein soleil et au sec, mais la plante se développe également sur un sol alcalin filtrant, léger ou compact (d'argile et de limon) ou très poreux (sableux), un peu humide et frais. La capacité de cette plante à résister à de très forte chaleur provient de son huile essentielle qui est produite la nuit et s'évapore la journée ; c'est par cette action que la chaleur sera consommée.

I-7-1-5 / Propriétés du thym :

- Assaisonnement des aliments et des boissons.
- Antiseptique, désinfectant dermique et un spasmolytique bronchique dont il est indiqué pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures.
- Les principaux constituants du thym montrent des propriétés vermifuges et vermicides (Bazylko et Strzelecka, 2007)
- Propriétés antivirales, antifongiques, anti inflammatoires, et antibactériennes dont une étude récente a montré que les extraits méthanoliques et hexaniques des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose) (Jiminez-Arellanes *et al*, 2006)
- Propriétés anthelminthiques (Al-Bayati, 2008)
- Propriétés antioxydantes (Takeuchi *et al*, 2004 ; Golmakani et Rezaei, 2008) en raison de ces propriétés, le thym est utilisé comme un conservateur afin de prolonger la durée de conservation des poissons *Thunnus thymnus* durant leur stockage (Selmi et Sadok, 2008)

I-7-1-6 / Principes actifs du thym :

- **Les acides phénoliques** : acide caféique (Cowan, 1999), acide rosmarinique (Takeuchi *et al*, 2004)
- **Les flavonoïdes** : hespéridine, eriotrécine, narirutine (Takeuchi *et al*, 2004), lutéoline (Bazylko et Strzelecka, 2007)
- **Les polyphénols** : tanin (Cowan, 1999 ; Özcan et Chalchat, 2004)

I-7-2 / *Rosmarinus officinalis* (Lamiacées)

I-7-2-1 / Origine du nom : le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin

«Ros» : rosée

«Marinus» : marin ou de marin

I-7-2-2 / Description botanique :

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées, peut atteindre jusqu'à 1,5 mètre de hauteur, il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tetrakène (de couleur brune) (Wikipédia, 2008)



Figure 2: Photo de *Rosmarinus officinalis* (Wikipédia, 2008)

I-7-2-3 / Classification :

a / Classification classique :

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

b / Classification phylogénétique :

Ordre : Lamiales
Famille : Lamiaceae

I-7-2-4 / Distribution géographique :

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires.

I-7-2-5 / Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques du romarin :

Cette plante est utilisée en médecine en raison de ses différentes propriétés :

- Anti spasmodiques, diurétiques, hépatoprotectrices, soulagement des désordres respiratoires (Lemonica et al 1996 ; Souza et al 2008)

- Antibactériennes, antimutagéniques, antioxydantes, chémopréventives (Ibañez *et al*, 2000 ; Pérez *et al*, 2007 ; Wang *et al*, 2008)
- Anti-inflammatoires, antimétastasiques (Cheung et Tai, 2007)
- Inhibition de la genèse des tumeurs mammaires (Singletary et Nelshoppen , 1991) et la prolifération des tumeurs cutanées (Huang *et al* ,1994)
- D'autres études montrent que les composants du romarin inhibent les phases d'initiation et de promotion de cancérogénèse (Offord *et al*, 1995)
- Carnosol du romarin possède une activité antivirale contre le virus du SIDA (HIV) (Aruoma *et al*, 1996) alors que l'acide carnosique a un effet inhibiteur très puissant contre la protéase de HIV-1 (Paris *et al*, 1993)

I-7-2-6 / Principes actifs :

Les principaux constituants du romarin responsables des différentes propriétés sont :

- **Les acides phénoliques** : acide vanillique, acide caféique, acide p-coumarique (Ibañez *et al*, 2003 ; Ramirez *et al*, 2004 ; Cavero *et al*, 2005 ; Herrero *et al*, 2005 ; Muchuweti *et al*, 2007 ; Pérez *et al*, 2007)
- **Les flavonoïdes** : genkwanine, cirsimaritrine (Ibañez *et al* ,2000; Cavero *et al*, 2005), ériocitrine, hespéridine, diosmine, lutéoline (Okamura *et al*, 1994 ; Del Baño *et al*, 2004), apigénine (Yang *et al* ,2008)

Chapitre II

Les composés phénoliques

II-1 / Généralités :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix *et al.*, 2005). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000)

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (Macheix *et al.*, 2005)

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Macheix *et al.*, 2005)

II-2 / biosynthèse des composés phénoliques :

A / La voie de shikimate : c'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Kening *et al*, 1995)

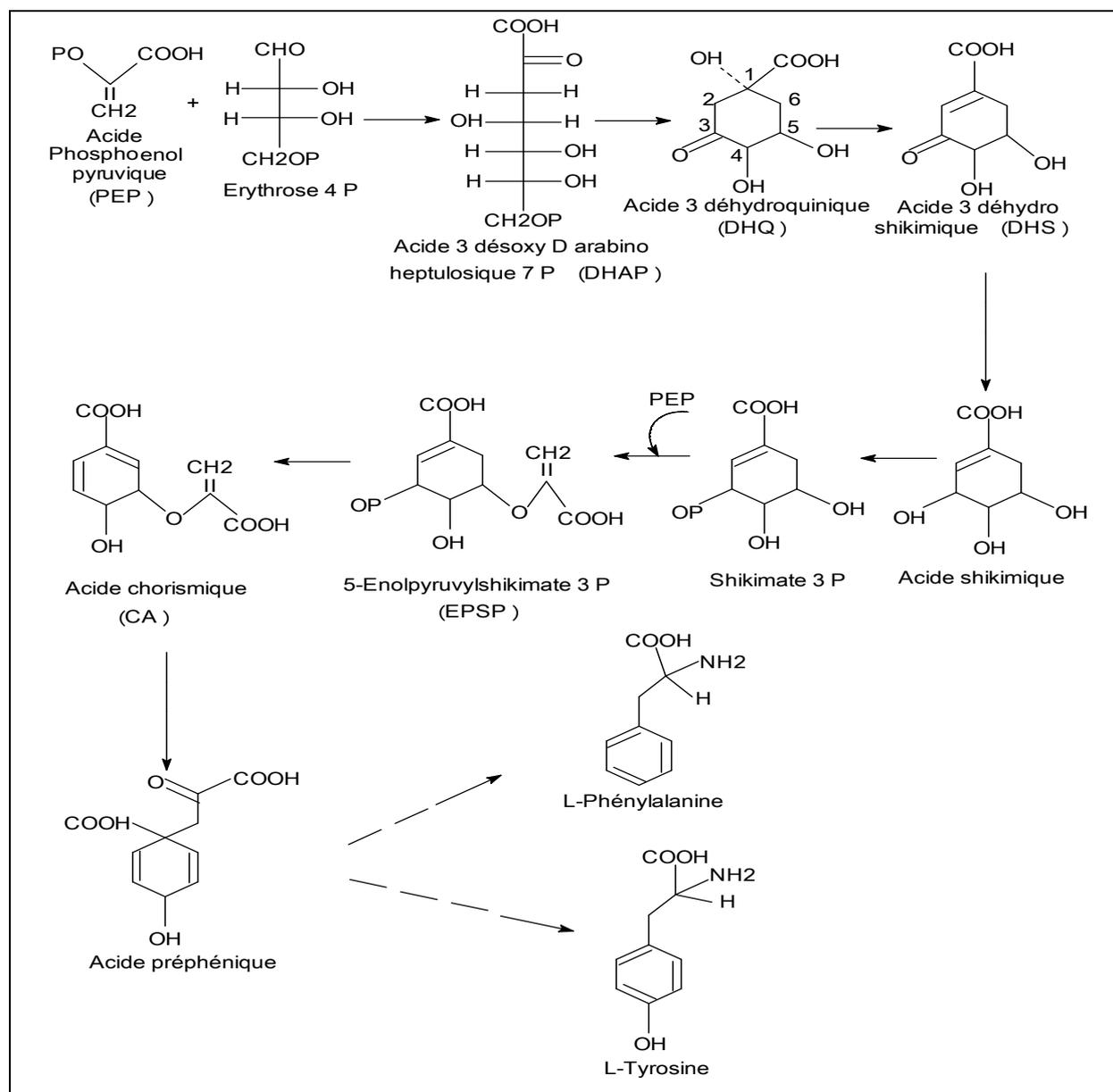


Figure 3 : La voie de shikimate (Floss, 1997)

B / La voie de phénylpropanoïde:

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose

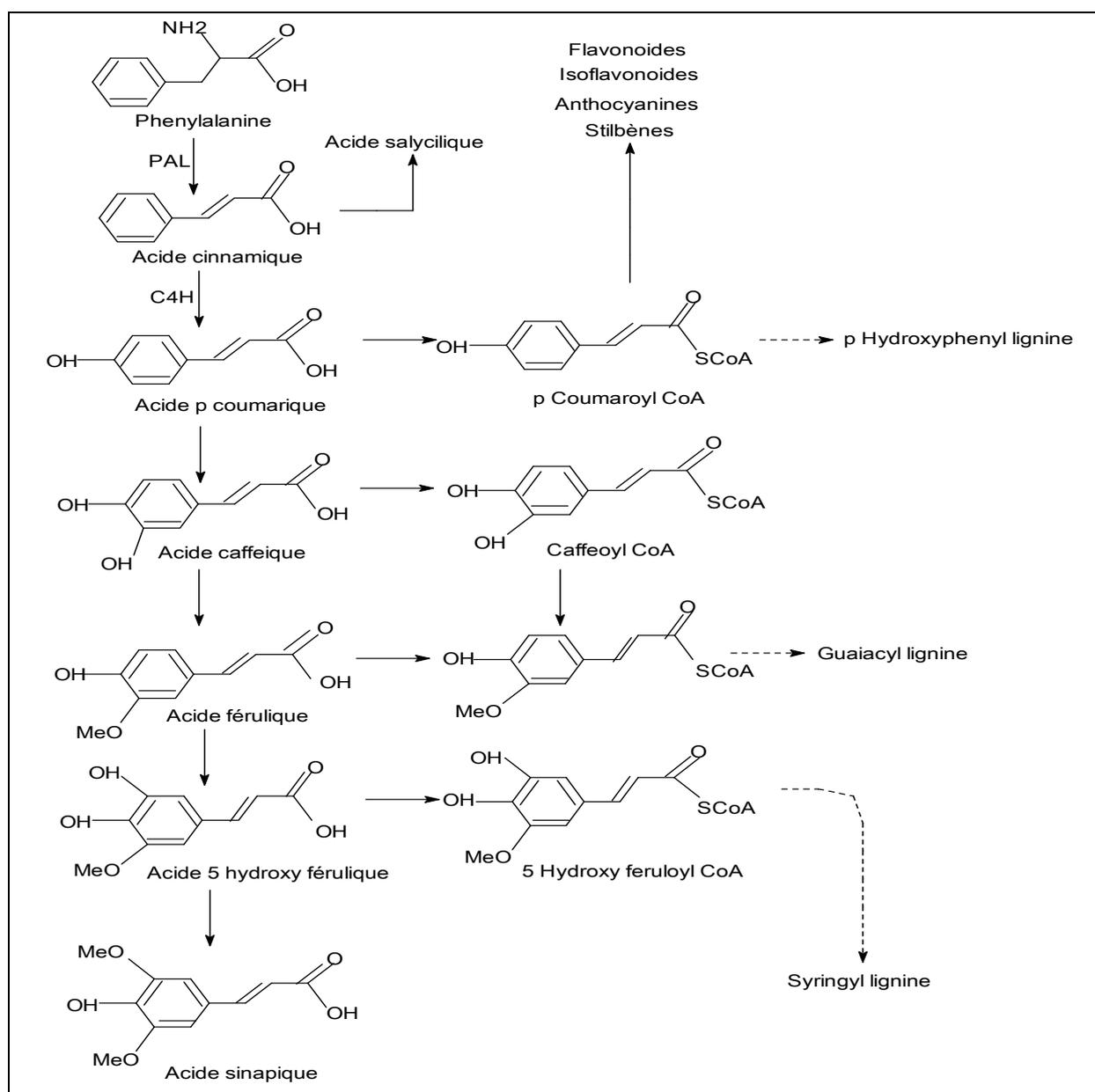


Figure 4: La voie de phénylpropanoïde (Hoffmann *et al*, 2004)

C / La voie de biosynthèse des flavonoïdes :

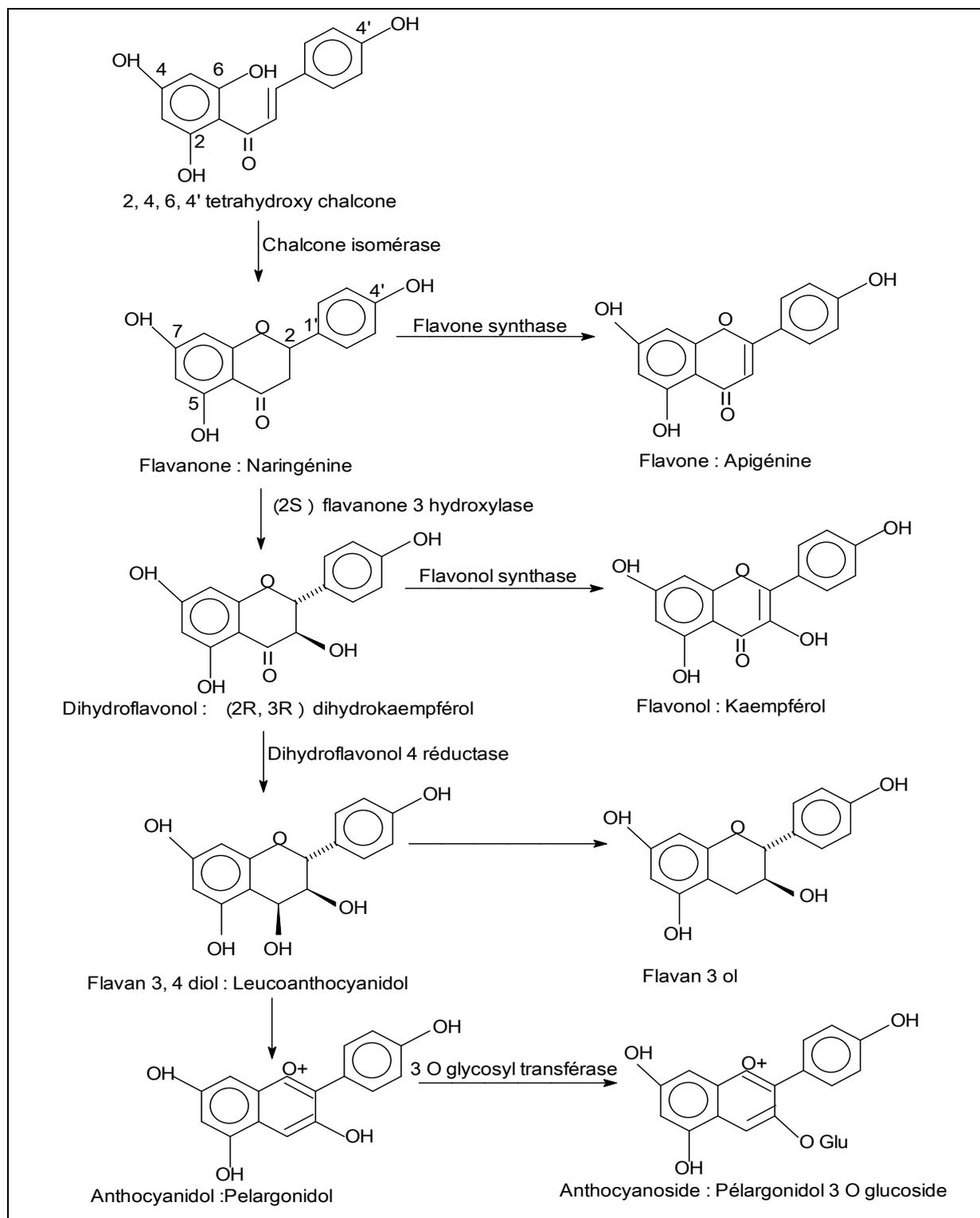
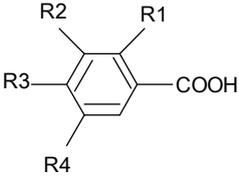


Figure 5: La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel–Shirley, 2001; Subsamanian *et al*, 2007)

II-3 / Principales classes des composés phénoliques :**II-3-1 / Les acides phénoliques simples :****A / Acides hydroxybenzoïques :**

- Sont des dérivés de l'acide benzoïque
- Ont une structure générale de base de type (C6-C1)
- Existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides
- Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans le tableau I :

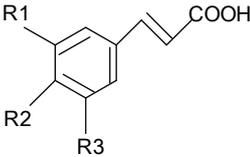
Tableau I: Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

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

B / Acides hydroxycinnamiques :

- Dérivent de l'acide cinnamique
- Ont une structure générale de base de type (C6-C3)
- Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques
- Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules, le tableau II représente les principaux acides hydroxycinnamiques

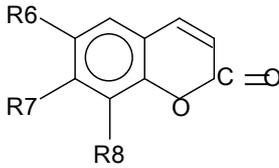
Tableau II : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006)

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

C / Coumarines :

- Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale
- Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique

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

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

II-3-2 / Les flavonoïdes :

II-3-2-1 / Généralités:

Le nom flavonoïde proviendrait du terme *flavedo*, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du *flavus* ; (*flavus*=jaune) (Karaali *et al*, 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (Nijveldt *et al*, 2001)

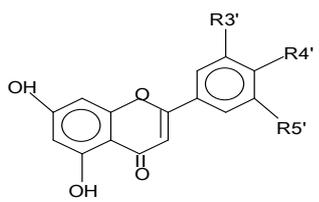
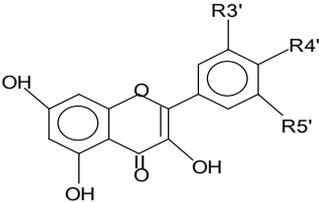
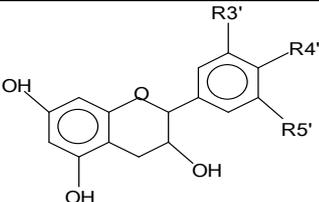
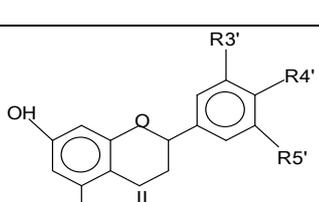
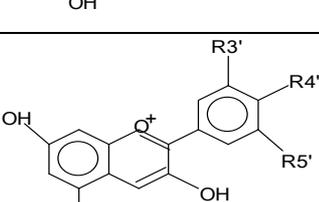
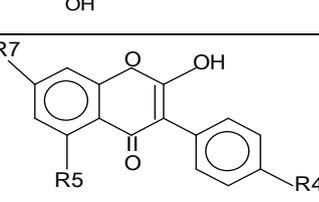
Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (Ghedira, 2005; Malešev et Kuntić, 2007). Prés de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Medić-Šarić *et al*, 2004)

II-3-2-2 / Structure :

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (W- Erdman *et al*, 2007). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (Emerenciano *et al*, 2007) en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Narayana, 2001; Malešev et Kuntić, 2007)

II-3-2-3 / Classification :

Tableau IV : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al*, 2001; W- Erdman *et al*, 2007)

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

II-3-2-4 / Localisation:

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzler *et al*, 1998)

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (Piquemal, 2008), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (Boudet, 2000)

II-3-2-5 / Distribution :

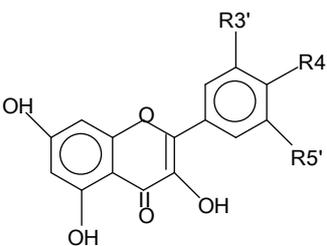
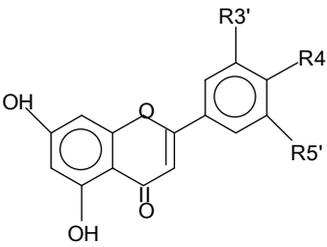
Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (Verhoeyen *et al*, 2002), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) (Urquiaga et Leighton, 2000)

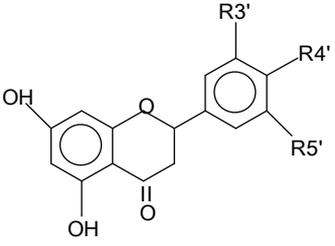
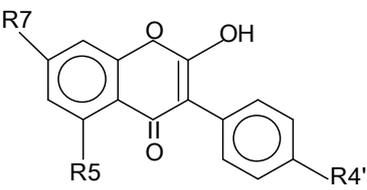
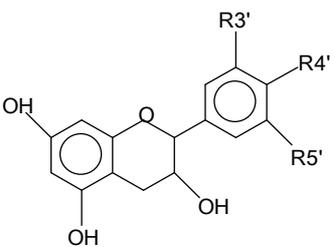
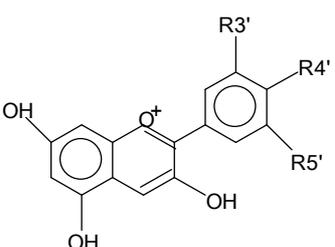
Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (Lahouel, 2005 ; Piquemal, 2008)

Le monde animal est très concerné par les flavonoïdes dont Brewington *et al* (1974), Lopez et Lindsay (1993) in (Besle *et al*, 2004) ont isolé respectivement quinze et seize composés aromatiques à partir du lait de vache avec respectivement 6 et 5 composés importants dus principalement à la consommation des plantes par les herbivores.

