



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
 MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
 RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR –BATNA–

MEMOIRE



Présenté à la Faculté des Sciences
 Département de Biologie
 Pour l'obtention du Diplôme de



MAGISTER

En Biochimie Appliquée

par :

YAKHLEF Ghania



THEME

**ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS
 DE FEUILLES DE *Thymus vulgaris* L. ET *Laurus nobilis* L.**



Devant le Jury :

M ^f YAHIA Mouloud	M.C. à l'Université de Batna	Président
M ^f LAROUÏ Salah	M.C. à l'Université de Batna	Rapporteur
M ^{me} HAMBABA Leila	M.C. à l'Université de Batna	Examinatrice
M ^f ZALLAGUI Amar	M.C. à l'Université d'Oum El-Bouaghi	Examinateur

Année Universitaire : 2009-2010



Remerciement

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à M^r LAROUÏ Salah, Maître de conférences à la faculté de médecine, Université de Batna pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à M^r YAHIA Mouloud, Maître de conférences à l'Université de Batna d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements à M^{me} ROUABAH-HAMBABA LEILA, Maître de conférences à l'Université de Batna pour sa précieuse aide et ses conseils, et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à M^r ZALLAGUI Amar, Maître de conférences à l'Université d'Oum El-Bouaghi pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à M^r ABDEDDAIM Mohamed Maître assistant-chargé de cours à l'université de Batna pour sa contribution à la réalisation de ce travail et ses précieux conseils qu'il trouve ici mes sincères remerciements

A M^r ABERKANE Mohamad Chérif, Maître de Conférences à l'université de Batna, et M^r AYACHI Ammar Maître assistant à l'université de Batna Qui m'ont accueilli au sein du leurs Laboratoires :

Laboratoire de chimie et phytochimie

Laboratoire de microbiologie et immunologie

et qui ont mis à ma disposition les condition matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long la période de recherche qu'ils ici mon respect et reconnaissance.



Liste des abréviations

- AAR** : Activité antioxydante relative
- ANOVA** : Analyse de variance
- APR** : Pouvoir antiradicalaire
- ATCC** : American type culture collection
- BHT** : Butylated hydroxytoluen
- BAW** : n-Butanol/Acide acétique/eau
- BCB** : β -carotene bleaching test
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DPPH** : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- EAq** : Extrait aqueux
- EDCM** : Extrait dichlorométhanique
- EEP** : Extrait éther de pétrole
- EMeOH** : Extrait méthanolique
- HPLC**: Chromatographie liquide à haute performance
- IC₅₀**: Concentration inhibitrice à 50%
- R_f** : Rapport frontal
- ROS** : Reactive oxygen species
- TEAC** : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
- T_r** : Temps de rétention
- UV** : Ultrat violet
- $\mu\text{g EqAG/mg}$** : Microgramme d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait
- $\mu\text{g EqQ/mg d'ext}$** : Microgramme d'équivalent quercétine par milligramme d'extrait.



Liste des figures

Fig. 01: Aspect morphologique de <i>Thymus vulgaris</i>	2
Fig. 02 : Aspect morphologique de <i>Laurus nobilis</i>	10
Fig. 03 : Structure de base des flavonoïdes.....	17
Fig. 04 : Structure de base des flavones.....	18
Fig. 05 : Structure de base des flavonols.....	18
Fig. 06 : Structure de base des flavanones.....	19
Fig. 07 : Structure de base des flavanols.....	19
Fig. 08 : Structure de base des chalcones.....	20
Fig. 09 : Structure de base des anthocyanidines.....	20
Fig. 10: L'étape clé de la formation des flavonoïdes.....	20
Fig. 11: Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	21
Fig. 12: Piégeage des ROS (R [•]) par les flavonoïdes.....	23
Fig. 13: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....	24
Fig. 14: Comparaison entre deux pentahydroxyphénols.....	24
Fig. 15: Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols.....	25
Fig. 16: Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	25
Fig. 17: Inhibition de la lipoxygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes.....	27
Fig. 18: Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.....	28
Fig. 19: les systèmes de défense contre les radicaux libres.....	31
Fig. 20: Aspect morphologique des micro-organismes étudiés.....	34
Fig. 21: Schéma de macération par l'eau distillée.....	36
Fig. 22: Schéma d'extraction par les solvants organiques.....	37
Fig. 23: Forme libre et réduite du DPPH.....	46
Fig. 24: Teneur en humidité des feuilles sèches des deux plantes médicinales.....	48
Fig. 25: Chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits bruts apolaires.....	54
Fig. 26: Chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits Bruts MeOH.....	54
Fig. 27: Chromatogrammes d'HPLC des extraits de <i>Thymus vulgaris</i>	57
Fig. 28: Chromatogrammes d'HPLC des extraits de <i>Laurus nobilis</i>	58
Fig. 29: Droite d'étalonnage des flavonoïdes.....	59
Fig. 30: Droite d'étalonnage des polyphénols.....	60
Fig. 31: Activité de la nystatine sur la levure <i>C. albicans</i>	61

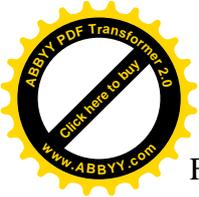


Fig. 32: Effet inhibiteur dose dépendant de nos extraits.....	62
Fig. 33: Exemples de l'effet des extraits de feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance microbienne.....	66
Fig. 34: Exemples de l'effet des extraits de feuilles de <i>Laurus nobilis</i> sur la croissance microbienne.....	66
Fig. 35: Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par 250 μ g/ml des extraits des feuilles de <i>Thymus vulgaris</i>	70
Fig. 36: Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par 250 μ g/ml des extraits des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	70
Fig. 37: Courbe de corrélation entre l'activité antioxydante des extraits polaires et leur teneur en flavonoïdes.....	72
Fig. 38: Résultats du test antioxydant des extraits apolaires sur CCM après révélation au DPPH.....	73
Fig. 39: Résultats du test antioxydant des extraits polaires sur CCM après révélation au DPPH.....	75
Fig. 40: Courbe de corrélation entre l'activité anti-radicalaire des extraits polaires et leur teneur en polyphénols.....	76
Fig. 41: Activité antioxydante des différents extraits de <i>Laurus nobilis</i>	77
Fig. 42: Activité antioxydante des différents extraits de <i>Thymus vulgaris</i>	77
Fig. 43: Activité antioxydante des différents Standards.....	77
Fig. 44 : Chromatogrammes des différents standards utilisés dans l'HPLC (Annexes)	
Fig. 45 : Influence du solvant DMSO sur la croissance des microorganismes (Annexes)	
Fig. 46 : Pied à coulisse automatique utilisé dans les mesures des diamètres des zones d'inhibitions (Annexes)	
Fig. 47 : CMI de l'EEP de <i>Thymus vulgaris</i> sur la souche <i>S. aureus</i> . (Annexes)	
Fig. 48 : Activité d'inhibition de décoloration de la β -carotène (Annexes)	
Fig. 