On trouve aussi la chrysrine, la quercétine, de la galangine dans les propolis ; sécrétion des bourgeons de nombreux arbres (le bouleau, le sapin, le saule...) récoltés par les abeilles, ces insectes les fabriquent en modifiant la propolis par leurs enzymes salivaires. Les abeilles mettent en œuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches (Lahouel, 2005). Le tableau V représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments :

Tableau V : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (W- Erdman *et al*, 2007)

Flavonoïdes	Exemples	Aliments	Caractéristiques
<p>Flavonols</p> 	<p>Quercétine Kaempférol</p>	<p>Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, vin rouge, thé.</p>	<p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.</p>
<p>Flavones</p> 	<p>Lutéoline Apigénine</p>	<p>Persil, céleri.</p>	<p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques, les flavones se diffèrent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration</p>

<p style="text-align: center;">Flavanones</p> 	<p>Naringénine Eriodictyol</p>	<p>Fruits du genre Citrus.</p>	<p>Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.</p>
<p style="text-align: center;">Isoflavones</p> 	<p>Genisteine Daidzeine</p>	<p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p>	<p>Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.</p>
<p style="text-align: center;">Flavan3-ols</p> 	<p>Catéchine Epicatéchine Epigallocatec -hine</p>	<p>Vin rouge, thé noire, thé vert, cacao, chocolat.</p>	<p>Flavan3ols ainsi que flavan3,4diols sont tout les deux impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines (tanins condensés) par des condensations enzymatiques et chimiques</p>
<p style="text-align: center;">Anthocyanidines</p> 	<p>Cyanidine Delphénidine</p>	<p>Raisins, vin rouge, certaines variétés de céréales.</p>	<p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p>

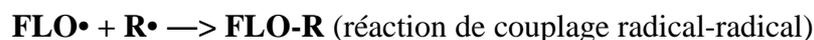
II-3-2-6 / Propriétés des flavonoïdes :

A / Propriétés antiradicalaires :

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



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



(Amić *et al*, 2003)

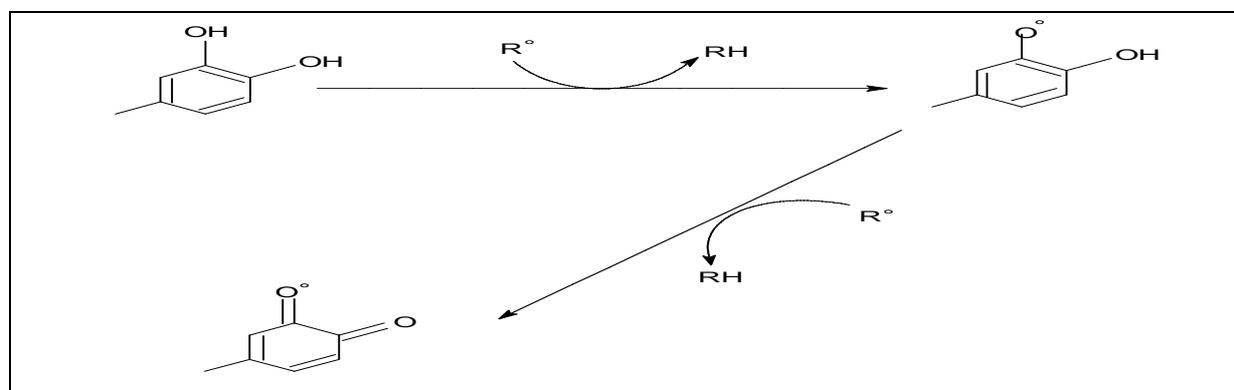


Figure 6 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001)

La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.
- La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.
- Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (Amić *et al*, 2003)

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (Middleton *et al*, 2000)

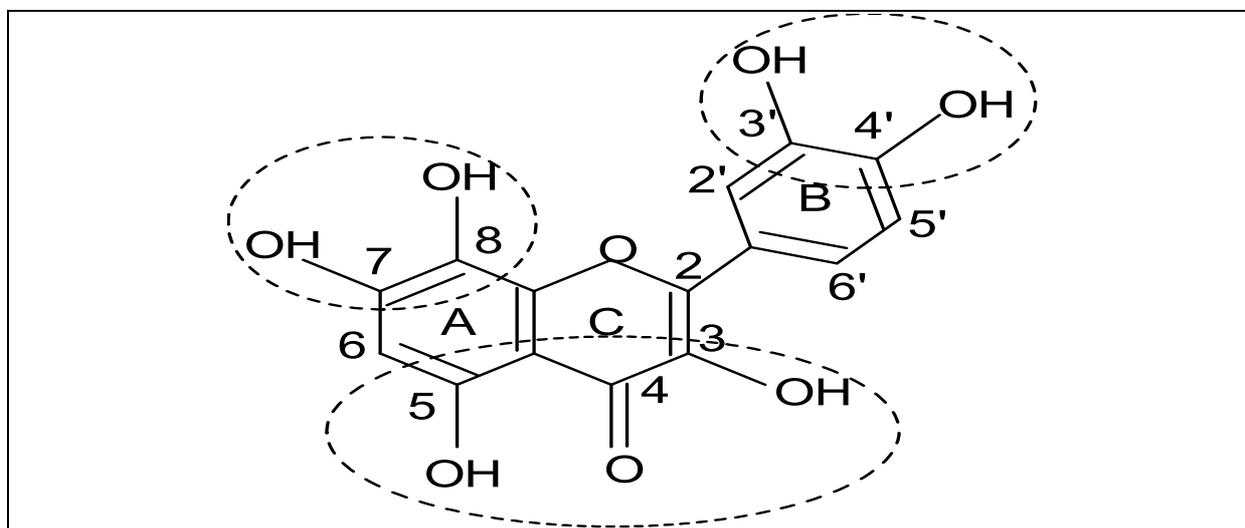


Figure 7 : Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić *et al*, 2003)

B / Propriétés chélatrices des ions métalliques :

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

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

La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux :

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

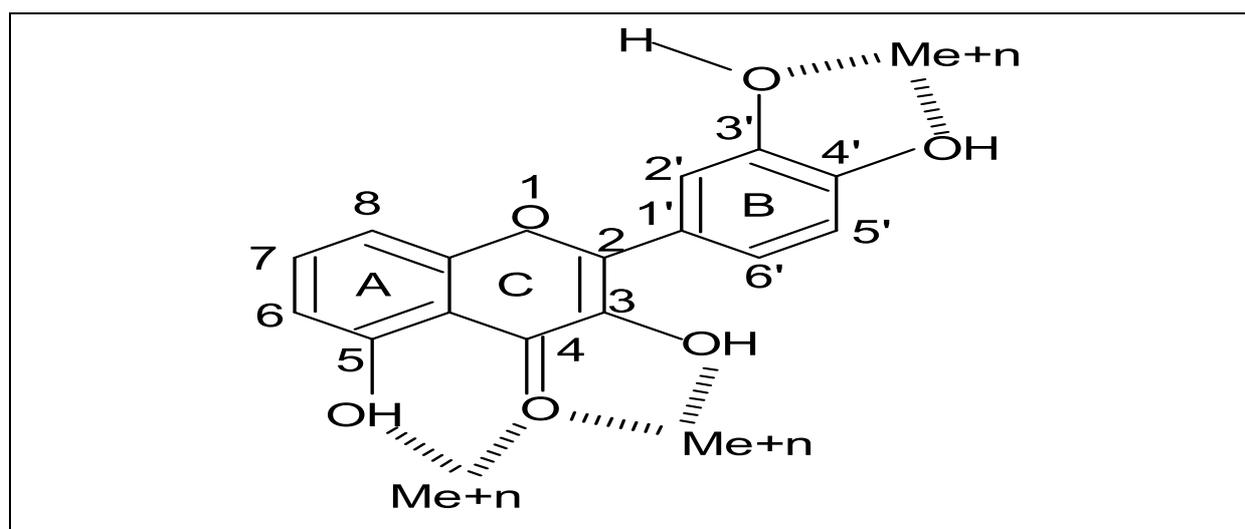


Figure 8 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}) (Tiqwari, 2001)

C / Propriétés antibactériennes :

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

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

D / Propriétés anticancéreuses :

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (Pincemail *et al*, 1999)

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996)

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

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

Les travaux réalisés par Mahmoud *et al* (2000) in (Depeint *et al*, 2002) montraient que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toute fois Caltagirone *et al* (2000) in (Depeint *et al*, 2002) signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes :

- piégeage des radicaux libres
- Inhibition du métabolisme d'acide arachidonique
- Formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (Hertog, 1996)
- Prévention de l'activation des métabolites carcinogènes
- Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses
- Arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses
- Induction de l'apoptose
- Inhibition des processus d'angiogénèse (Ren *et al*, 2003)

E / Propriétés anti inflammatoires :

Une inflammation par définition est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression (infection, brûlure, allergie...) qui se manifeste par une rougeur, un gonflement, une sensation de chaleur, une douleur qui semble pulser ... (Wikipédia, 2008).

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS) (Hämäläinen *et al*, 2007), bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs (Nijveldt *et al*, 2001), car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion superoxyde conduisant à la formation de peroxyde nitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer (Tsai, 2004)

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego *et al*, 2007) d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim *et al*, 2004).

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (Tapas *et al*, 2008)

F / Propriétés antivirales :

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

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

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (Bylka *et al*, 2004). Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (Tapas *et al*, 2008)

G / Propriétés antiallergiques :

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺ dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca²⁺ dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Marfak, 2003)

H / Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques :

Le terme nutraceutique a été intervenu en 1979 par Steph De Felice (Lin et Weng, 2006), il s'agit d'une appellation commerciale élaborée par les industriels qui résulte de la contraction de "Nutrition" et de "Pharmaceutique" (Bietrix, 2004). Les nutraceutiques sont des composés qui n'ont pas une valeur calorique mais qui ont un rôle fondamental pour ce qui concerne la prévention de certaines pathologies (Teissedre *et al*, 2007)

Le rôle nutraceutique des polyphénols s'inscrit dans le cadre de ce que l'on appelle la nouvelle pharmacie qui consiste à faire un traitement préventif et non curatif, il vaut mieux que le médicament soit déjà présent dans l'organisme prêt à la défense apporté sous forme des aliments fonctionnels capables de procurer des bienfaits physiologiques démontrés ou de réduire les risques des maladies chroniques, en plus de remplir leurs fonctions nutritionnelles de base dont la consommation des fruits et des légumes riches en composés bioactifs peut être une stratégie de prévention réaliste contre de nombreuses maladies majeures. Les produits nutraceutiques fondamentaux des plantes sont les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes en raison de leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine.

I / Biodisponibilité des flavonoïdes :

Les effets santé des polyphénols dépendent essentiellement de leur biodisponibilité ; cette dernière qui signifie la part d'un nutriment présent dans un aliment qui est effectivement assimilée par l'organisme (Wikipédia, 2008)

Selon Wiseman (1999) la biodisponibilité absolue (%) correspond à la proportion des molécules qui entrent dans la circulation sanguine sous leur forme intacte après leur consommation en passant à travers la paroi intestinale et le foie.

a / Absorption : tous les flavonoïdes à l'exception de catéchine (flavanol) sont présents dans les plantes sous forme glycosylée (liés aux sucres par des liaisons β osidiques) seuls les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides sont hydrolysés tout d'abord en aglycones par l'intermédiaire de la microflore colique qui dispose des enzymes capables de cliver les liaisons β osidiques (Wiseman, 1999 ; Urquiaga et Leighton, 2000 ; Ming, 2007), cette même flore microbienne métabolise au même temps les aglycones libérés. Des quantités considérables de catéchines polymériques connus sous le nom de proanthcyanidines sont présents dans l'alimentation, des études montrent que les formes dimères et trimères de catéchine sont susceptibles d'être absorbés tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé ne peuvent pas être absorbés par la paroi intestinale qu'après leurs dégradation (Hollman, 2001)

b / Métabolisme : deux compartiments considérablement importants pour le métabolisme des composés phénoliques :

- **les tissus (foie et les reins)** : ou des enzymes de biotransformation agissent directement sur les flavonoïdes aglycones ainsi que sur des métabolites coliques absorbés, ces enzymes sont principalement localisés au niveau du foie, des reins, ainsi qu'au niveau de l'intestin grêle.
- **Colon** : où la microflore colique dégrade les flavonoïdes aglycones libérés (après hydrolyse des glycosides) par ouverture de leur hétérocycle aux différents endroits selon le type de flavonoïde concerné :
 - Les flavonols : sont dégradés en acides phénylacétiques et acides phénylpropioniques
 - Les flavanols : produisent les valerolactones (noyau benzénique avec une chaîne latérale de cinq atomes de carbones) et des acides phénylpropioniques
 - Les flavones et les flavanones : produisent des acides phénylpropioniques

Ces acides sont encore métabolisés aux dérivés des acides benzoïques, les groupements hydroxyles des métabolites générés subissent une conjugaison par acide glucuronique, sulfate, ou par glycine (Hollman, 2001). L'élimination des métabolites de polyphénols se fait par deux voies essentielles d'excrétion ; soit par voie biliaire (Manach, 1998) ou par voie urinaire.

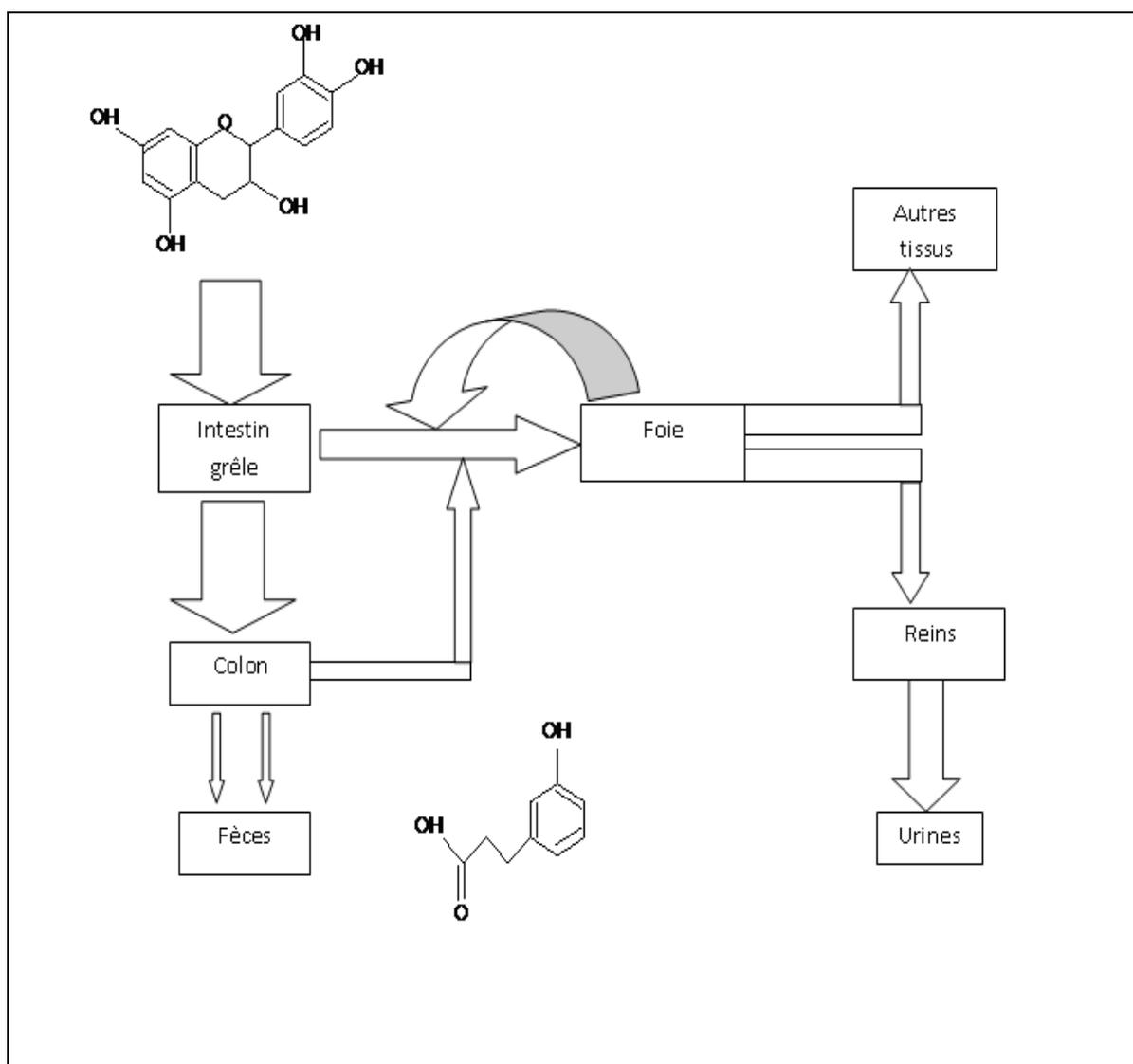


Figure 9 : Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes (Hollman, 2001)

G / Autres propriétés des flavonoïdes :

- Protection des plantes contre les radiations UV
- Sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales
- Agissent comme des pigments ou des co-pigments
- Modulation de la distribution d'auxine
- Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire
- Régulation de l'élongation des tiges
- Interviennent dans la maturité des fruits
- Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Park et Cha, 2003 ; Subsamanian *et al*, 2007 ; Yang *et al*, 2008)

Matériel et méthodes

Chapitre I

Etude phytochimique

I-1 / Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis*. Les feuilles du thym ont été cueillies en mai 2008 de la région d'Ain Smara tandis que Les feuilles et les sommités fleuries du romarin ont été récoltées en mois de mars 2008 de l'université de Constantine. Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal de chacune des deux espèces est broyé grossièrement dans un moulin électrique.

I-2 / Extraction des flavonoïdes :

Suivant le protocole d'extraction décrit par (Merghem *et al*, 1995), le matériel végétal broyé (100 g) est soumis à une extraction par macération dans le mélange éthanol / eau (30/70 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps. Les macéras sont réunis puis ils sont filtrés sur un papier filtre. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans 100 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation), après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante :

- Affrontement par éther de pétrole
- Affrontement par acétate d'éthyle
- Affrontement par MEC (méthyle éthyle cétone)

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et la phase chargée de molécules spécifiques sont récupérées séparément. Les différentes phases récupérées (acétate d'éthyle, MEC, phase eau résiduelle) sont évaporées à sec puis reprises par 10 ml du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation.

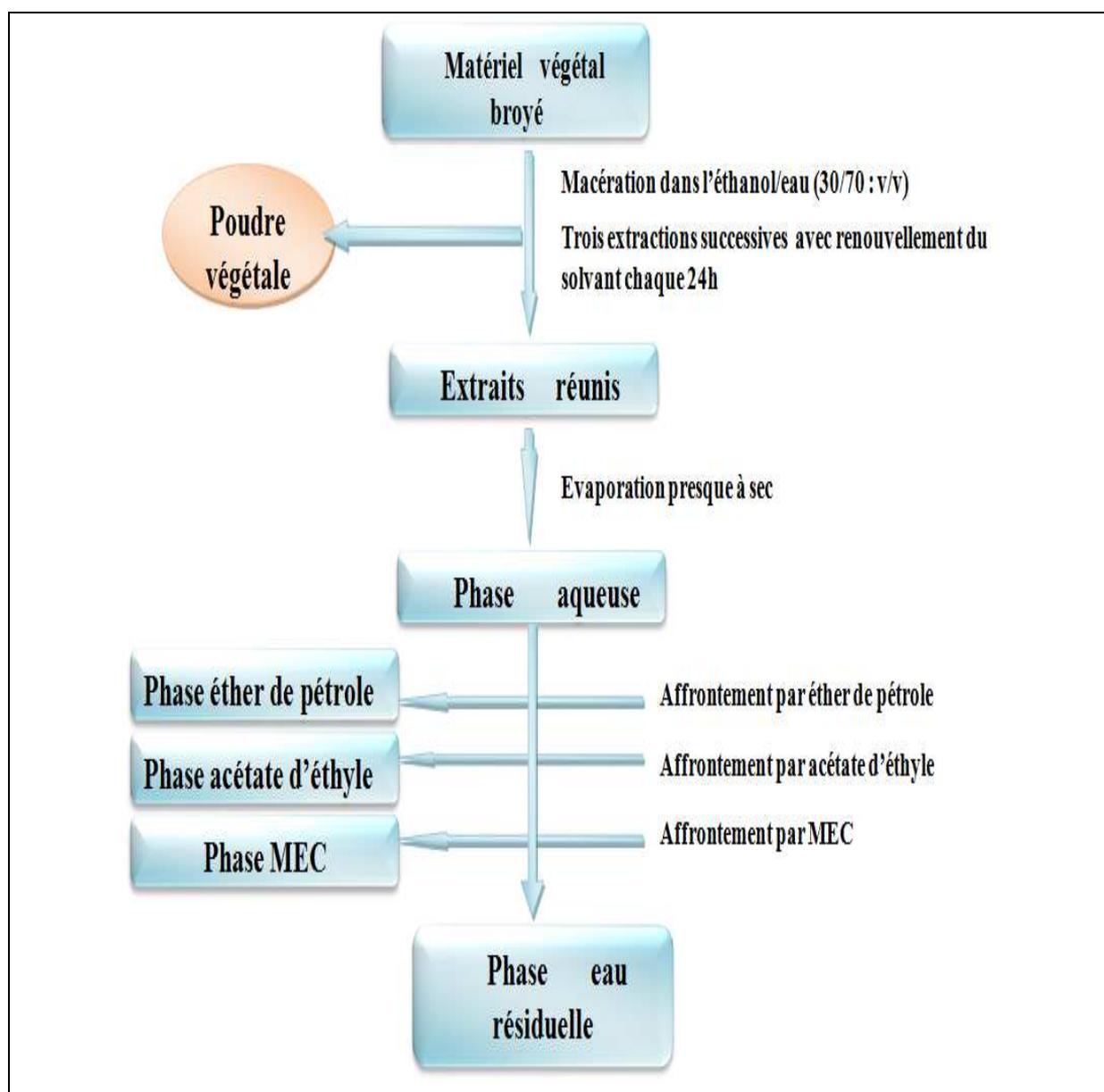


Figure 10 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Merghem *et al*, 1995)

I-3 / La chromatographie analytique sur couche mince :

I-3-1 / Principe :

Le principe de la chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire (Wikipédia, 2008)

I-3-2 / Mode opératoire :

- **a / Préparation de la phase stationnaire :** La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice et sur des plaques de polyamide (DC6), quant à ces dernières sont préparées en mélangeant 10 g de poudre de polyamide dans 50 ml d'éthanol, après étalement du gel sur des plaques en verre et séchage, la phase stationnaire sera prête à l'utilisation.
- **b / Préparation de la phase mobile :** La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

Tableau VI : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de polyamide

CCM sur gel de polyamide			
	Systèmes solvants	Proportions	Références
Systèmes essayés	Tol/MEC/EtOH	(2/1/1) (v/v/v)	Mehibel, 2006
	Tol/MEC/EtOH/EP	(2/1/1/1) (v/v/v/v)	Mehibel, 2006
	MeOH/H ₂ O/A acétique	(18/1/1) (v/v/v)	Kaabouche, 2007
	MeOH/H ₂ O/A acétique	(95/5/5) (v/v/v)	Bhat <i>et al</i> , 2004
	Tol/MeOH/EtOH	(4/3/3) (v/v/v)	Aurangzeb <i>et al</i> , 2005
Systèmes choisis	Tol/MeOH/EtOH	(4/3/3) (v/v/v)	Aurangzeb <i>et al</i> , 2005
	MeOH/H ₂ O/A acétique	(95/5/5) (v/v/v)	Bhat <i>et al</i> , 2004

Tableau VII : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice

CCM sur gel de silice			
	Systèmes solvants	Proportions	Références
Systèmes essayés	Acétate d'éthyle /acide formique/acide acétique/H ₂ O	(100/11/11/27) (v/v/v/v)	Maleš <i>et al</i> , 1998
	Acétate d'éthyle/MeOH/H ₂ O	(100/13.5/10) (v/v/v)	Maleš <i>et al</i> , 1998
Systèmes choisis	Acétate d'éthyle/MeOH/H ₂ O	(100/13.5/10) (v/v/v)	Maleš <i>et al</i> , 1998

Les systèmes solvants choisis sont utilisés comme des éluants des phases stationnaires (silice et DC6), leurs vapeurs doivent saturer l'atmosphère de la cuve ceci impose d'utiliser une cuve bien fermée.

- **c / Le dépôt** : le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte (Sine, 2003)
- **d / Développement des plaques** : chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (Sine, 2003)
- **e / Révélation** : si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques :

***Révélation aux UV** : qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.

***Révélation par des méthodes chimiques** : ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler (Latifou, 2005)

- **f / Identification des flavonoïdes** : le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son Rf (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

***Structure -Rf**

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25)
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5)
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) (Bandyukova et Shinkarenko, 1973)

Tableau VIII : La relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes (Bandyukova et Shinkarenko, 1973)

Structure flavonique	Rf
Augmentation des (OH)	Diminution du Rf
Méthylation des groupements (OH)	Augmentation des valeurs de Rf
Acétylation	Augmentation des valeurs de Rf
Glycosylation	Diminution des valeurs de Rf due principalement de l'introduction de nouveaux groupements (OH)

***Structure-fluorescence :**

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes, le tableau 9 résume la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau IX : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005)

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu claire (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

I-4 / Mise en évidence des flavonoïdes :

Afin de mettre en évidence la présence des flavonoïdes dans nos extraits, un test simple et rapide au AlCl_3 a été réalisé (Latifou, 2005) pour ce test nous avons préparé une solution éthanolique de chlorure d'aluminium (1%) en dissolvant 1g d' AlCl_3 dans 100 ml d'éthanol, la solution est ensuite stockée à 4°C puis pulvérisée sur le chromatogramme de gel de silice, ce dernier qui a été développé au préalable dans le système solvant (acétate d'éthyle/méthanol/eau) (100/13,5/10). Après séchage le chromatogramme sera directement observé dans le visible.

I-5 / Dosage des composés phénoliques :

Le contenu des composés phénoliques de nos extraits est estimé par la méthode de Folin ciocalteu (Adesegun *et al*, 2007)

- 1ml d'extrait de l'échantillon
- 5ml du réactif de Folin ciocalteu (dilué dix fois)
- 4ml d'une solution de bicarbonate de sodium (0.7M)
- Agiter vigoureusement
- Incuber pendant 2h à une température ambiante
- Lire l'absorbance à 765 nm, le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante $T=C.V/M$

T : Représente le total des composés phénoliques (mg EAT / g d'extrait sec de la plante)

C : Concentration d'extrait éthanolique équivalente à l'acide tannique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

V : le volume d'extrait éthanolique (ml)

M : poids sec d'extrait éthanolique de la plante (g)

I-6 / Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes contenus dans les extraits éthanoliques du thym et du romarin sont estimés par la méthode d' AlCl_3 (Ayoola *et al*, 2008)

- 1ml d'une solution éthanolique d' AlCl_3 (2%) est rajouté à 1ml de l'extrait de la plante.
- Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 420 nm, la quercétine est utilisée comme un standard, la quantité des flavonoïdes est estimée en mg EQ/g d'extrait sec de la plante.

I-7 / Techniques chromatographiques de séparation des flavonoïdes :

I-7-1 / La chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

- **La phase stationnaire** : c'est le support solide, qui est la colonne de polyamide (DC6), elle est montée dans le moins polaire des solvants utilisés qui est le toluène dans notre cas.
- **La phase mobile** : représente le solvant d'élution utilisé qui est en générale un mélange de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire.

Après dissolution des phases acétate d'éthyle et MEC de *Thymus vulgaris* dans le méthanol, le mélange est additionné à une quantité de polyamide (DC6), évaporé à sec ce qui conduit à l'obtention d'une poudre solide qui est introduite délicatement dans la colonne puis fractionnée avec le gradient (toluène/méthanol) de polarité croissante, l'élution doit être poursuivie jusqu'au méthanol pur. A chaque fois des fractions de 25 ml sont prélevées.

Les fractions collectées sont soumises au contrôle chromatographique sur couche mince, puis révélées aux UV (254 et 365 nm) ce qui en permet de rassembler les fractions présentant des similitudes.

I-7-2 / La chromatographie sur papier :

La chromatographie préparative sur papier Wathman n° 3 est une méthode de séparation dont le principe repose sur les phénomènes de partage. La phase mobile est le plus souvent un solvant organique et l'eau, la phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. Dans cette technique, une quantité importante des deux phases mélangées de MEC et acétate d'éthyle de *Rosmarinus officinalis* est déposée sur le bord d'une bande de papier de chromatographie, cet échantillon est absorbé par le papier ; ce qui signifie que les molécules interagissent avec ce dernier et qu'elles auront tendance à rester au même endroit. Le papier est ensuite trempé dans le système solvant (acide acétique/eau) (50/50 : v/v) placé dans une cuve bien fermée, pendant que l'éluant descend le long du papier par capillarité, il rencontre l'échantillon qui commence à descendre avec celui-ci. Les différentes substances de l'échantillon migrent à différentes vitesses selon qu'elles interagissent plus ou moins fortement avec le papier. La chromatographie sur papier demande un certain temps, généralement plusieurs heures, une fois que c'est fini, c'est-à-dire quand le solvant est arrivé en bas du papier ce dernier est retiré de la cuve, on laisse évaporer le solvant. Après développement des chromatogrammes, les bandes correspondant aux composés sont délimitées sous UV, découpées et éluées dans le méthanol.

I-8 / La spectrophotométrie :

I-8-1 / Définition :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une structure chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer– Lambert (Wikipédia, 2008)

I-8-2 / Principe :

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente.

I-8-3 / Spectres UV-Visible des flavonoïdes :

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

Les flavones et les flavonols hautement oxygénés ont tendance d'absorbance vers les longueurs d'ondes les plus longues en entraînant un déplacement du spectre vers l'infrarouge. La méthylation ou la glycosylation des groupements hydroxyles des flavonoïdes résulte généralement d'un déplacement hypsochromique de la bande I.

Tableau X : Principales caractéristiques des spectres UV-Visible des flavonoïdes (Markham, 1982)

Bande II	Bande I	Types de flavonoïdes
250-280	310-350	Flavones
250-280	330-360	Flavonols substitués en C3
250-280	350-385	Flavonols
245-275	310-330	Isoflavones
	(épaulement pic à 320)	Isoflavones (5-desoxy-6,7-dioxygénés)
275-295	300-330 Epaulement	Flavanones et dihydroflavonols
230-270 (Faible intensité)	340-390	Chalcones
230-270	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanes

I-8-4 / Etude spectrale des flavonoïdes :

Après la collection des extraits flavoniques suite à l'utilisation des techniques chromatographiques de séparation (chromatographie sur colonne pour *Thymus vulgaris* et chromatographie sur papier pour *Rosmarinus officinalis*) les composés isolés sont analysés par mesure de leur spectre d'absorption UV-Vis dans le méthanol, ainsi que leur déplacement bathochromique, hypsochromique, hyperchromique suite à l'addition des réactifs spécifiques (André *et al*, 1976 ; Van Den Broucke *et al*, 1982 ; Voirin , 1983 ; Dordević *et al*, 2000)

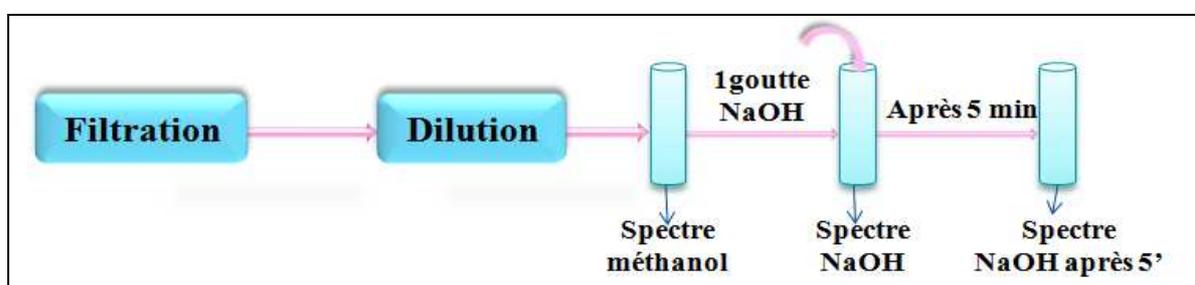
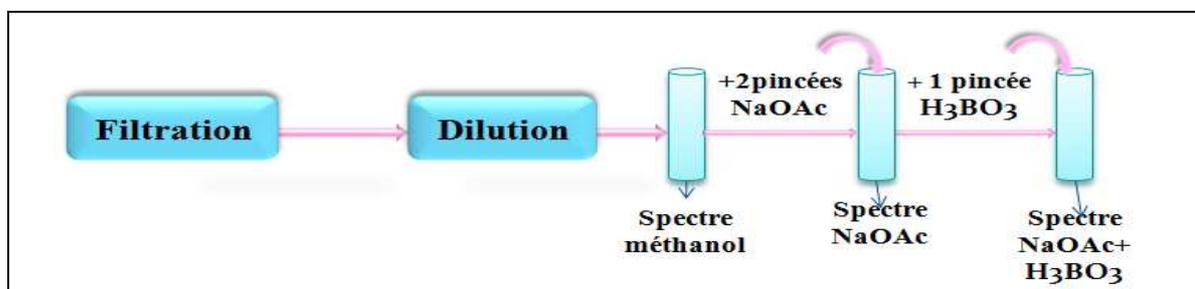
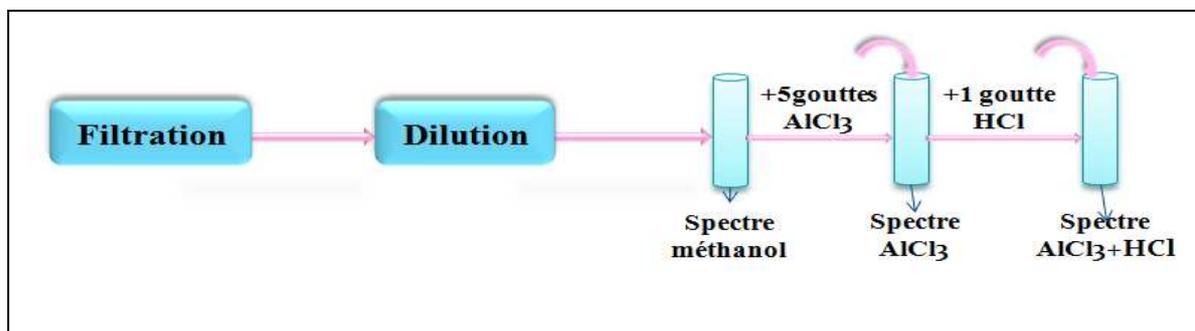
Première série :**Deuxième série :****Troisième série :**

Figure 11 : Protocole d'étude spectrale des flavonoïdes en présence des différents réactifs

Tableau XI : Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs (Markham, 1982)

Réactifs	Déplacements en nm		Interprétations
	Bande I	Bande II	
MeOH	310-350 330-360 350-380	250-280 250-280 250-280	Flavones Flavonols (3-OH substitué) Flavonols (3-OH libre)
NaOH	+45 à 65 BI avec stabilité d'intensité +50 à 60 avec diminution d'intensité Faible déplacement avec diminution d'intensité Absence de pic entre 320-335 Apparition d'un pic entre BI et BII Transformation de BI en une inflexion		4'OH 3',4'-di OH 4' –OMe 7-OR 7-OH 5-OH
AlCl ₃ +MeOH	+20 à 45 +60		5-OH 3-OH
AlCl ₃ +HCl / AlCl ₃	-30 à 45 -10 -20		3',4' –di OH 3' ,4'-OH,OMe 3',4',5'-tri OH
AlCl ₃ +HCl /MeOH	+35 à 55 +17 à 20		5-OH 5-OH
NaOAc / MeOH	+20 à 80 Déplacement très faible Diminution d'intensité avec le temps Spectre se décompose avec le temps		7-OH 7-OR 6,7 ; 7,8 ou 3' ,4'-di-OH 5, 6,7 ; 5, 7,8 ou 3,3',4' -tri OH
NaOAc +H ₃ BO ₃ / MeOH	+12 à 36 +5 à 10		3',4'-di OH 6,7 ou 7,8 – di OH

Chapitre II

Etude des activités biologiques

II-1 / Activité antiradicalaire des flavonoïdes :

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des éléments très importants pour la vie de l'organisme suite à l'implication de leurs effets bénéfiques, par exemple les radicaux oxygéniques exercent des actions critiques sur les signaux de traduction, et sur les gènes de transcription, les cellules phagocytaires (macrophages) utilisent également les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) pour combattre les agents infectieux (bactéries et virus). Cependant ces mêmes radicaux peuvent causer des dégâts oxydatifs cellulaires, endommagement des tissus et même la mort des cellules et le développement des processus pathologiques (Fotsing Matene, 2005 ; Wang *et al*, 2008)

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituants, en effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules (Cosio *et al*, 2006). L'activité antioxydante des flavonoïdes peut être mesurée par l'utilisation d'une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre ; c'est la méthode de DPPH, dont le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe, la méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant (Bernardi *et al*, 2007). On utilise comme principes actifs les extraits flavoniques du thym et du romarin qui sont respectivement en nombre de six et de trois, ces extraits sont évaporés à sec afin de connaître leurs poids sec puis repris dans le méthanol de telle sorte à avoir des concentrations de 5 mg/ml pour chacun.

L'activité antiradicalaire de ces extraits est mesurée selon la méthode décrite par (ES –Safi *et al*, 2007)

- 25µl de l'extrait à tester
- 2.5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0.004%)
- La densité optique DO est mesurée par le spectrophotomètre SHIMADZU à 517 nm, après 30 minutes d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, la décroissance de l'absorbance est convertie en pourcentage d'activité Scavenger selon l'équation suivante :

$$\text{Activité Scavenger (\%)} = (A \text{ contrôle} - A \text{ échant} / A \text{ contrôle}) \times 100$$

A contrôle : Absorbance du contrôle

A échant : Absorbance des flavonoïdes testés

II-2 / Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes :

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par (Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota *et al*, 2008)

Le support microbien est composé d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp* qui ont été isolées de produits pathologiques provenant de laboratoire de bactériologie de l'hôpital universitaire de Constantine.

- **Repiquage des espèces bactériennes** : les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

- **Préparation de l'inoculum** : des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml de bouillon nutritif puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37°C.
- **Préparation des disques** : des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.
- **Préparation des milieux de culture** : la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.
- **Ensemencement** : des boîtes de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.
- A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable.

L'activité antibactérienne est déterminée en terme de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37° C.

Résultats et discussion

Chapitre I

Etude phytochimique

I-1 / Extraction :

L'extraction des parties aériennes de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* par macération dans le mélange éthanol / eau (30/70 : v/v) et la partition entre les différents solvants nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

- **Phase éther de pétrole** : obtenue après affrontement par l'éther de pétrole mais elle est éliminée car elle ne contient que des matières grasses, des chlorophylles, et des impuretés.
- **Phase acétate d'éthyle** : obtenue après affrontement par l'acétate d'éthyle, ce dernier qui permet d'extraire les flavonoïdes, en entraînant les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides (Benkiki, 2006)
- **Phase méthyle éthyle cétone (MEC)** : obtenue après affrontement par méthyle éthyle cétone.
- **Phase eau** : c'est la phase résiduelle. Le mélange des deux phases (phase acétate d'éthyle et la phase MEC) sera consacré aux analyses chromatographiques de séparation (CC et CP).

I-2 / Chromatographie analytique sur couche mince :

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant deux systèmes solvants moyennement polaires. Sous lumière UV à 365 nm Les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Les couleurs des spots et leurs R_f observés sous UV suite à une analyse par chromatographie sur couche mince, nous ont permis de révéler la présence des flavones et des flavonols.

Tableau XII : Comportement chromatographique des phases acétate d'éthyle et MEC de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* sur plaque de polyamide (DC6) dans le système solvant (toluène /méthanol/éthanol) (4/3/3)

<i>Thymus vulgaris</i>				<i>Rosmarinus officinalis</i>			
La phase MEC		La phase acétate d'éthyle		La phase MEC		La phase Acétate d'éthyle	
Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf
Violet +++	0.85	Brun marron	0.84	Violet+++	0.84	/	/
Violet	0.62	Violet	0.63	Violet++	0.6	Brun noir	0.73
Brun	0.49	Brun marron	0.51	Brun	0.5	Violet	0.66
Blanc	0.40	Marron	0.43	Marron clair	0.42	Brun noir	0.54
Violet	0.32	Violet	0.35	Violet+	0.33	Noir	0.44
Jaune fluorescent	0.27	Marron jaune	0.25	Jaune fluorescent	0.28	Violet	0.38
Marron	0.19	Violet	0.12	Marron	0.24	Marron	0.31
Violet	0.14	Jaune pâle	0.02	Violet	0.16	Bleu clair	0.14
Marron	0.06	Dépôt =jaune pâle	0.0	Violet sombre	0.08	Dépôt=jaune pâle	0.0
Dépôt=marron jaune	0.0	/	/	Marron jaune	0.02	/	/
/	/	/	/	Dépôt= marron jaune	0.0	/	/

Tableau XIII : Comportement chromatographique des phases acétate d'éthyle et MEC de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* sur plaque de polyamide (DC6) dans le système solvant (méthanol/eau/acide acétique) (95/5/5)

<i>Thymus vulgaris</i>				<i>Rosmarinus officinalis</i>			
La phase MEC		La phase Acétate d'éthyle		La phase MEC		La phase Acétate d'éthyle	
Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf
Violet+++	0.73	Vert clair	0.71	Violet+++	0.84	Jaune très clair	0.75
Jaune très clair	0.59	Violet	0.56	Jaune très clair	0.75	Gris	0.64
Marron	0.38	Gris	0.51	Violet	0.63	Violet	0.57
Jaune fluorescent+++	0.28	Violet	0.45	Marron	0.45	Brun noir	0.51
Bleu clair fluorescent	0.21	Vert jaune	0.34	Jaune+++	0.32	gris	0.45
Marron+++	0.13	Bleu clair	0.21	Bleu clair	0.24	Brun noir	0.36
Vert jaune	0.06	Marron	0.11	Marron	0.15	Bleu clair	0.21
Dépôt=marron	0.0	Jaune	0.04	Marron+++	0.06	Marron	0.08
/	/	Dépôt=jaune pâle	0.0	Dépôt =marron	0.0	Dépôt =jaune	0.0

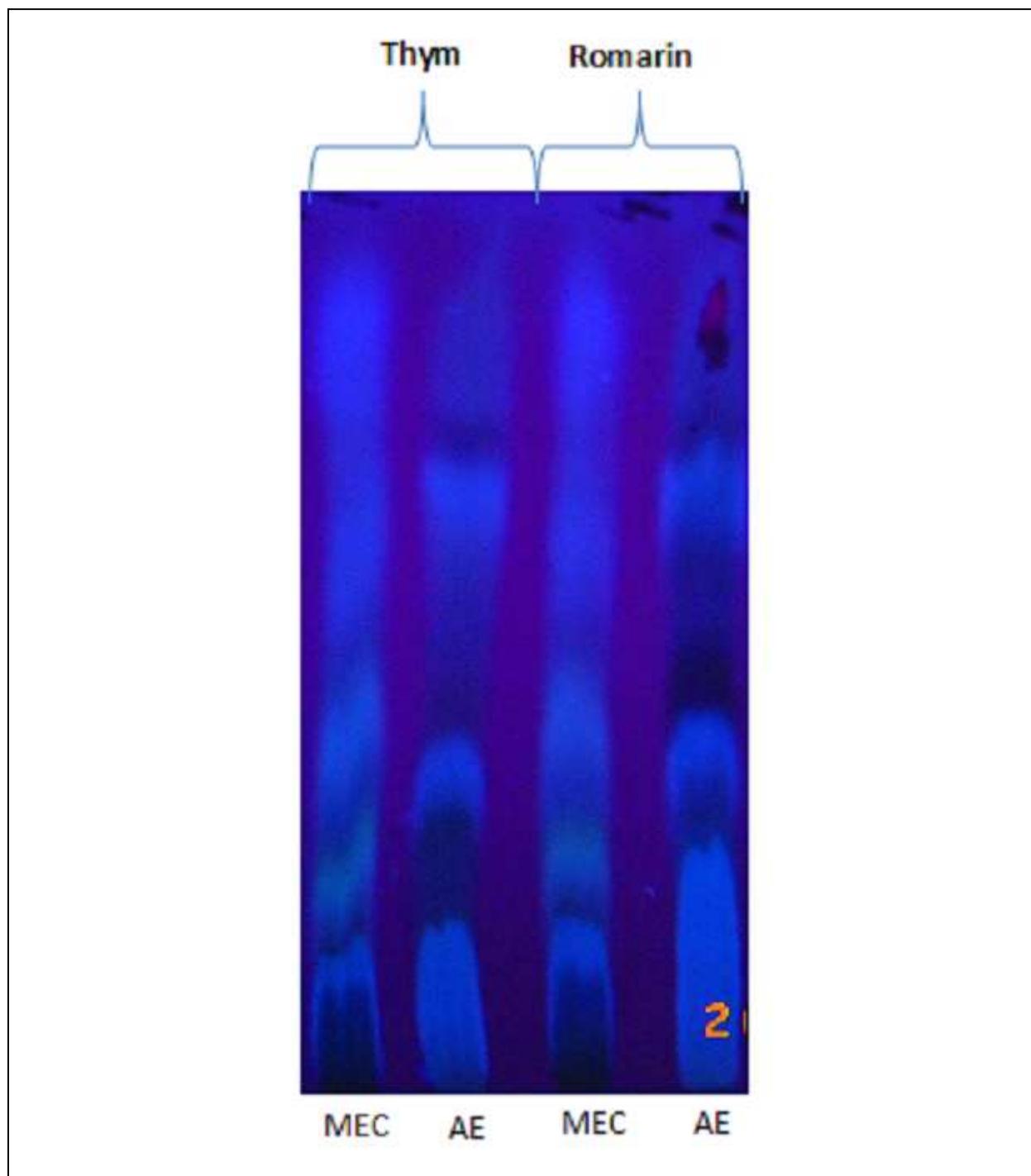


Figure 12 : CCM analytique représentative des flavonoïdes de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* sur plaque de polyamide DC6 développée dans le système solvant (toluène/méthanol/éthanol) (4/3/3)

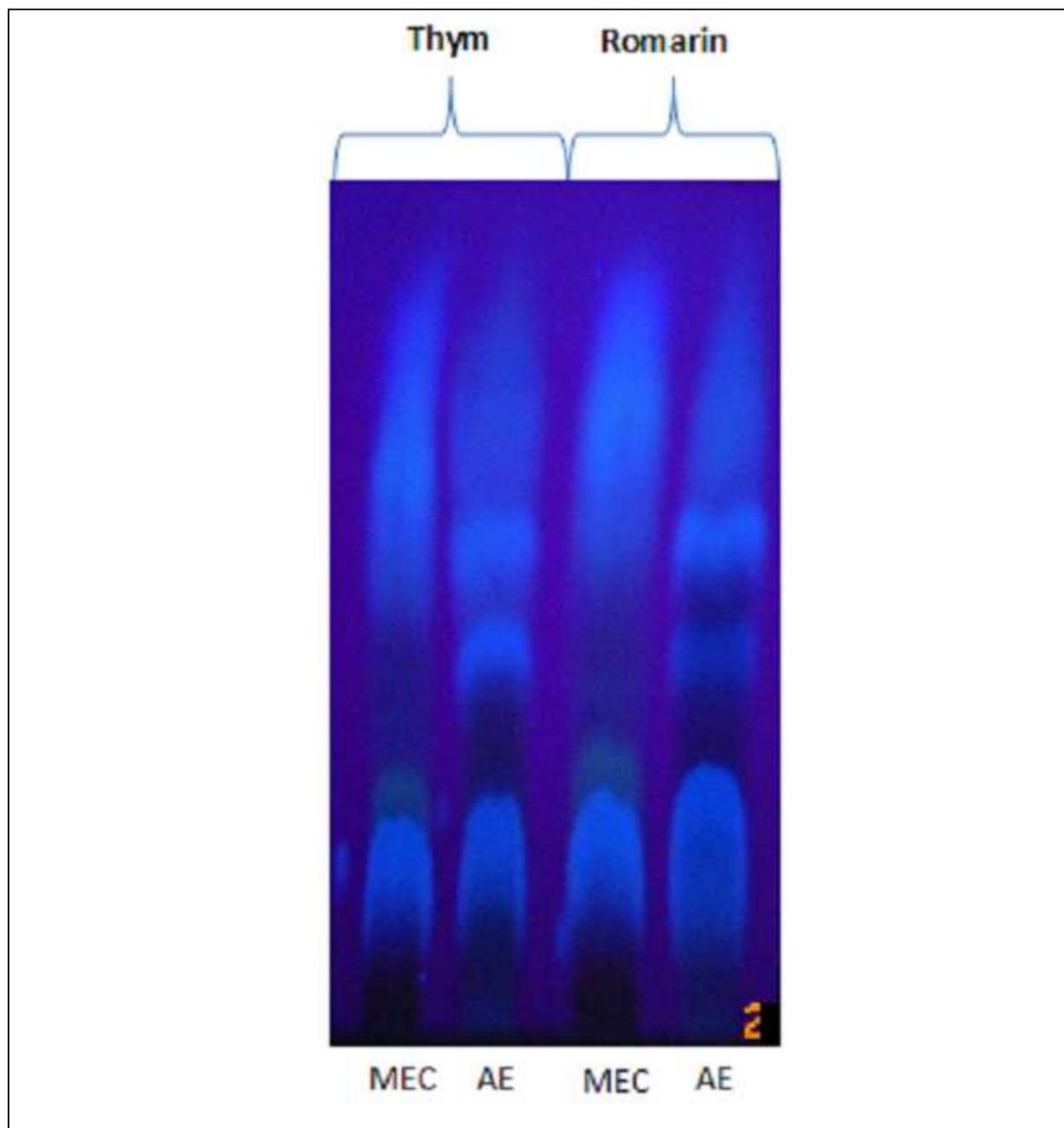


Figure 13 : CCM analytique représentative des flavonoïdes de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* sur plaque de polyamide DC6 développée dans le système solvant (méthanol/eau/acide acétique) (95/5/5)

I-3 / Mise en évidence des flavonoïdes :

La pulvérisation du chromatogramme de gel de silice par une solution éthanolique d' AlCl_3 (1%), révèle l'apparition des taches jaunes, cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes. Ces résultats affirment l'existence des flavonoïdes dans les phases exprimant des taches jaunes.

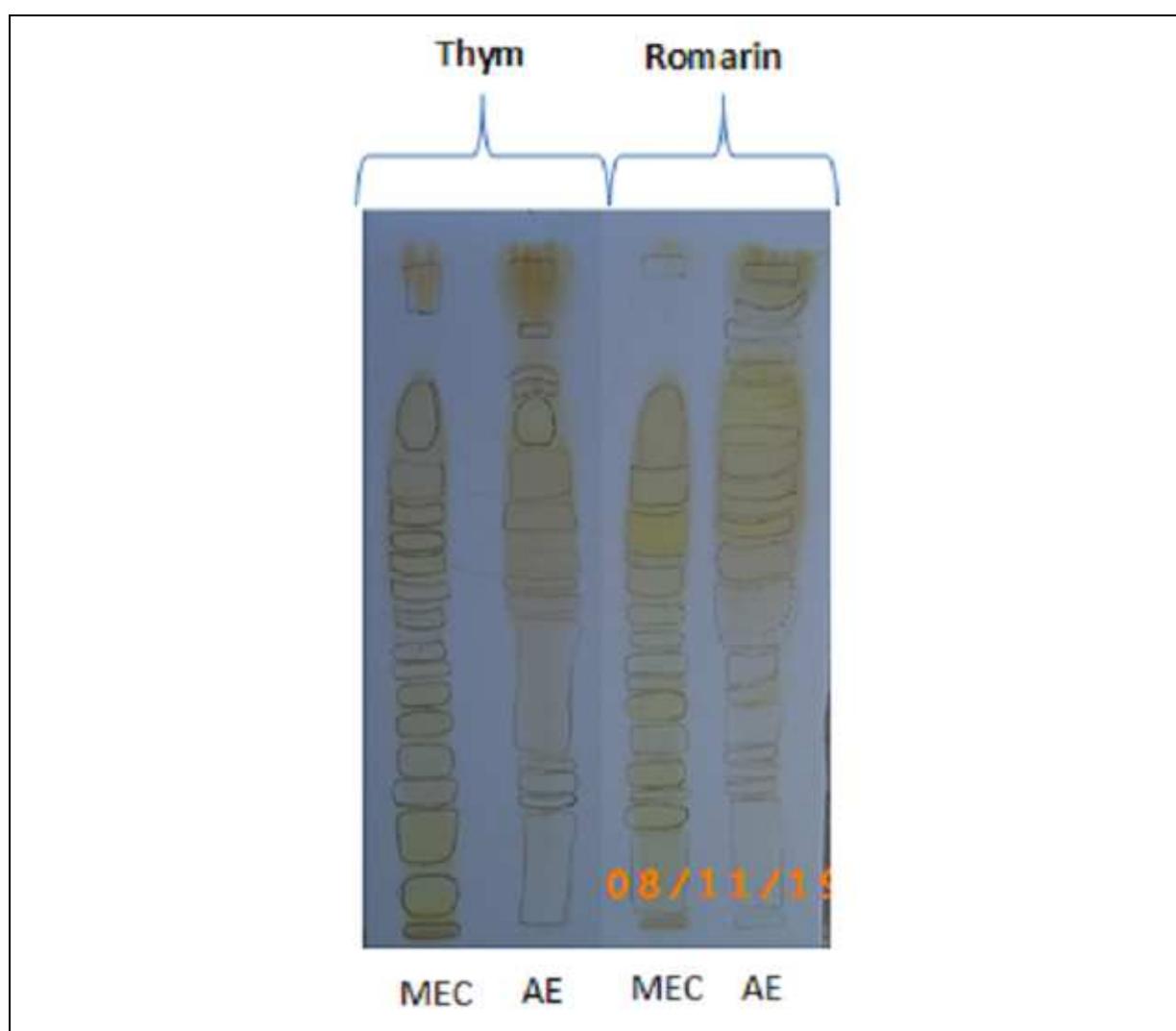


Figure 14 : Comportement chromatographique des phases acétate d'éthyle et MEC de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* sur plaque de silice après pulvérisation par une solution éthanolique d' AlCl_3 (1%), dont les taches jaunes correspondent aux flavonoïdes.

I-4 / Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes :

Le contenu des composés phénoliques a été déterminé par la méthode de Folin ciocalteu. Le romarin présente $10,42 \pm 0,003$ mg EAT/g d'extrait sec de la plante, ces résultats sont presque conformes aux travaux de Muchuweti *et al* (2007), dont ils ont estimé 10,83 mg EAG/g pour l'extrait sec du romarin sur lequel ils travaillaient. Le *Thymus vulgaris* présente $9,07 \pm 0,002$ mg EAT/g d'extrait sec de la plante.

La quantité des composés phénoliques des extraits éthanoliques des plantes étudiées dépend essentiellement : de leur origine (Ebrahimzadeh *et al*, 2008), la variété, la saison de culture, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante (Park et Cha, 2003) et la durée de conservation (Özgüven *et al*, 1998)

La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques en terme de la quercétine équivalent (EQ) est de $8,83 \pm 0,026$ mg/g EQ pour l'extrait sec du romarin, et de $8,56 \pm 0,001$ mg/g EQ pour l'extrait sec du thym.

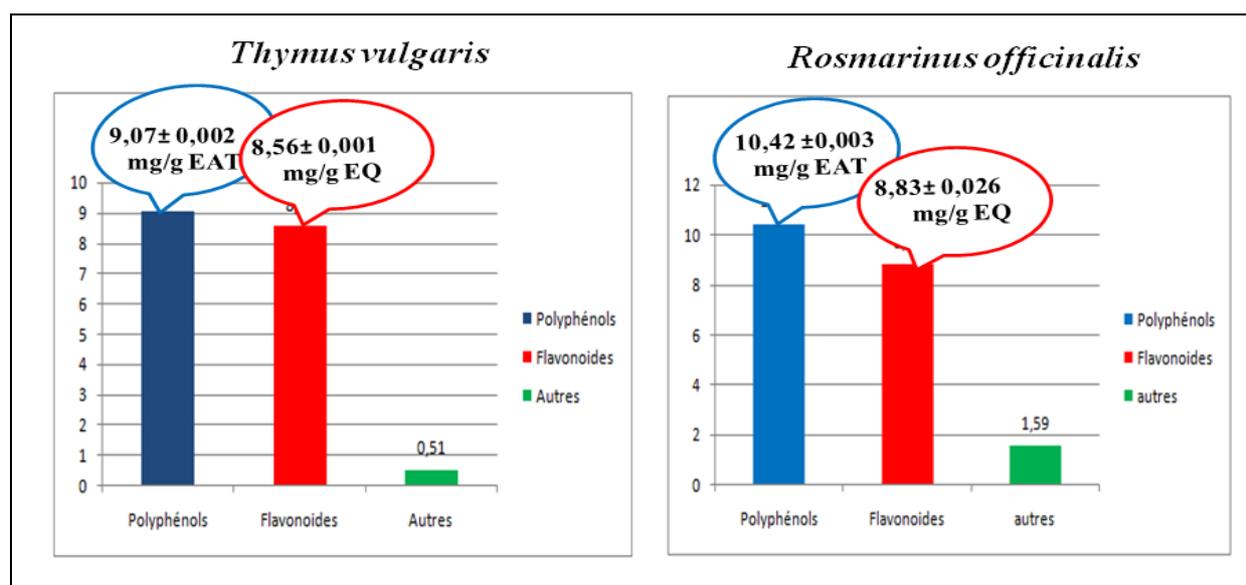


Figure 15 : Le contenu des composés phénoliques et contenu des flavonoides dans *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis*.

I-5 / Les fractions obtenues par les techniques chromatographiques de séparation :

I-5-1 / Les flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* par CC :

La technique de chromatographie sur colonne de polyamide est utilisée pour isoler des flavonoïdes du mélange des deux phases acétate d'éthyle et MEC de *Thymus vulgaris*, dont on a pu collecter 172 fractions de 25 ml, le contrôle de ces fractions sur des plaques de polyamide nous a permis de sélectionner celles qui représentent un seul spot bien distingué sous UV à 365 nm .

Tableau XIV : Le mode d'obtention des différentes fractions isolées de *Thymus vulgaris*, leurs fluorescences sous UV à 365nm, leurs Rf sur des plaques de polyamide ou de silice ainsi que les systèmes solvants qui en sont utilisés pour le développement des chromatogrammes.

Molécules	Systèmes d'éluion (Tol/MeOH) pour la CC	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf	Systèmes solvants pour le développement des plaques
01	(50/50)	Noir	0.68	Tol/MeOH/EtOH/EP (20/15/12.5/2.5)
02	(50/50)	Violet	0.63	Tol/MeOH/EtOH/EP (20/15/12.5/2.5)
03	(50/50)	Violet très clair	0.63	Tol/MeOH/EtOH/Ether de pétrole (20/15/12.5/2.5)
04	(0/100) (5/95)	Violet très clair	0.36	Tol/MeOH/EtOH/EP (20/15/12.5/1)
05	(90/10)	Brun	0.93	Acétate d'éthyle/MeOH/H ₂ O/EP (20/15/12.5/1.5) (plaque de silice)
06	(65/35) (70/30)	Bleu violet	0.93	Tol/MeOH/EtOH/EP (20/15/12.5/2.5)

I-5-2 / Les flavonoïdes isolés de *Rosmarinus officinalis* par la CP :

Les flavonoïdes isolés de *Rosmarinus officinalis* ont été obtenus par la technique de chromatographie sur papier en utilisant comme éluant le système solvant (acide acétique/eau) (50/50 : v/v). Après le développement des chromatogrammes, les bandes correspondant aux composés sont délimitées sous UV à 365 nm.

Tableau XV : Les différentes fractions obtenues de *Rosmarinus officinalis*, leurs fluorescences sous UV à 365nm, ainsi que leurs Rf sur papier Wahtman n°3.

Spots	Fractions	Spot coloré sous UV à 365 nm	Rf
01	A	Bleu violet	0.82
02	B	violet	0.68
03	C	Violet	0.6

I-6 / Identification structurale des flavonoïdes isolés :

I-6-1 / Analyse spectrale des flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* :

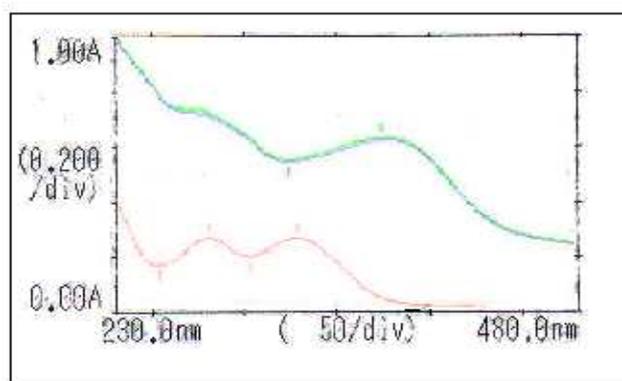
*Molécule 01 :

La fluorescence noire sous UV à 365 nm de la molécule 1 et les pics d'absorption dans la région UV-Vis : BI (329,5 nm) et BII (280,5 nm), nous orientent vers la supposition que cette molécule fait partie des flavonols (3-OH substitué).

Série I :

Les effets bathochromiques (+46.5nm) de la bande I en présence de NaOH, et la stabilité du spectre sont en faveur de la présence d'un OH libre en C4', l'absence de pic entre 320-335nm dans le spectre de NaOH par rapport au spectre méthanol indique que le 7-OH est substitué.

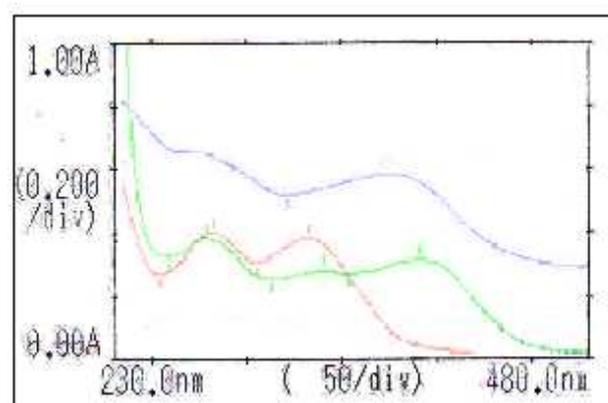
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	280.5	329.5
+NaOH	/	376
NaOH (après 5 min)	/	376



Série II :

Le faible déplacement hypsochromique (-4nm) de la bande II en présence de NaOAc confirme la présence d'une substitution en C7. La comparaison du spectre NaOAc +H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH nous informe sur l'absence du groupe ortho di OH en C3' C4'.

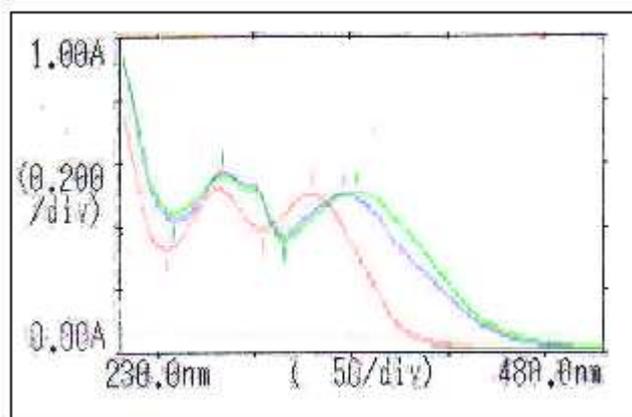
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	280.5	329
NaOAc	276.5	337 386
NaOAc + H ₃ BO ₃	279	332.5



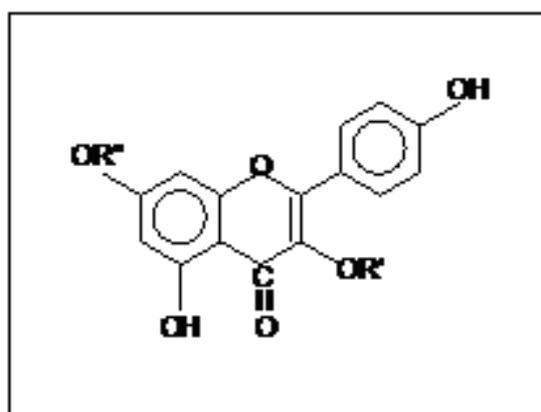
Série III :

L'absence du groupe ortho di OH en C3' C4' est confirmée suite à une comparaison du spectre AlCl_3+HCl par rapport au spectre AlCl_3 : faible déplacement hypsochromique (-5.5 nm). L'effet bathochromique du spectre d' AlCl_3 par rapport au spectre méthanol (+22,5nm) confirme que cette molécule dispose d'un OH libre en C5.

Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	281	329
AlCl_3	283	351.5
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	283.5	346



Structure proposée : d'après tous les critères cités précédemment, on propose donc une schématisation de la molécule 1 comme suit :



Keampférol 3OR', 7OR''

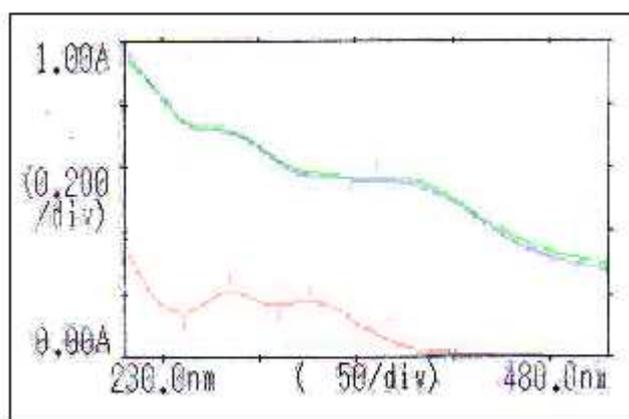
***Molécule 02 :**

Le spectre méthanol de cette fraction donne deux pics, avec un maximum d'absorption à 326 nm pour la bande I et 285.5 nm pour la bande II ainsi que la fluorescence violette de la molécule 1 sous UV à 365 nm nous laissent opter pour un flavone dont le noyau A est polysubstitué.

Série I :

L'addition de NaOH se traduit par un effet bathochromique et hyperchromique de la bande I sans apparition de pic entre 320-335 nm, ces critères indiquent la présence d'un OH libre en C4' et une substitution en C7 respectivement.

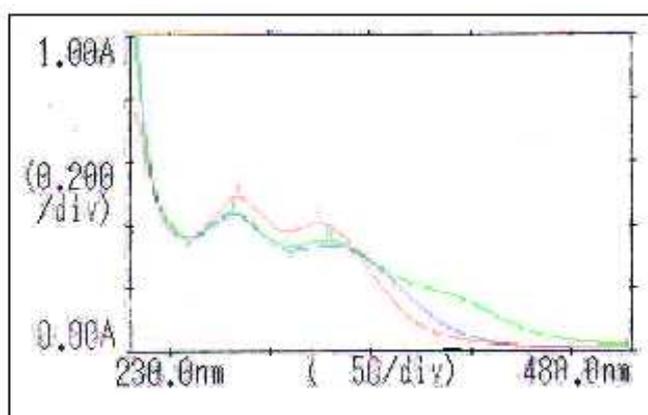
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	285.5	326
+NaOH	/	363
NaOH (après 5 min)	/	/



Série II :

Le très faible déplacement hypsochromique (-2nm) que donne le spectre NaOAc affirme la présence d'une substitution en C7. Le spectre NaOAc+ H₃BO₃ marque un déplacement de (+8 nm), cette caractéristique est significative à la présence d'un groupe ortho di OH en C3' C4' sur le cycle B.

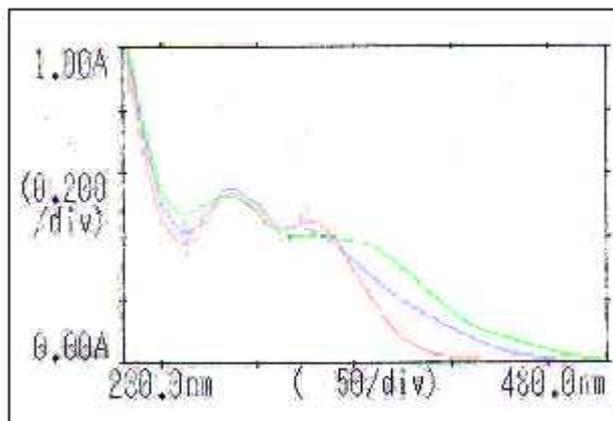
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	285	325
NaOAc	283	330.5
NaOAc + H ₃ BO ₃	284.5	333



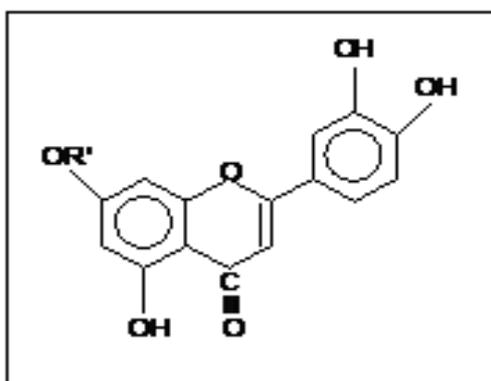
Série III :

L'étude de la troisième série spectrale nous mène à une confirmation de la présence d'un groupe ortho di OH en C3' C4' : un déplacement hypsochromique (-28.5nm) du spectre d'AlCl₃ +HCl, tandis que la comparaison du spectre AlCl₃ /MeOH témoigne la présence d'un OH libre en C5.

Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	285.5	325.5
AlCl ₃	283	/ 350
AlCl ₃ +HCl	286.5	354



Structure proposée : tous les critères discutés précédemment nous mènent à proposer la structure représentée ci-dessous pour la molécule 2, vu de son R_f élevé (0,63) on peut supposer que le R' soit un groupement méthyle.



Lutéoline 7OR'

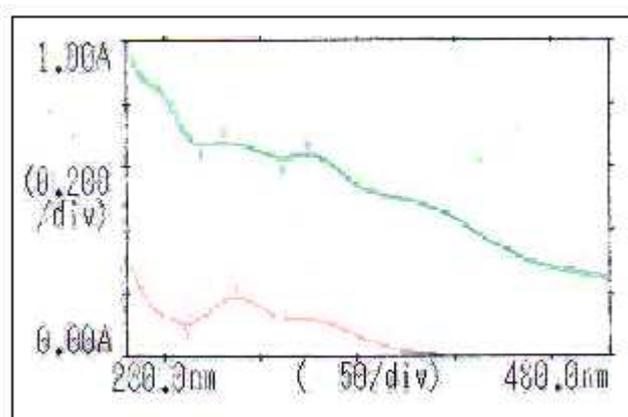
***Molécule 03 :**

Les spectres UV de cette molécule donnent deux pics d'absorption : 321.5 nm (BI) et 281.5 nm (BII), et la fluorescence violette sous UV à 365 nm sont en faveur d'un flavone.

Série I :

Le déplacement bathochromique (+53.5nm) et hyperchromique de la bande I suite à l'addition de NaOH, et l'apparition de pic entre (320-335) nm indiquent respectivement la présence d'un OH libre en C4' et un autre en C7.

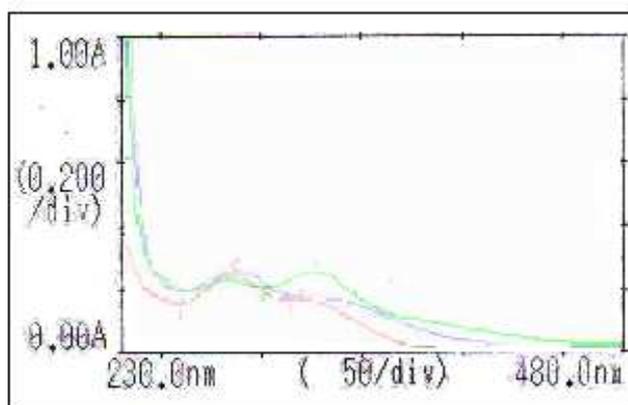
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	287.5	321.5
+NaOH	280	375 323.5
NaOH (après 5 min)	280	323.5



Série II :

La comparaison du spectre NaOAc + H₃BO₃ par rapport au spectre MeOH résulte d'un effet bathochromique (+16nm) ce qui nous informe sur la présence d'un groupe ortho di OH en C3'C4'.

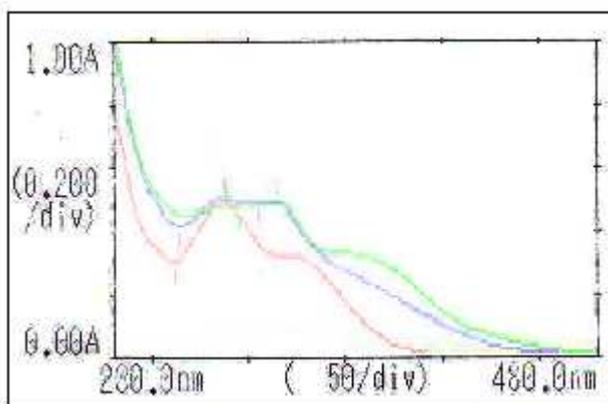
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	287	321.5
NaOAc	284	326.5
NaOAc + H ₃ BO ₃	287.5	337.5



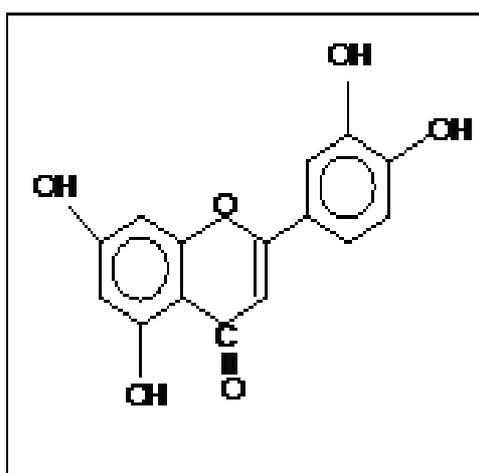
Série III :

Les comparaisons suivantes : $\text{AlCl}_3+\text{HCl}/\text{AlCl}_3$ et $\text{AlCl}_3/\text{MeOH}$ résultent respectivement d'un effet hypsochromique (-50nm) et bathochromique (+41nm) de la bande I ce qui nous informe sur la présence d'un groupe ortho dihydroxy en C3' C4' et sur la présence d'un OH libre en C5.

Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	287.5	321.5
AlCl_3	288	362.5 314.5
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	288	312.5



Structure proposée : d'après les informations obtenues, on peut proposer la structure suivante pour la molécule 3 isolée de *Thymus vulgaris*.



Lutéoline

***Molécule 04 :**

Le spectre méthanolique de la molécule 4 donne deux pics, avec un maximum d'absorption de 332 nm pour la bande I et 283 nm pour la bande II, ce qui nous laisse opter pour un flavonol avec un (3OH substitué). (Les spectres sont représentés dans l'annexe)

Série I :

L'addition de NaOH provoque un déplacement bathochromique de (+48 nm) et hyperchromique traduisant la présence d'un OH libre en C4', l'absence de pic entre (320-335) nm indique la présence d'une substitution en C7.

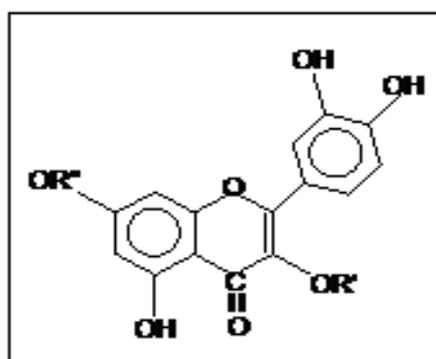
Série II :

L'absence de 7OH libre est confirmée suite à l'addition de NaOAc qui ne provoque qu'un très faible déplacement hypsochromique de la bande II (-0.5nm). L'ajout de H₃BO₃ conduit à un déplacement bathochromique de (+15nm) indiquant la présence d'un groupe ortho di OH en C3'C4'.

Série III :

L'effet bathochromique résulte d'une comparaison du spectre d'AlCl₃ par rapport au spectre méthanol de la bande I (+31nm) indique que la molécule dispose d'un OH libre en C5. Finalement, l'effet hypsochrome (-30nm) en présence d'HCl (AlCl₃+ HCl/ AlCl₃) nous confirme la présence du groupement ortho di OH en C3' C4'.

Structure proposée : Vu que le R_f est de 0.36 dans le système solvant (toluène/méthanol/éthanol /éther de pétrole) (20/15/12,5/1), il est fort possible qu'on ait un sucre en C 3 ou en C 7 sinon les deux. Car la glycosylation fait diminuer les valeurs des R_f.



Quercétine 3OR', 7OR''

Molécule 05 :*Série I :**

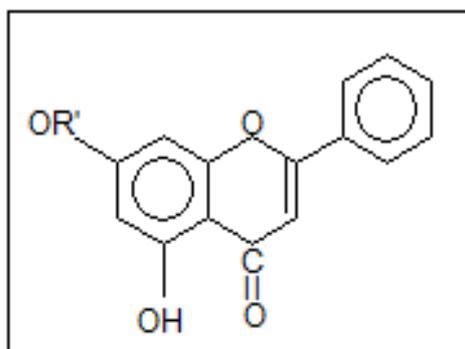
La comparaison du spectre NaOH par rapport au spectre MeOH ne montre qu'un très faible déplacement bathochromique de la bande I (+2.5 nm) ce qui traduit l'absence d'un OH en C4'.

Série II :

La comparaison du spectre NaOAc par rapport au spectre MeOH : pas d'effet ce qui traduit la présence d'une substitution en C7. NaOAc + H₃BO₃/ MeOH ne donne aucun effet, cela peut être due à l'absence du groupe ortho di OH en C3' C4'.

Série III :

L'addition d'AlCl₃ résulte d'un effet bathochromique (+39nm), et une comparaison entre AlCl₃+HCl/MeOH donne un déplacement bathochromique important de (+35nm), ces critères indiquent que la molécule dispose d'un OH libre en C5. La comparaison des spectres AlCl₃+HCl /AlCl₃ résulte d'un faible déplacement hypsochromique (-4nm), ce qui affirme l'absence du groupe ortho di OH en C3' C4'. Vu que le R_f est de 0.93 dans le système apolaire (toluène/éthanol/méthanol /éther de pétrole) (20/15/12,5/1,5), on suppose que cette molécule est polaire, son R' peut être un groupement méthyle.

Structure proposée :**Chrysin 7OR'**

***Molécule 06 :**

Le spectre méthanolique donne un maximum d'absorption à 323.5nm pour la bande I et à 282 nm pour la bande II, et la fluorescence violette de la molécule 6 sous UV à 365nm nous laissent opter pour un flavone. Vu de son R_f élevé (0.93) dans le système solvant apolaire (toluène/éthanol/méthanol /éther de pétrole) (20/15/12,5/2,5), donc il est fort possible qu'au moins l'un de R' ou R'' est un groupement méthyle sinon les deux.

Série I :

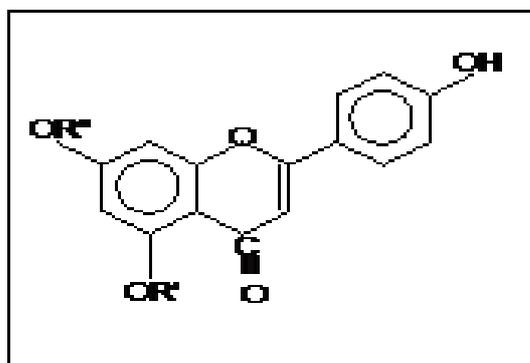
Un déplacement bathochromique (+41.5nm) et hyperchromique sont observés suite à une comparaison du spectre de NaOH par rapport au spectre MeOH, ce qui témoigne la présence d'un OH libre en C4'. L'absence de pic entre (320-335) nm indique la présence d'une substitution en C7.

Série II :

Le faible déplacement hypsochromique de la bande II (-1nm) en présence de NaOAc nous confirme la présence d'une substitution en C7, puis l'ajout de H_3BO_3 ne provoque qu'un très faible déplacement bathochromique (+0.5) de la bande I ce qui témoigne l'absence du groupe ortho di OH en C3' C4'.

Série III :

Le faible déplacement hypsochromique de la bande I ($AlCl_3+HCl/AlCl_3$) confirme l'absence de groupe ortho di OH en C3' et C4'. On suppose aussi que cette molécule ne dispose pas d'un OH libre en C5 car l'addition d' $AlCl_3$ ne provoque qu'un faible déplacement de (+0.5) nm par rapport au spectre méthanol.

Structure proposée :**Apigénine 5OR', 7OR''**

I-6-2 /Analyse spectrale des flavonoïdes isolés de *Rosmarinus officinalis* :***Molécule A :**

Le maximum d'absorption de la bande I se situe à 330.5 nm, celui de la bande II est à 290 nm, et la fluorescence bleue violette sont en faveur d'un flavonol (3OR) au noyau polysubstitué.

Série I :

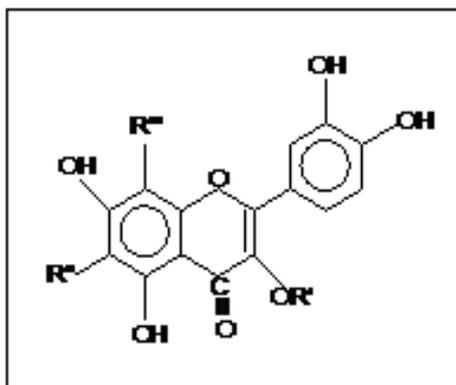
L'effet bathochromique (+45nm) combiné à l'effet hyperchromique de la bande I après addition de NaOH nous informent sur la présence d'un 4'OH.

Série II :

Le NaOAc, une fois ajouté, provoque un déplacement bathochromique important de la bande II cela veut dire que notre molécule dispose d'un OH libre en C7, l'addition de H₃BO₃ résulte d'un effet bathochromique de (+16,5 nm) de la bande I indiquant la présence d'un groupement ortho di OH en C3' C4'.

Série III :

Le déplacement bathochromique (+33.5nm) suite à l'addition d'AlCl₃ indique que la molécule est un flavonol avec un OH libre en C5. La comparaison (AlCl₃+HCl/AlCl₃) résulte d'un déplacement hypsochromique de (-28nm) ce qui affirme la présence d'un groupe ortho di OH en C3' C4'.

Structure proposée :**Quercétine 3OR'**

***Molécule B :**

Le spectre méthanolique nous donne deux maximums d'absorption l'un correspond à la bande I (345 nm) et l'autre est celui de la bande II (271 nm), ces caractéristiques sont en faveur de la présence d'un flavonol au noyau A polysubstitué.

Série I :

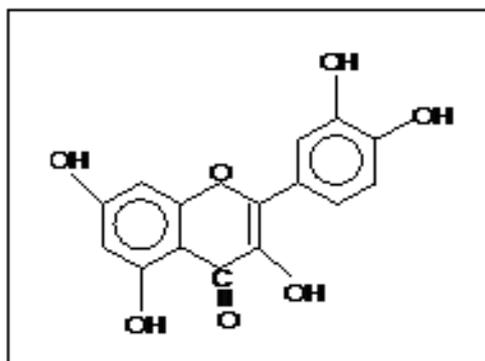
L'addition de NaOH donne un effet bathochromique (+54nm) et hyperchromique de la bande I, avec apparition de pic entre 320-335 nm, signifiant la présence d'un OH libre en C4', et un autre OH libre en C7 respectivement.

Série II :

L'addition de NaOAc provoque un effet bathochromique (+18nm) de la bande II cela confirme la présence d'OH libre en C7, puis l'ajout du H₃BO₃ donne un déplacement bathochromique (+21.5nm) traduisant la présence d'un groupe ortho di OH en 3' et 4'.

Série III :

L'addition d'AlCl₃ provoque un déplacement bathochromique très important (+69nm) de la bande I par comparaison au spectre méthanol ce qui nous permet de déduire que cette molécule dispose d'un OH libre en C3. La présence d'un OH libre en C5 est confirmée par le déplacement bathochromique (+19.5nm) de la bande I suite à l'addition d'HCl. La comparaison du spectre AlCl₃+HCl par rapport au spectre AlCl₃ nous confirme l'existence du groupe 3',4' ortho di OH sur le cycle B, car cette comparaison marque un déplacement hypsochromique important (-49.5nm).

Structure proposée :**Quercétine**

***Molécule C :**

La fluorescence violette sous UV, ainsi que les maximums d'absorption des deux bandes respectivement à 338.5nm (BI) et à 272 nm (BII) sont en faveur de la présence d'un flavone.

Série I :

Le déplacement bathochromique de la bande I (+48nm) provoqué suite à l'addition de NaOH traduit l'existence d'un OH libre en C4'.

Série II :

L'absence de tout déplacement de la bande II suite à l'addition de NaOAc indique la présence d'une substitution en C7, puis l'ajout d' H₃BO₃ conduit à un déplacement de (+10 nm) ce qui signifie la présence d'un groupe ortho di-OH en C3' et C4'.

Série III :

L'addition d'AlCl₃ résulte d'un déplacement bathochromique de (+48.5nm), et une comparaison du spectre AlCl₃+HCl par rapport au spectre MeOH résulte d'un déplacement bathochromique équivalent à (+22nm), ces informations nous laissent opter pour une molécule qui dispose d'un OH libre en C5. La comparaison du spectre AlCl₃+HCl par rapport au spectre AlCl₃ résulte d'un déplacement hypsochromique (-26.5nm), ceci nous juge l'existence d'un groupe di OH en C3' et C4'.

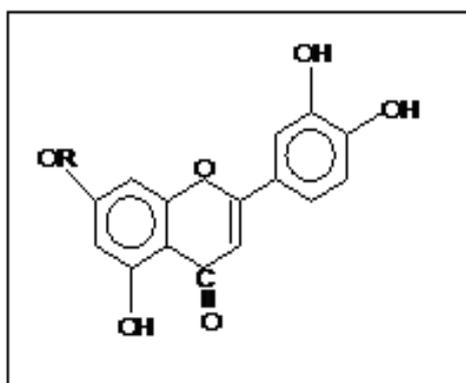
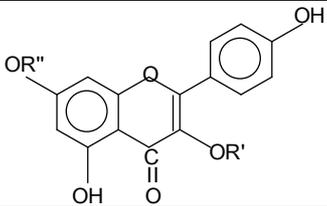
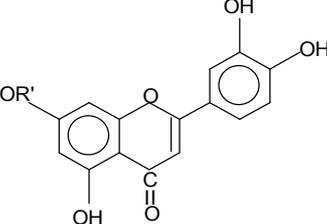
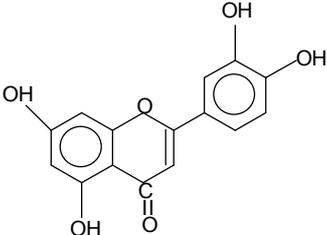
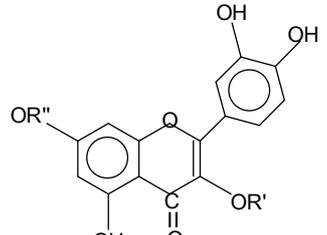
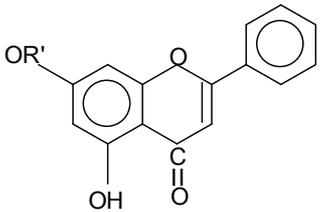
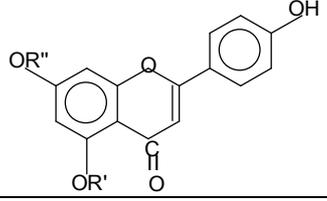
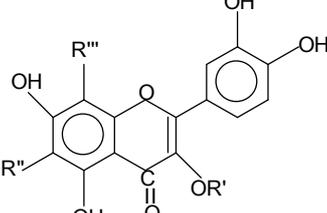
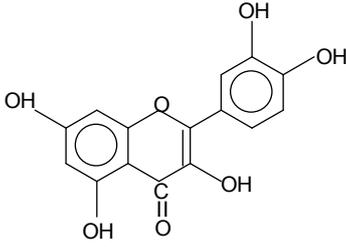
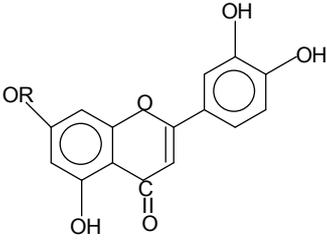
Structure proposée :**Lutéoline 7 OR**

Tableau XVI : Tableau récapitulatif représentant les structures des différents flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* respectivement.

Molécules	Structures	Dénominations
01		Keampférol 3OR' 7OR''
02		Lutéoline 7 OR'
03		Lutéoline
04		Quercétine 3OR' 7OR''
05		Chryisine 7OR'
06		Apigénine 5OR' 7 OR''
A		Quercétine 3 OR'

B		Quercétine
C		Lutéoline 7OR

Chapitre II

Etude des activités biologiques

II-1 / Evaluation du pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* :

L'activité antiradicalaire de nos produits a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanolique de DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance (Perez *et al*, 2007)

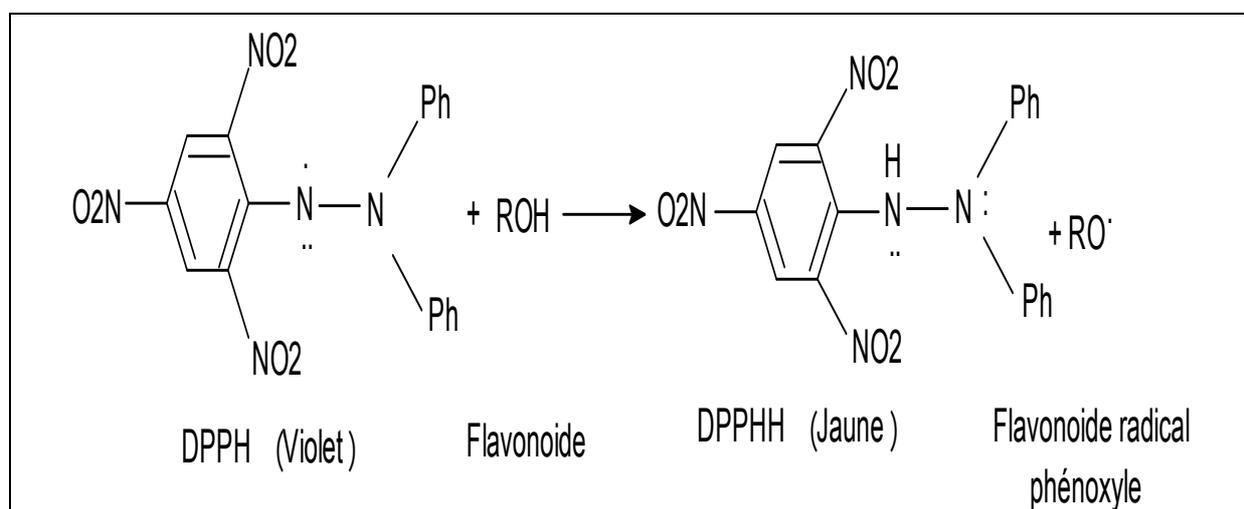


Figure 16 : Piégeage de DPPH par les flavonoïdes (ph : noyau phénolique) (Amić *et al*, 2003)

Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence de chacun des produits flavoniques à tester a été mesuré à 517 nm, les résultats figurant dans les tableaux et les figures ci-après illustrent les pourcentages de l'activité antiradicalaire des principaux flavonoïdes isolés respectivement de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis du radical libre DPPH.

Tableau XVII: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de la quercétine standard et des principaux flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* (Kaempférol 3OR' 7OR'' ; Lutéoline 7OR' ; Lutéoline; Quercétine 3OR' 7OR'' ; Chrysine 7OR' ; Apigénine 5OR' 7OR'') vis-à-vis du radical libre DPPH.

Molécules	Quercétine standard	Molécule 1 Kaempférol 3OR' 7OR''	Molécule 2 Lutéoline 7OR'	Molécule 3 Lutéoline	Molécule 4 Quercétine 3 OR' 7OR''	Molécule 5 Chrysine 7OR'	Molécule 6 Apigénine 5OR' 7OR''
% de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH	93.05%	50.17%	52.58%	58.30%	70.45%	5.66%	50.96%

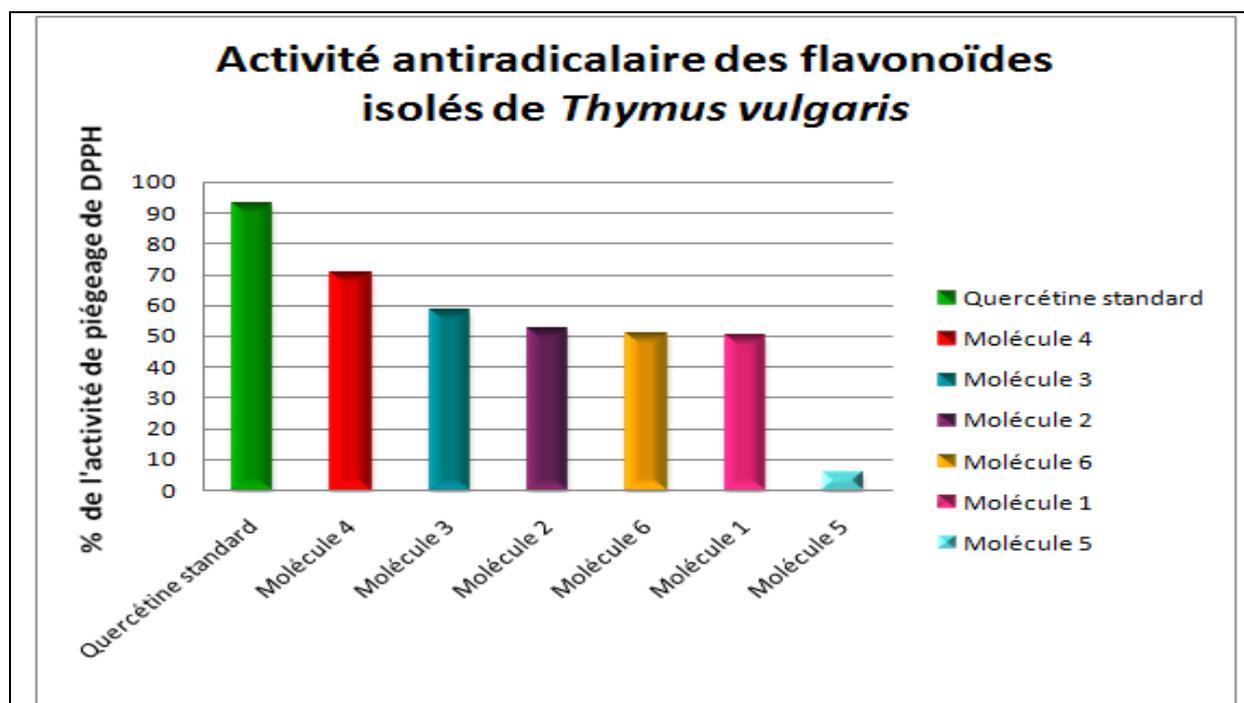


Figure 17 : Pourcentages de l'activité antiradicalaire des principaux flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* classés selon l'ordre décroissant suivant : Quercétine standard (93.05%) > Quercétine 3 OR' 7 OR'' (70.45%) > Lutéoline (58.30%) > Lutéoline 7OR' (52.58%) > Kempférol 3OR' 7OR'' (50.17%) > Apigénine 5 OR' 7OR'' (50.96%) > Chrysine 7OR' (5.66%)

Tableau XVIII: Pourcentages de l'activité antiradicalaire de la quercétine standard et des principaux flavonoïdes isolés de *Rosmarinus officinalis* (Quercétine 3OR' ; Quercétine ; Lutéoline 7OR) vis-à-vis du radical libre DPPH

Molécules	Quercétine standard	Molécule A Quercétine 3OR'	Molécule B Quercétine	Molécule C Lutéoline 7OR
% de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH	93.05%	90.05%	88.18%	87.07%

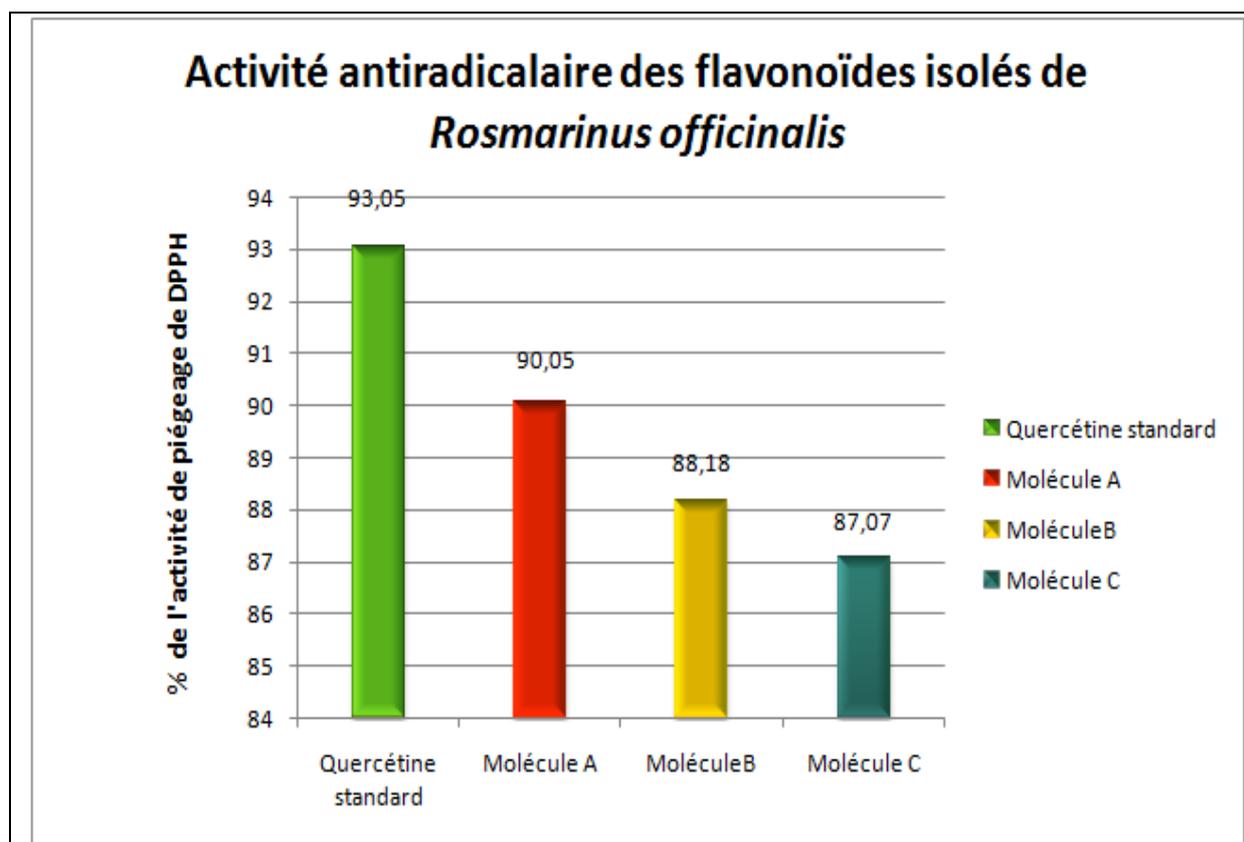


Figure 18 : Pourcentages de l'activité antiradicalaire des principaux flavonoïdes isolés de *Rosmarinus officinalis* classés selon l'ordre décroissant suivant : Quercétine standard (93.05%) > Quercétine 3OR' (90.05%) > Quercétine (88.18%) > Lutéoline 7OR (87.07%)

De nombreuses études ont établi la relation entre la structure et l'activité antiradicalaire des flavonoïdes (Chen *et al*, 1996 ; Rice –Evens *et al*, 1996 ; Sofic *et al*, 1997; Lien *et al*, 1999) in (Amić *et al*, 2003) cette activité nécessite trois critères :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo
- La présence du groupement OH en position 3 et 5 en combinaison avec la double liaison C2-C3 qui donne une activité antiradicalaire maximale

La quercétine satisfait à tous ces critères, dont la quercétine (3OR', 7OR'') isolée du thym, ainsi que celles isolées du romarin (quercétine et quercétine 3OR') possèdent une très bonne activité antiradicalaire contre le radical libre DPPH dont elles présentent un pourcentage de réduction de 70,45% ; 90,05% ; 88,18% respectivement. Certains auteurs supposaient que la capacité de la quercétine à piéger les radicaux libres est en relation directe avec la présence d'une structure O-dihydroxybenzène qui est considérée comme un caractère essentiel pour avoir une activité antioxydante importante (Bors Heller *et al*, 1990) in (Es –Safi *et al*, 2007)

La présence d'un OH libre en C3 améliore énormément cette activité dont de nombreux auteurs annonçaient que le groupe 3OH est le facteur le plus important qui confère aux flavonoïdes une activité antioxydante significative (Van Acker *et al*, 1996 ; Arora *et al*, 1998 ; Heijnen *et al*, 2001) in (Amić *et al*, 2003). Mais nos résultats ont montré le contraire dont l'activité de réduction de la quercétine 3OR' (90.05%) est supérieure à celle de quercétine avec 3OH libre (88,18%) cela peut être expliqué par le fait que le noyau A de la (quercétine 3 OR') est polysubstitué, et il est fort possible que ces substitutions soient des OH libres en C6 et en C8 formant des structures ortho –dihydroxy sur le noyau A, ce qui améliore cette activité antiradicalaire (Rice –Evans *et al*, 1993)

La lutéoline représente également une bonne activité de piégeage contre le radical libre DPPH car elle répond à certains des critères essentiels pour avoir une activité antiradicalaire efficace ; la présence de groupe 3',4' ortho di-OH sur le noyau B, la présence de la double

liaison C2=C3 en conjugaison avec le groupe 4 oxo, et la présence d'un OH libre au niveau du carbone C5 (Oszmiański et Czemerz, 2007)

Les résultats obtenus montrent que la Lutéoline (7OR') du thym représente une activité antiradicalaire équivalente à (52.58%) tandis que celle avec (7OH) donne plus d'activité (58.30%) cela peut être due à l'existence d'un autre OH libre en C7 qui vise à améliorer l'activité de piégeage du radical libre DPPH car plus qu'il y a d'OH libre plus l'activité antioxydante est importante (Sofic *et al*, 1997) in (Es –Safi *et al*, 2007)

Les résultats qu'Amić *et al* (2002) trouvaient pour le pourcentage de réduction de DPPH par la lutéoline commercialisée (87.6%) ressemblent à ceux qu'on a obtenu dont la lutéoline 7OR' du romarin a donné un pourcentage de réduction équivalent à (87,07%).

Les valeurs de l'activité de piégeage du kaempférol (3OR', 7OR'') (50.17%) et d'apigénine (5 OR', 7OR'') (50.96%) isolés du thym sont presque équivalentes, malgré qu'ils appartiennent à deux classes différentes de flavonoïdes (kaempférol est un flavonol tandis que l'apigénine est un flavone) cela peut être expliqué par le fait que l'OH en C3 du kaempférol est substitué et il est fort possible que cette substitution soit un glycoside. Selon Plumb De Pascual –Teresa *et al* (1998) in (Es –Safi *et al*, 2007; Oszmiański et Czemerz, 2007) les aglycones ont plus d'activité par comparaison aux flavonoïdes glycosylés.

D'après les travaux d' Amić *et al* (2003), les résultats montraient que l'apigénine 7-gly (commercialisée) ne représente que (34.8%) d'activité de piégeage alors que l'apigénine (7OR') isolé de notre *Thymus vulgaris* donne plus d'activité (50.96%), donc on peut supposer que la substitution au niveau du carbone C7 soit un groupement méthyle car Rice – Evans *et al* (1995) et Cosio *et al* (2006) suggèrent que les groupements méthyles augmentent la stabilité du radical libre et améliorent l'activité antiradicalaire des flavonoïdes.

II-2 / Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits flavoniques à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter spp*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparaît sensible vis-à-vis des flavonoïdes testés, ces mêmes flavonoïdes développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre (8-18) mm pour *Escherichia coli* (figures 19 et 20), et de (10-15) mm pour *Staphylococcus aureus* (figures 21 et 22)

La sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* traduit l'action antibactérienne des flavonoïdes. En fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libres dont on constate que les flavonoïdes les moins hydroxylés sont les plus actifs, à titre d'exemple le flavonoïde n°5 (qui possède uniquement un seul OH libre au niveau du carbone 5) de *Thymus vulgaris* développe des zones d'inhibition équivalentes à 15 mm pour *Staphylococcus aureus* et 18 mm pour *Escherichia coli*.

Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, donc on peut supposer que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique.

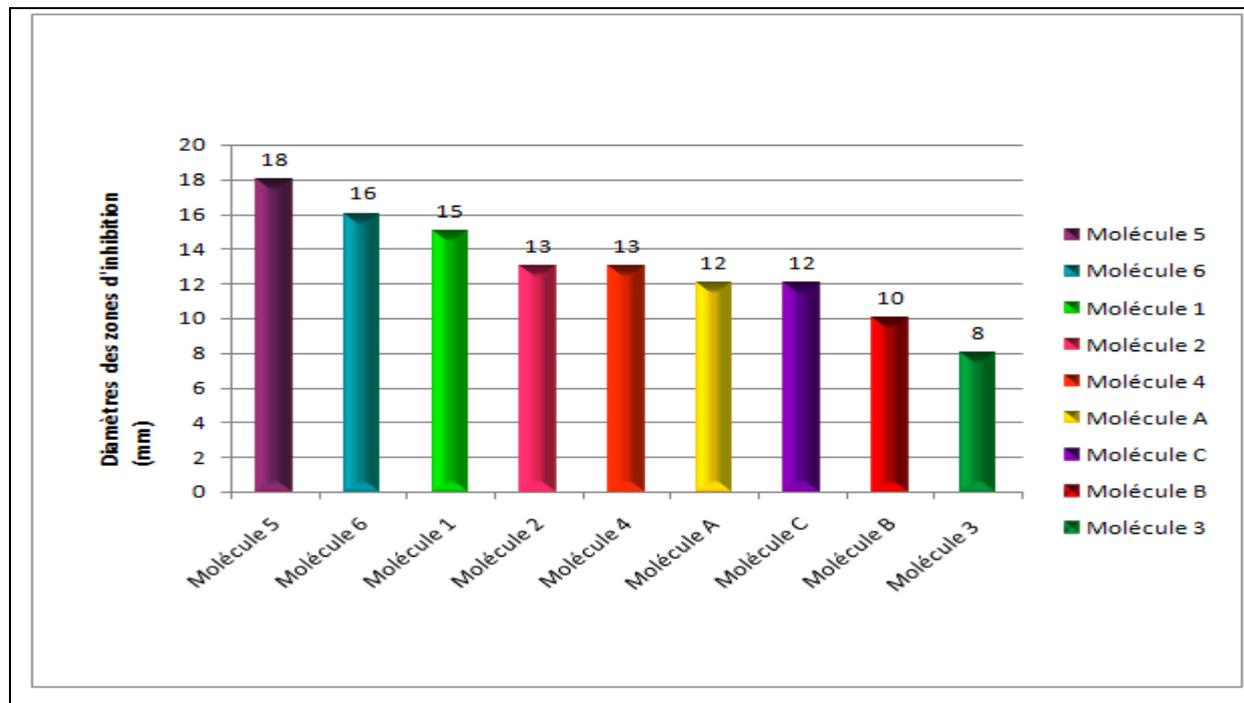


Figure 19 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des principaux flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis d'*Escherichia coli*, classés selon l'ordre décroissant suivant : molécule 5 (1seul OH libre) □ molécule 6 (2OH libres) □ molécule 1 (2OH libres) □ molécule 2 (3OH libres) = molécule 4 (3OH libres) □ molécule A (4OH libres) = molécule C (3OH libres) □ molécule B (5OH libres) □ molécule 3 (4OH libres)

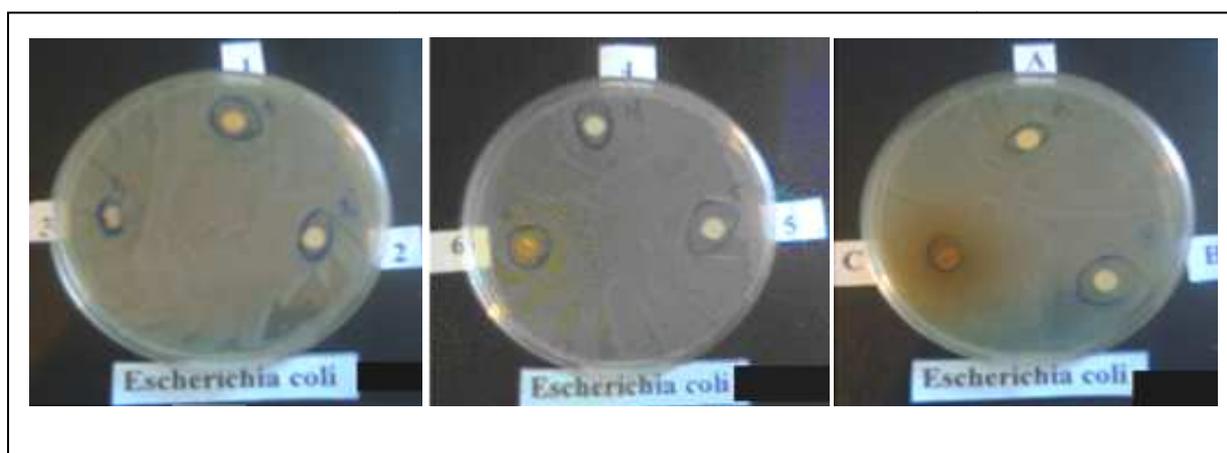


Figure 20 : Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) d'*Escherichia coli* par les flavonoïdes testés.

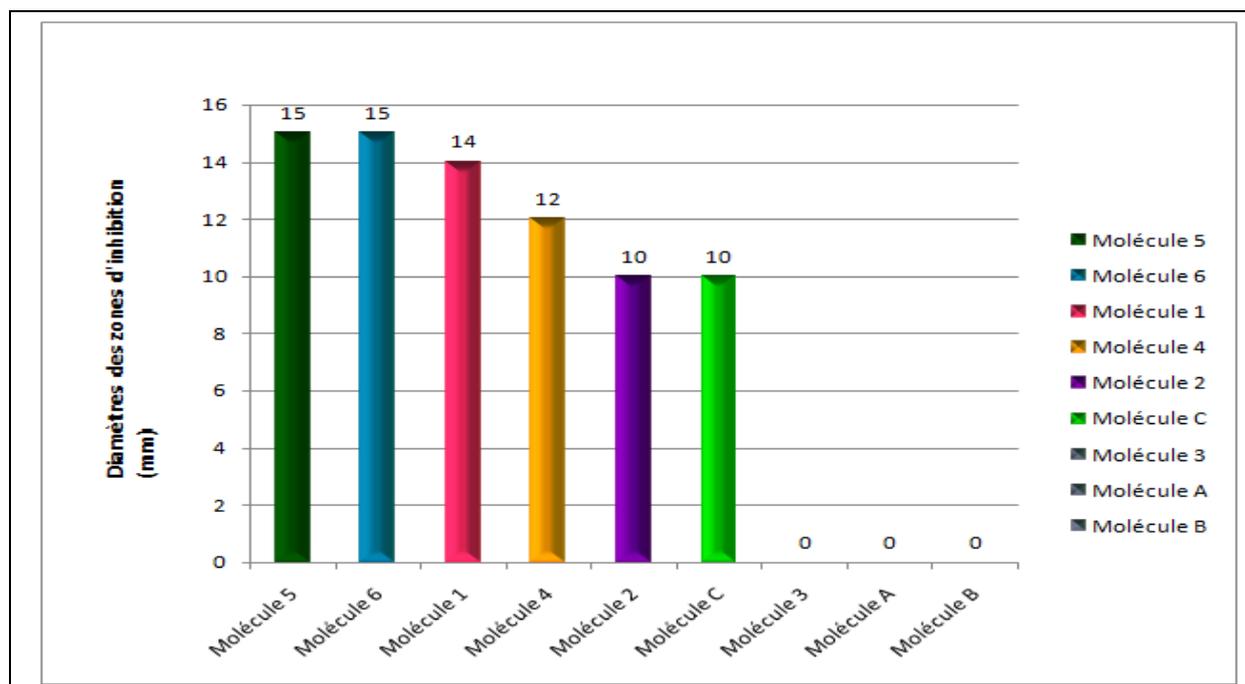


Figure 21 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des principaux flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, classés selon l'ordre décroissant suivant : molécule 5 (1seul OH libre) = molécule 6 (2OH libres) □ molécule 1 (2OH libres) □ molécule 4 (3OH libres) □ molécule 2 (3OH libres) = molécule C (3OH libres) □ molécule 3(4OH libres) = molécule A (4OH libres) = molécule B (5OH libres)
molécule A (4OH libres), molécule B (5OH libres)

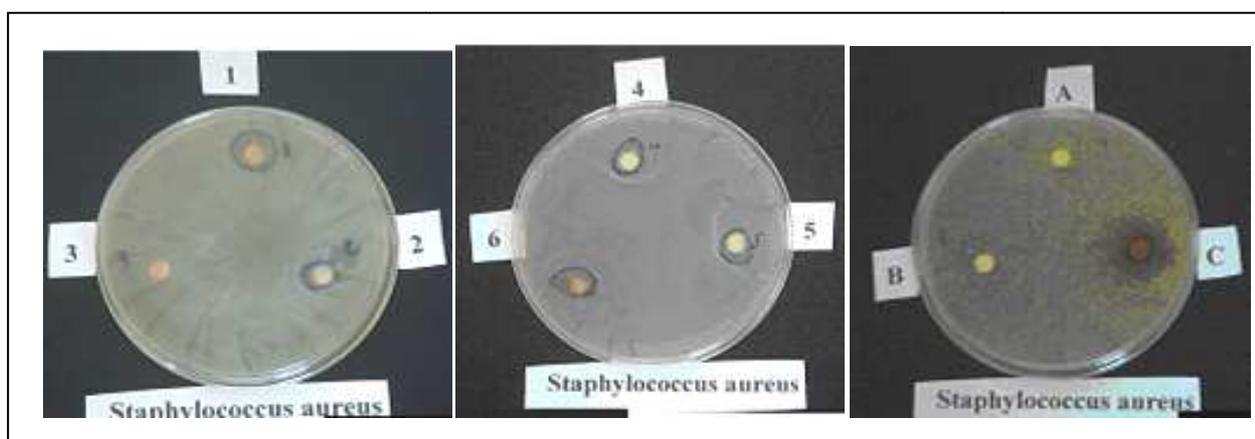


Figure 22 : Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) de *Staphylococcus aureus* par les flavonoïdes testés.

Les résultats obtenus (figures 23 et 24) indiquent que les flavonoïdes du thym et du romarin développent des zones d'inhibition faibles vis-à-vis d'*Enterobacter spp.* Cette insensibilité est expliquée par le fait que cette bactérie est reconnue par sa résistance aux agents antibactériens (Strang, 2006)

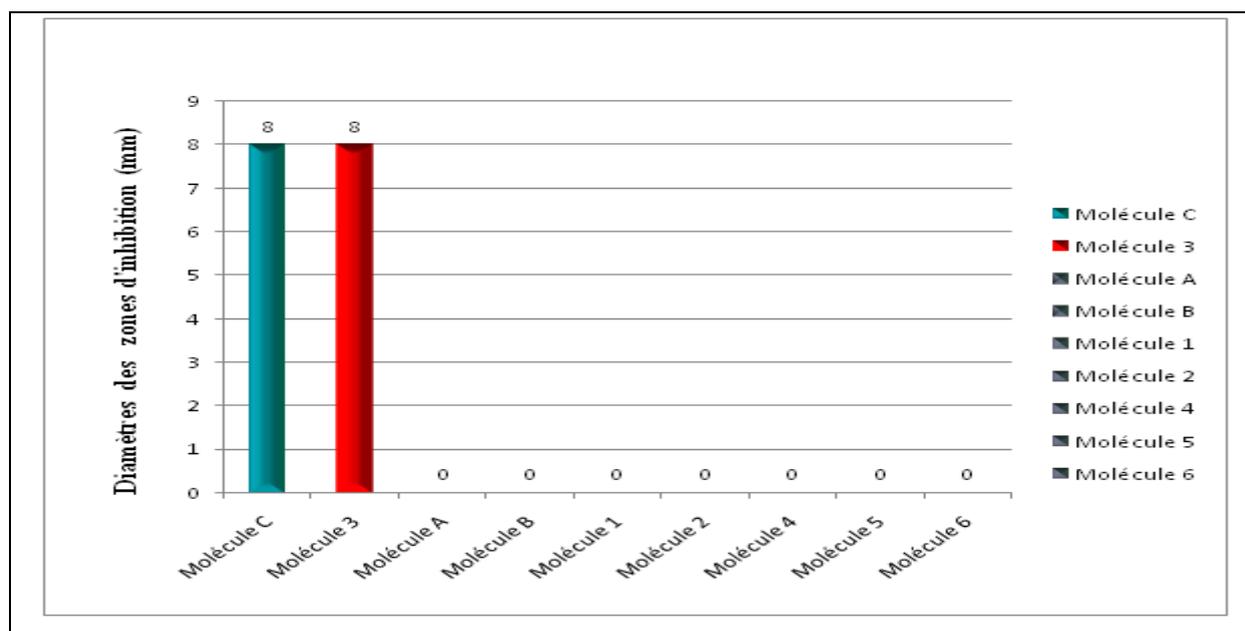


Figure 23 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des principaux flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* vis-à-vis d'*Enterobacter spp*



Figure 24 : Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des flavonoïdes du thym et du romarin vis-à-vis d'*Enterobacter spp.*

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe (la sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* aux flavonoïdes testés) ou une action moindre, voire même nulle sur un autre (la résistance d'*Enterobacter spp*)

L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al*, 2005)

Conclusion

Conclusion :

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Une étude des propriétés antioxydante et antibactérienne a concerné deux plantes, appartiennent à la famille des labiées très fréquemment employées en Algérie.

Les analyses qualitatives effectuées par la chromatographie sur couche mince de gel de polyamide et de silice, ont montré sous UV la présence d'une multitude de variétés de composés phénoliques. Quantitativement, l'évaluation du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin ciocalteu révèle la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que ces deux plantes contiennent principalement des flavonoïdes, ces derniers sont par la suite isolés par des différentes techniques chromatographiques de séparation dont leur structure a été élucidée par une étude directe au spectrophotomètre UV-Vis. Il ressort de ces analyses que les deux plantes *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* sont riches en flavonoïdes de types flavones et flavonols.

Le potentiel antiradicalaire des flavonoïdes isolés a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces flavonoïdes possèdent une bonne activité, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires. Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antibactérien vis-à-vis de quelques germes pathogènes, les résultats microbiologiques ont montré que les flavonoïdes du thym et du romarin agissent différemment sur les espèces bactériennes testées.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, de cet effet, et comme perspectives on propose de :

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.

- Développer des médicaments antiradicalaires à base des plantes, doués d'une activité antioxydante.

- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des composés polyphénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.

Références bibliographique

- Adesegun S. A., Fajana A., Orabueze C. I. et Coker H. A. B.** 2007. Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* C B Cl (Acanthaceae). *Evidence based complementary and alternative medicine.*, **6** (2) : 227-231.
- 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.
- Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. et Trinajstić N.** 2003. Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76** (1) : 55-61.
- André R., Bailleul F., Delveau P., Paris R. R. et Jaquemin H.** 1976. Etude chimique du danais fragrain gaertii (Rubiaceae). *Plantes médicinales et phytothérapie.*, **9** (2) : 110-118.
- Aruoma O. I., Spencer J. P., Rossi R., Aeschbach R., Khan A., Mahmood N., Munoz A., Murcia A., Butler J. et Halliwell B.** 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herb. *Food and Chemical Toxicology.*, **34** (5) : 449-456.
- Aurangzeb H. et Muhammed Nawaz T.** 2005. Flavonoids from the leaves of *Impatiens bicolor*. *Turkish journal of chemistry.*, **29** : 65-70.
- Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B. et Odugbemi T. O.** 2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International journal of health research.*, **1** (2) : 81-93.
- Bandyukova V. A. et Shinkareako A. L.** 1973. The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds.*, **9** (1) : 17-21.

Bazytko A. et Strzelecka H. 2007. A HPTLC densitometric determination of luteolin in *Thymus vulgaris* and its extracts. *Fitoterapia.*, **78** : 391-395.

Benkiki N. 2006. Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat de l'université Haj Lakhdar de Batna.

Bernardi A. P. M., López-Alarcón C., Aspee A., Rech S., Von Poser G. L., Bride R. et Lissp E. 2007. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the chilean chemical Society.*, **52** (4) : 1326-1329.

Besle J. M., Lamaison J. L., Pradel P., Fraisse D., Viala D. et Martin B. 2004. Les flavonoïdes des fourrages au lait. *Rencontres Recherches Ruminants.*, **11** : 67-70.

Bhat S. V., Nagasampagi B. A. et Sivakumar S. M. 2004. Chemistry of natural products. Ed Springer. p592.

Bietrix J. 2004. Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l'arthrose du cheval. Thèse de docteur vétérinaire de l'université Claude-Bernard de Lyon. p51.

Boudet A. M. 2000. L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France. p1-16.

Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J. V. 2005. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of biological chemistry.*, **280** (7) : 5636-5645.

Bylka W., Mathawska I. et Pilewski N. A. 2004. Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association.*, **7** (2) : 24-26.

- Cavero S., Jaime L., Martín-Álvarez P. J., Señoráns F. J., Reglero G. et Ibañez E.** 2005. *In vitro* antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). *European food research and technology.*, **221**: 478-486.
- Cheung S. et Tai J.** 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosmary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology reports.*, **17** (6) : 1525-1531.
- Cosio M. S., Buratti S., Mannino S. et Benedetti S.** 2006. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food chemistry.*, **97** (4) : 725-731.
- Cowan M. M.** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews.*, **12** (4) : 564-570.
- Decloitre F.** 1993. Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. *Cahiers de Nutrition et de diététique.*, **28** (2) : 85-95.
- Del Baño M. J., Lorente J., Castillon J., Benavente-Gracia O., Marin M. P., Del Rio J. O., Ortuño A. et Ibarra I.** 2004. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*, postulation of a biosynthetic pathway. *Journal of agricultural and food chemistry.*, **52** (16) : 4987-4992.
- Depeint F., Gee J. M., Williamson G. et Johnson I. T.** 2002. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proceeding of the Nutrition Society.*, **61** : 97-103.
- Dordević S., Cakić M. et Amr S.** 2000. The extraction of apigenin and luteolin from the sage *Salvia officinalis* L from Jordan protection. *The scientific journal FACTA UNIVERSITATIES.*, **1** (5) : 87-93.

Dulger B. et Gonuz A. 2004. Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences.*, **7** (9) : 1559-1562.

Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F. et Hafezi S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology.*, **32** : 43-49.

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.

Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferriro M. J. P. 2007. Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society.*, **18** (5) : 891-899.

Es –Safi N. E., Kollmann I., Khlifi S. et Ducrot P. H. 2007. Antioxidants effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L Structure-activity relationship. *LWT-Food science and technology.*, **40** : 1246-1252.

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., 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.

Floss H. G. 1997. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports.*, **14** : 433-434.

Fosting Matene S. 2005. Etude phytochimique et activités biologiques de *Maerua angolensis* DC (Capparidaceae). Thèse de docteur en pharmacie de l'université de Bamako. p77-79.

Ghedira k. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, **3** (4) : 162-169.

Golmakani M. T. et Rezaei K. 2008. Comparaison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food chemistry.*, **109** : 925-930.

González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, **22** (3) : 287-293.

Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M. et Moilanen E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids : genistein, kaempferol, quercetin and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation.*, **2007** (1) : 1-10.

Hans W. K. 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.

Herrero M., Arráez-Román D., Segura A., Kenndler E., Gius B., Raggi M. A., Ibáñez E. et Cifuentes A. 2005. Pressurized liquid extraction–capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosmary extracts. *Journal of chromatography A.*, **1084** : 54-62.

Hertog M. G. 1996. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society.*, **55** (1B) : 385-397.

Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. et Legrand M. 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*, **16** (6) : 1446-1465.

Hollman P. C. H. 2001. Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture.*, **81** : 825-842.

Huang M. T., Ho C. T., Wang Z. Y., Ferraro T., Lou Y. R., Stanber K., Ma W., Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Rizenthaler C., Meyer D., Lepierre C., Pollet B. et Legrand M. 1994. Silencing of Hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*, **16** (4) : 1446-1465.

Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P. 1998. Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany.*, **49** (323) : 953-965.

Ibañez E., Cifuentes A., Crego A. L., Señoráns F. J., Cavero S. et Reglero G. 2000. Combined use of supercritical fluid extraction, Micellar electrokinetic chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). *Journal of Agricultural and Food chemistry.*, **48** (9) : 4060-4065.

Ibañez E., Kubátová A., Señoráns F. J., Cavero S., Reglero G. et Hawthorne S. B. 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosmariny Plants. *Journal of Agricultural and Food Chem.*, **51** (2) : 375-382.

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001. Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

Jiménez-Arellanes A., Martínez R., García R., León-Díaz R., Aluna–Herrera J., Molina –Salinas G. et Said-Fernández S. 2006. *Thymus vulgaris* as a potential source of antituberculosis compounds. *Pharmacologyonline.*, **3** : 569-574.

Kaabouche Z. 2007. Cours et exercices de chromatographie. Ed Dar el fadjr. p109.

Karaali A., Boyacıoğlu D., Günez G. et Özçelik B. 2004. Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.

Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. 2005. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11 novembre. Ouagadougou.

Kening Y., Vincenzo D. L. et Normand B. 1995. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell.*, **7** : 1787-1799.

Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S. 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences.*, **96** (3) : 229-245.

Lahouel M. 2005. Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.

Latifou L. 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.

Lemonica I. P., Damasceno D. C. et Di-Stasi L. C. 1996. Study of the embryotoxic effects of an extract of Rosmary (*Rosmarinus officinalis*). *Brazilian journal of medical and biological research.*, **29** (2) : 223-227.

Lin J. K. et Weng M. S. 2006. The science of flavonoïds : Flavonoïds as nutraceuticals. Ed Springer. p 213.

Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C. 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

Maleš Z., Medić-Šarić M. et Bucar F. 1998. Flavonoids of *Guiera senegalensis* J F GMEL–Thin layer chromatography and numerical methods. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **71** (1) : 69-79.

Malešev D. et Kuntić V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society.*, **72** (10) : 921-939.

Manach C. 1998. Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse de doctorat de l'université de Clermont Ferrand France.

Marfek A. 2003. Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.

Markham K. R. 1982. Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press. p6-10.

Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. et Monar A. 2004. Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **77** (1-2) : 361-366.

Mehibel M. 2006. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des polyphénols extraits de *Rosmarinus officinalis* et *Quercus suber* de la région de Jijel. Mémoire de magistère de l'université de Jijel.

Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C. et Voirin B. 1995. Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry.*, **38** (3) : 637-640.

- Middleton E., Kandaswami C. et Theoharides T. C.** 2000. The effects of plants flavonoids on mammalian cells : Implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews.*, **52** (4) : 673-751.
- Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S.** 2005. Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.
- Ming H.** 2007. Commentary : bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *molecular pharmaceutics.*, **4** (6) : 803-806.
- Muchuweti M., Kativu E., Mupure C. H., Chidewe C., Ndhala A. R. et Benhura M. A. N.** 2007. Phenolic composition and antioxidant properties of some species. *American journal of food technology.*, **2** (5) : 414-420.
- Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R.** 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology.*, **33** : 2-16.
- Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M.** 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition.*, **74** : 418-425.
- Offord E. A., Macé K., Ruffieux C., Malnoë A. et Pfeifer A. M.** 1995. Rosmary components inhibit benzo [a] pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis.*, **16** (9) : 2057-2062.
- Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K. et Yaghi A.** 1994. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry.*, **37** (5) : 1463-1466.

Oszmiański J. et Czemyryz R. 2007. Antioxidant Activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry.*, **105** (3) : 940-949.

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.

Özgüven M. et Tansi S. 1998. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L as influenced by ecological and ontogenetical variation. *The Turkish journal of agriculture and forestry.*, **22** : 537-542.

Paris A., Strukelj B., Renko M., Turk V., Pukl M., Umek A. et Korant B. D. 1993. Inhibition effects of carnosic acid on HIV-I protease in cell free assays. *Journal of natural products.*, **56** (8) : 1426-1430.

Park H. J. et Cha H. C. 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society.*, **7** : 327-330.

Parekh J. et Chanda S. V. 2007. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology.*, **31** : 53-58.

Pérez M. B., Calderón N. L. et Croci C. A. 2007. Radiation–induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosmary (*Rosmarinus officinalis* L). *Food chemistry.*, **104** : 585-592.

Pincemail J., Meurisse M., Imet R. L. et Defraigne J. O. 1999. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *vaisseaux, cœur, poumons.*, **4** (4).

Piquemal G. 2008. Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215

Ramirez P., Señoráns F. J., Ibañez E. et Reglero G. 2004. Separation of rosmmary antioxidants compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns. *Journal of chromatography A.*, **1057** : 241-245.

Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. et Zhang L. 2003. Flavonoids : Promising anticancer agents. *Medicinal research reviews.*, **23** (4) : 519-539.

Rice-Evans C. et Burdon R. 1993. Free radical interactions and their pathological consequences. *Progress in lipid resaerch.*, **32** (1) : 71-110.

Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A. et Jordán M. J. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control.*, **19** : 681-687.

Sarni-Manchado P. et Cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. p2- 10.

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.

Sine J. P. 2003. Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses editions marketing S A. p 99-101.

Singletary K. W. et Nelshoppen J. M. 1991. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) induced mammary tumorigenesis and of *in vivo* formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. *Cancer lettres.*, **60** (2) : 169-175.

Souza C. R. F., Schiavetto I. A., Thomazini F. C. F. et Oliveira W. P. 2008. Processing of *Rosmarinus officinalis* linne extract on spray and spotted bed dryers. *Brazilian journal of chemical engineering.*, **25** (1) : 59-69.

Strang C. 2006. Larousse medical. Ed Larousse.

Subsamanian S., Stacey G. et Yu O. 2007. Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science.*, **12** (7) : 282-283.

Takeuchi H., Lu Z. G. et Fujita T. 2004. New monoterpenes glycoside from the aerial parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L). *Bioscience, biotechnology and biochemistry.*, **68** (5) : 1113-1134.

Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B. 2008. Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research.*, **7** (3) : 1089-1099.

Teissedre P. L., Vizzini M. I., Di Mago D., La Neve I., Giammanco S., La Guardia M. et Ginmanco M. 2007. Composition de vins rouges siliciens et leurs propriétés nutraceutiques. 8th international enology symposium. June 25, 26 and 27. Bordeaux.

Tiqwari, A. K. 2001. Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science.*, **81** (9) : 1179-1181.

Tsai T. H., Tsai P. G. et Ho S. C. 2004. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used species. *Journal of food science.*, **70** (1) : C93-C97.

Urquiaga I. et Leighton F. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*, **33** (2) : 55-64.

Van Den Broucke C. O., Dommissse R. A., Esmans E. L. et Lemli J. A. 1982. Three methylated flavones from *Thymus vulgaris*. *Phytochemistry.*, **21** (10) : 2581-2583.

Verhoeven M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. et Colliver S. 2002. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.*, **53** (377) : 209 -210.

Voirin B. 1983. UV Spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-hydroxy-3-methoxy flavones with mono-(4'), di-(3'-4') or tri-(3', 4', 5')-substituted B rings. *Phytochemistry.*, **22** (10) : 2107-2145.

W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., WilliamsonG. et Burrowes J. 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, **137** (3 supp 1) : 718 s-737 s.

Wang W., Wu N., Zu Y. G. et Fu Y. J. 2008. Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. *Food chemistry.*, **108** (3) : 1019-1022.

Wikipédia. 2008. L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>

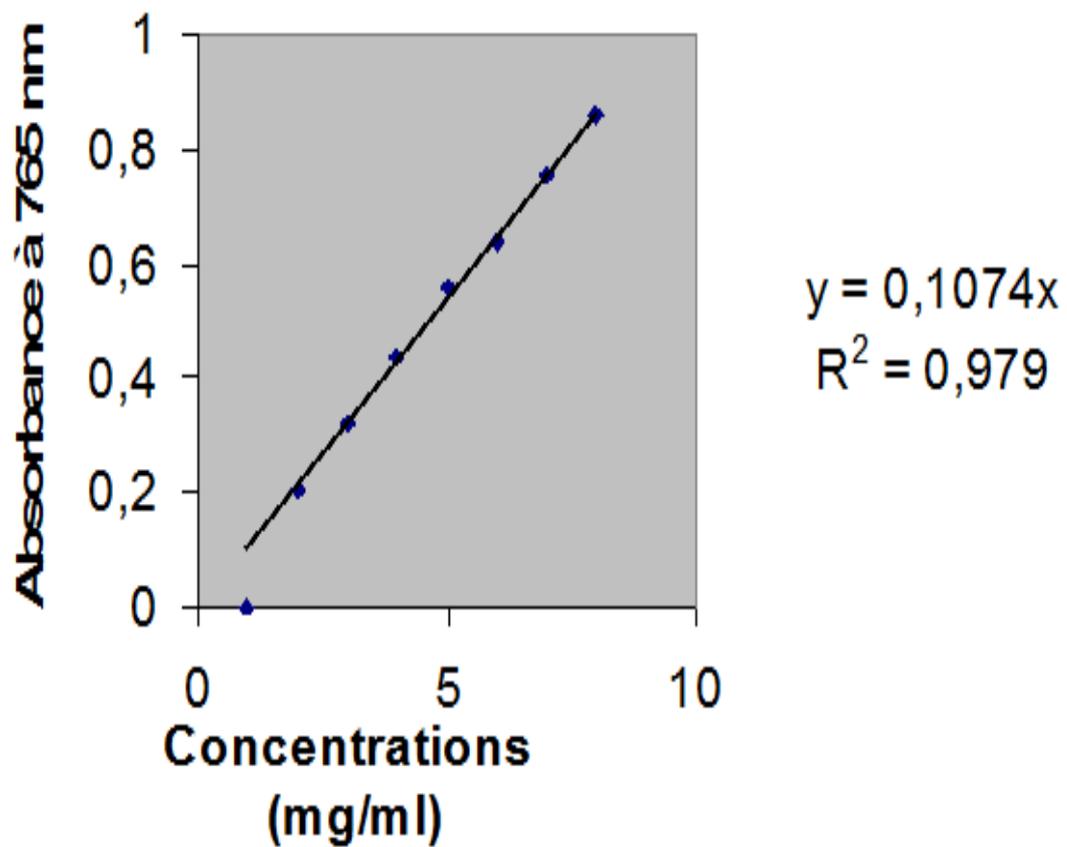
Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology.*, **126** : 485-493.

Wissemann H. 1999. The bioavailability of non-nutrient plant factors : dietary flavonoids and phyto-oestrogens. *Proceeding and Nutrition Society.*, **58** : 139-146.

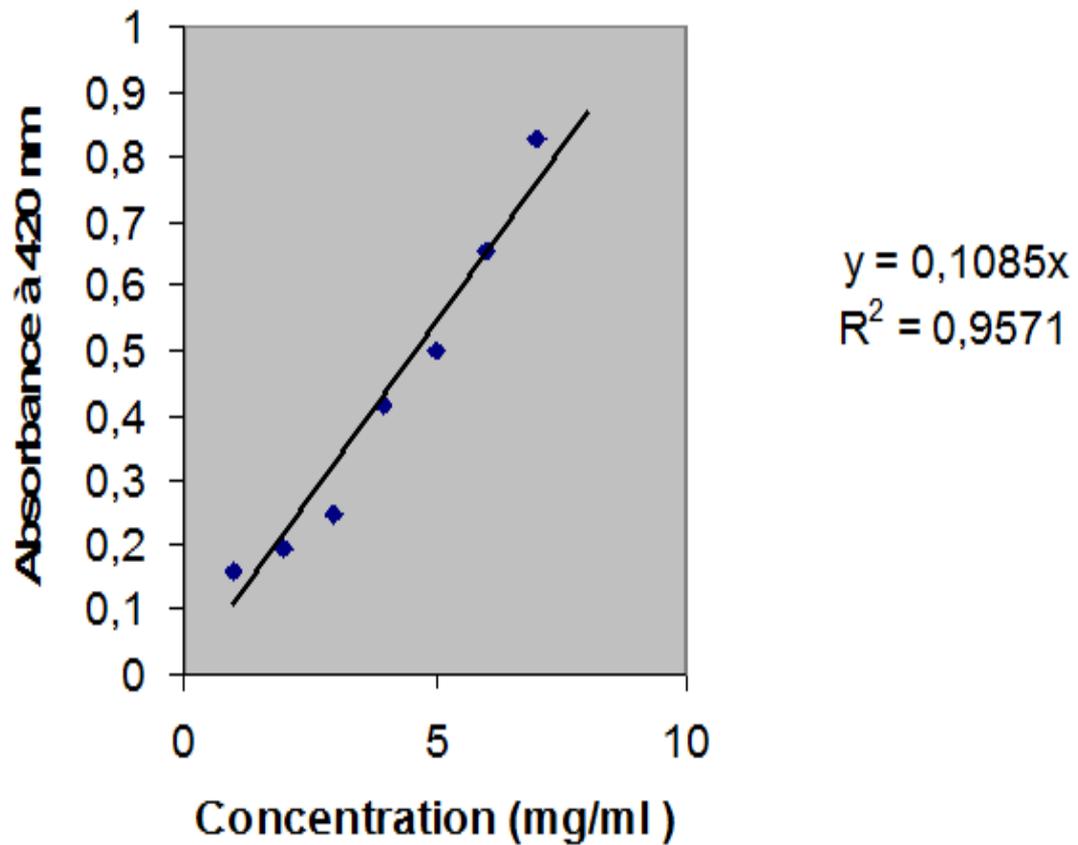
Yang R. Y., Lin S. et Kuo G. 2008. Content and distribution of flavonoids among 91 edibles plant species. *Asia of pacific journal of clinical nutrition.*, **17** (S1) : 275-279.

Annexes

La courbe d'etalonnage de l'acide tannique

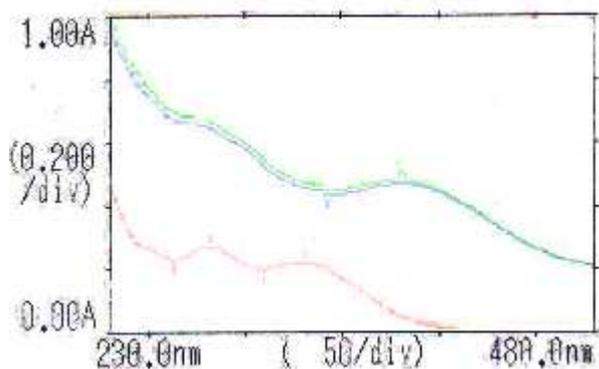


La courbe d'etalonnage de la quercétine

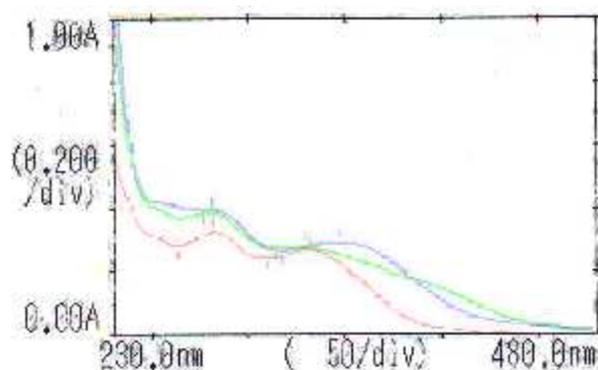


Spectre UV-Vis de la molécule 4 de *Thymus vulgaris*

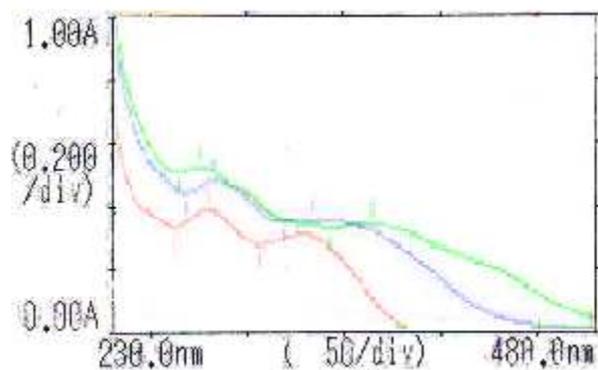
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	283	332
+NaOH —	/	380
NaOH (après 5 min) —	/	382.5



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	282	332.5
NaOAc —	281.5	329
NaOAc +H3BO3 —	281.5	347.5

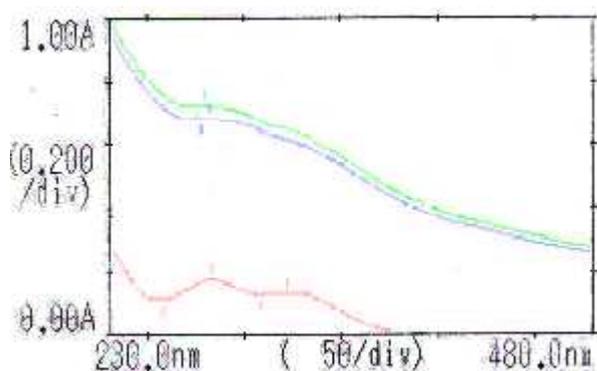


Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	283	333
AlCl 3 —	275.5	364
AlCl3 +HCl —	283	334

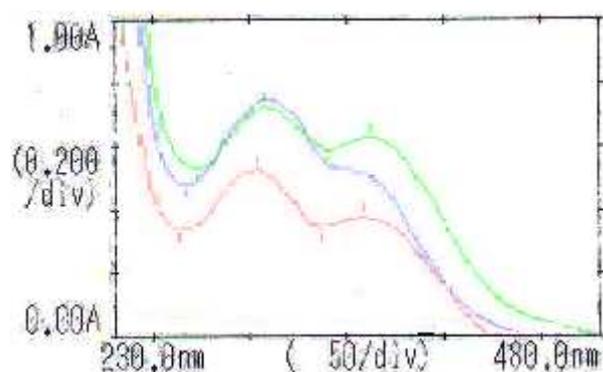


Spectres UV-Vis de la molécule 5 de *Thymus vulgaris*

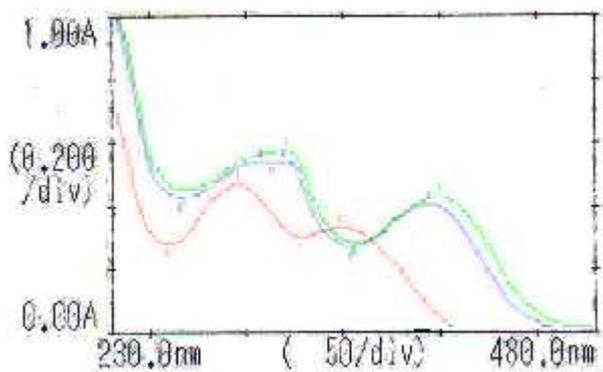
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	283	322.5
+NaOH	280.5	325
NaOH (après 5 min)	281.5	/



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	282.5	322
NaOAc	283.5	322.5
NaOAc + H3BO3	286.5	322

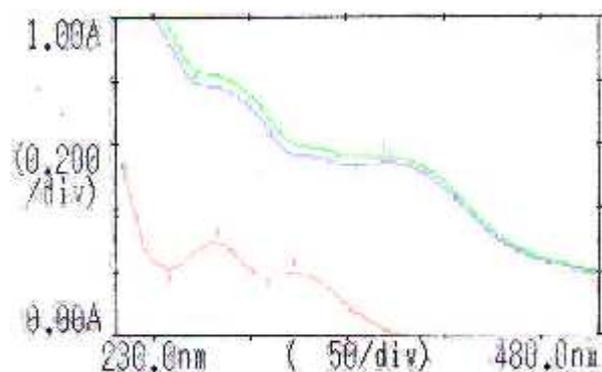


Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	282	322.5
AlCl3	301.5	361.5
AlCl3 + HCl	291.5	357.5 301

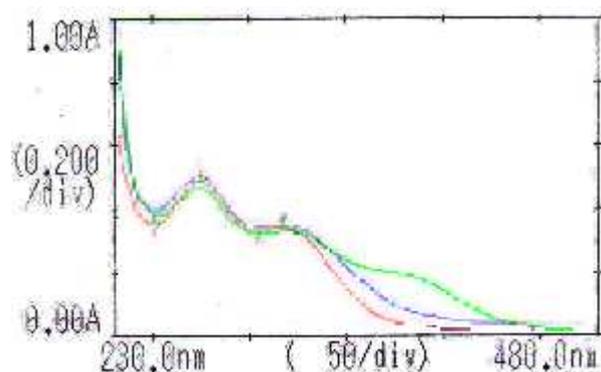


Spectre UV-Vis de la molécule 6 de *Thymus vulgaris*

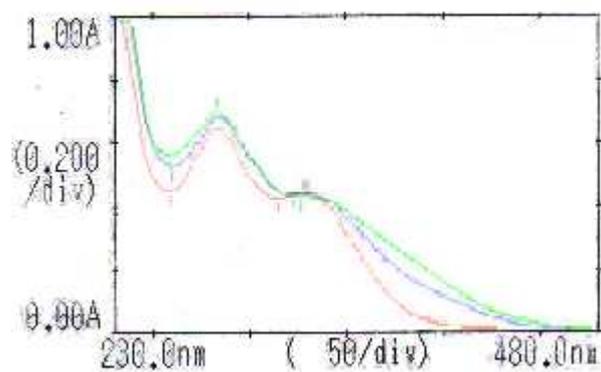
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH _____	282	323.5
+NaOH _____	/	365
NaOH (après 5 min) _____	/	369



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH _____	282	323.5
NaOAc _____	281	322.5
NaOAc +H3BO3 _____	280.5	324

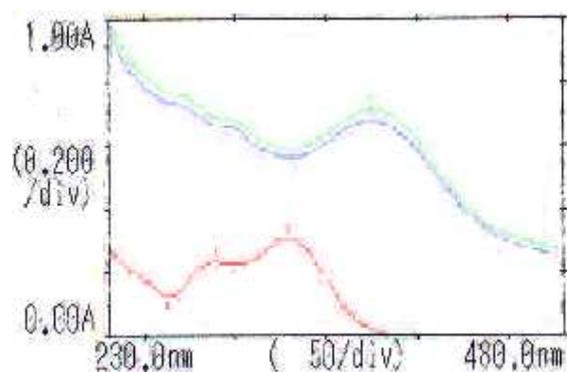


Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH _____	282	324
AlCl3 _____	280.5	324.5
AlCl3 +HCl _____	281.5	322.5

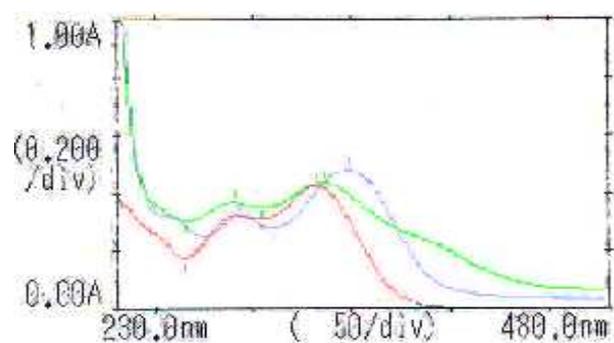


Spectres UV-Vis de la molécule A de *Rosmarinus officinalis*

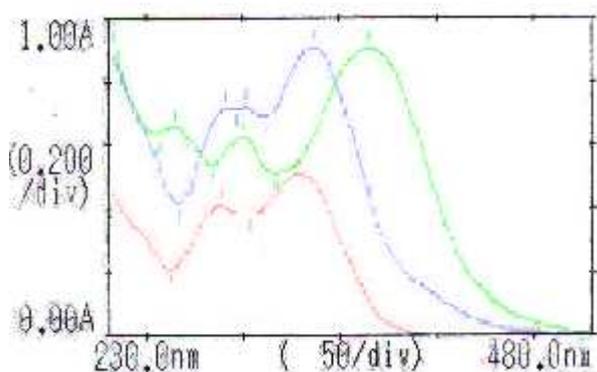
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	290	330.5
+NaOH —	/	375.5
NaOH (après 5 min) —	/	375.5



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	290	331
NaOAc —	289+epau	335
NaOAc +H3BO3 —	292.5	347.5

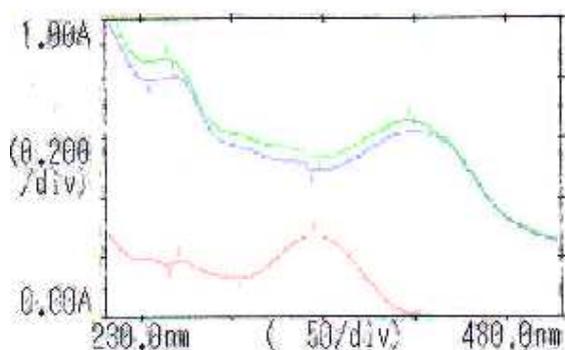


Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	290	330
AlCl 3 —	263.5	363 299
AlCl3 +Hcl —	291.5	335.5 301

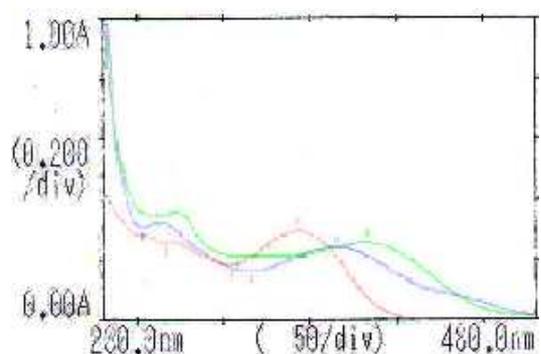


Spectres UV-Vis de la molécule B de *Rosmarinus officinalis*

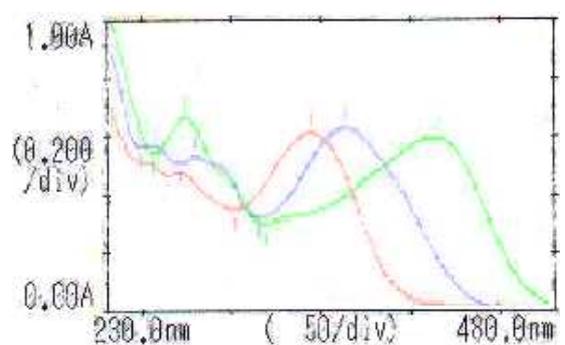
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	271	345
+NaOH	266.5	399
NaOH (après 5 min)	267.5	400.5



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	271	343
NaOAc	Epau 289 271	383 325
NaOAc +H3BO3	261	364.5

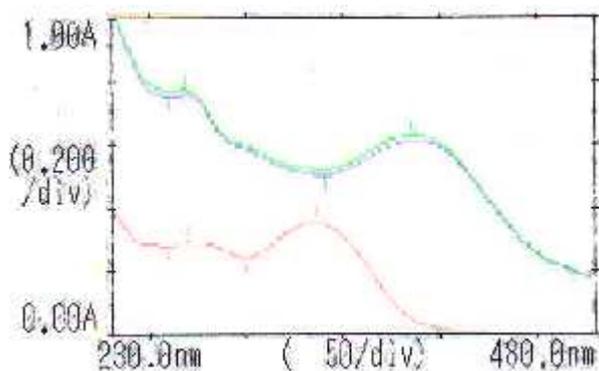


Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH	271	345
AlCl 3	273.5	414 280.5
AlCl3 +HCl	257.5	364.5

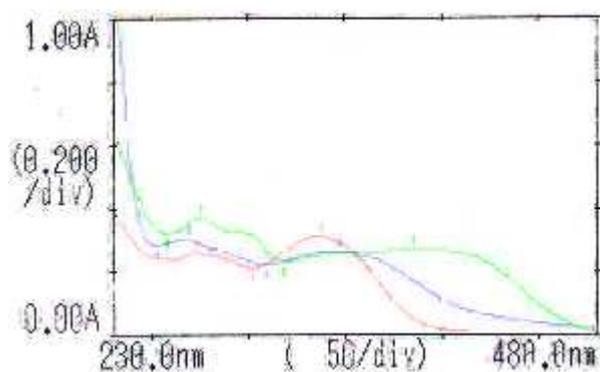


Spectres UV-Vis de la molécule C de *Rosmarinus officinalis*

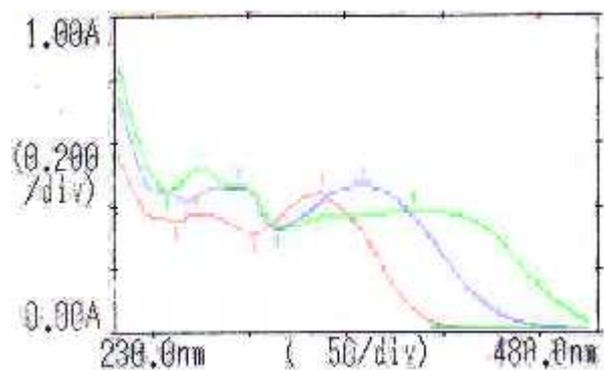
Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	272	338.5
+NaOH —	270	387
NaOH (après 5 min) —	270	387.5



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	272	338.5
NaOAc —	270	387
NaOAc +H3BO3 —	270	348.5



Solvants utilisés	BII (nm)	BI (nm)
MeOH —	272.5	338.5
AlCl3 —	257	387
AlCl3 +HCl —	295.5	360.5





Liste des figures

Figure 1 : Photo de <i>Thymus vulgaris</i>	5
Figure 2 : Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i>	8
Figure 3 : La voie de shikimate.....	12
Figure 4 : La voie de phénylpropanoïde.....	13
Figure 5 : La voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	14
Figure 6 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable.....	22
Figure 7 : Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antioxydante des flavonoïdes.....	23
Figure 8 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me ⁺ⁿ).....	24
Figure 9 : Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes.....	31
Figure 10 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	34
Figure 11 : Protocole d'étude spectrale des flavonoïdes en présence des différents réactifs	44
Figure 12 : CCM analytique représentative des flavonoïdes de <i>Thymus vulgaris</i> et de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur plaque de polyamide DC6 développée dans le système solvant (toluène/méthanol/éthanol) (4/3/3).....	52
Figure 13 : CCM analytique représentative des flavonoïdes de <i>Thymus vulgaris</i> et de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur plaque de polyamide DC6 développée dans le système solvant (méthanol/eau/acide acétique) (95/5/5).....	53
Figure 14 : Comportement chromatographique des phases acétate d'éthyle et MEC de <i>Thymus vulgaris</i> et de <i>Rosmarinus officinalis</i> sur plaque de silice après pulvérisation par une solution éthanolique d'AlCl ₃ (1%), dont les taches jaunes correspondent aux flavonoïdes.....	54

Figure 15 : Le contenu des composés phénoliques et contenu des flavonoïdes dans les deux plantes étudiées.....	55
Figure 16 : Piégeage de DPPH par les flavonoïdes.....	72
Figure 17 : Pourcentages de l'activité antiradicalaire des principaux flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i>	73
Figure 18 : Pourcentages de l'activité antiradicalaire des principaux flavonoïdes isolés de <i>Rosmarinus officinalis</i>	74
Figure 19 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des principaux flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i>	78
Figure 20 : Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) d' <i>Escherichia coli</i> par les flavonoïdes testés.....	78
Figure 21 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des principaux flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Figure 22 : Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> par les flavonoïdes testés.....	79
Figure 23 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des principaux flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> vis-à-vis d' <i>Enterobacter spp</i>	80
Figure 24 : Photos représentatives des zones d'inhibition (mm) des flavonoïdes du thym et du romarin vis-à-vis d' <i>Enterobacter spp</i>	80



Liste des tableaux

Tableau I: Principaux acides hydroxybenzoïques.....	15
Tableau II: Principaux acides hydroxycinnamiques.....	16
Tableau III: Principaux types de coumarines.....	16
Tableau IV : Principales classes des flavonoïdes.....	18
Tableau V : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes	20
Tableau VI : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de polyamide	35
Tableau VII : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.....	36
Tableau VIII : La relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes.....	37
Tableau IX : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes....	38
Tableau X : Principales caractéristiques des spectres UV-Visible des flavonoïdes.....	43
Tableau XI : Principales caractéristiques spectrales UV-Visible des flavonoïdes en présence des différents réactifs.....	45
Tableau XII : Comportement chromatographique des phases acétate d'éthyle et MEC de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> sur plaque de polyamide (DC6) dans le système solvant (toluène /méthanol/éthanol) (4/3/3).....	50
Tableau XIII : Comportement chromatographique des phases acétate d'éthyle et MEC de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Rosmarinus officinalis</i> sur plaque de polyamide (DC6) dans le système solvant (méthanol/eau/acide acétique) (95/5/5).....	51
Tableau XIV : Le mode d'obtention des différentes fractions isolées de <i>Thymus vulgaris</i> , leurs fluorescences sous UV à 365nm, leurs Rf sur des plaques de polyamide ou de silice ainsi que les systèmes solvants qui en sont utilisés pour le développement des chromatogrammes.....	56

Tableau XV : Les différentes fractions obtenues de <i>Rosmarinus officinalis</i> , leurs fluorescences sous UV à 365nm, ainsi que leurs Rf sur papier Wathman°3.....	57
Tableau XVI : Tableau récapitulatif représentant les structures des différents flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i> et de <i>Rosmarinus officinalis</i> respectivement.....	70
Tableau XVII : Pourcentages de l'activité antiradicalaire de la quercétine standard et des principaux flavonoïdes isolés de <i>Thymus vulgaris</i>	73
Tableau XVIII : Pourcentages de l'activité antiradicalaire de la quercétine standard et des principaux flavonoïdes isolés de <i>Rosmarinus officinalis</i>	74

الملخص :

الصعتر (*Thymus vulgaris*) والإكليل (*Rosmarinus officinalis*) من عائلة الشفويات استعملتا منذ القدم في الطب التقليدي حيث عرفنا بخصائصهما العلاجية. في هذا السياق يستند هذا العمل على دراسة فيتوكيميائية لأهم فلافونيدات النباتين و دراسة تقديرية لمعرفة مدى نشاطها المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا.

قدرت نسبة الفلافونيدات الموجودة في المستخلصات المثنائية بـ: 8.56 ± 0.001 ملغ/غ EQ لنبته الصعتر و 8.83 ± 0.026 ملغ/غ EQ بالنسبة لنبته الإكليل. الفلافونيدات التي استخرجت من الصعتر بينت نشاط حصر للجذر الحر (دي.بي.بي.اش) قدر بـ 70%، 58%، 52%، 51%، 50%، 5% على التوالي مع ("3OR'7OR") lutéoline, chrysin, kaempférol (3OR' 7OR"), apigénine (5OR' 7OR"), lutéoline(7OR'), quercétine (7OR'), أما فلافونيدات نبتة الإكليل فقد أعطت نشاطا مضادا للأكسدة قدر بـ 90%، 88%، 87% على التوالي مع ("3OR') lutéoline, quercétine, quercétine.

النتائج الميكروبيولوجية المنجزة على بعض الأصناف البكتيرية بينت أن هذه الأخيرة تستجيب بحساسية مختلفة اتجاه الفلافونيدات التي كانت محل هذه الدراسة.

الكلمات المفتاح : *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, الفلافونيدات، المضاد للأكسدة، المضاد للبكتيريا

Summary:

The thyme (*Thymus vulgaris*) and rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) are labiatae used since the antiquity in traditional medicine, recognized by their therapeutic virtues. In this context, the present work concerns a phytochemistry study of the majority of flavonoids contained in these plants, and an evaluation of their antioxidant and antibacterial activities.

The content of flavonoids in the ethanolic extracts is : 8, 56±0,001 mg/g QE for thyme and 8, 83±0,026 mg/g QE for rosmarin. The flavonoids isolated from *Thymus vulgaris* present an activity of trapping of the free radical DPPH in the order of 70%, 58%, 52%, 51%, 50%, 5% respectively for quercetin (3OR', 7OR''), luteolin, luteolin (7OR'), apigenin (5OR', 7OR''), kaempferol (3OR', 7OR''), and chrysin (7OR'), whereas those isolated from *Rosmarinus officinalis*, are characterized by an activity of 90%, 88%, 87% respectively for quercetin (3OR'), quercetin, luteolin (7OR'). The microbiological results showed that the flavonoids isolated act differently on the bacterial species tested.

Key words: *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, flavonoids, antioxidant, antibacterial.

Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne.**Resumé :**

Le thym (*Thymus vulgaris*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*) sont des labiées utilisées depuis l'antiquité en médecine traditionnelle reconnues par leurs vertus thérapeutiques. Dans ce contexte, le présent travail porte sur une étude phytochimique des flavonoïdes majoritaires contenus dans ces plantes, et une évaluation de leurs activités antioxydante et antibactérienne.

La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques est de : 8.56 ± 0.001 mg /g EQ pour le thym et de $8,83 \pm 0.026$ mg/g EQ pour le romarin. Les flavonoïdes isolés de *Thymus vulgaris* présentent une activité de piégeage du radical libre DPPH de l'ordre de 70%, 58 %, 52 %, 51%, 50% et 5% respectivement pour quercétine (3OR', 7OR''), lutéoline, lutéoline (7OR'), apigénine (5OR', 7OR''), kaempférol (3OR', 7OR''), chrysine (7OR') tandis que ceux isolés de *Rosmarinus officinalis* sont caractérisés par une activité antiradicalaire de 90%, 88%, 87% respectivement pour quercétine (3OR'), quercétine, lutéoline (7OR). Les résultats microbiologiques ont montré que les flavonoïdes du thym et du romarin agissent différemment sur les espèces bactériennes testées.

Mots clés : *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, flavonoïdes, antioxydante, antibactérienne.

Laboratoire de développement et de valorisation des ressources phytogénétiques. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri de Constantine.

Devant le jury :

Président : Mr Benlaribi M.

Prof. Univ. Constantine

Rapporteur : Mr Merghem R.

Prof. Univ. Constantine

Examineur : Mr Arhab R.

M. C. Univ. Tebessa

Examineur : Mr Belkhiri A. M.

M. C. Univ. Constantine

Année universitaire : 2008/2009

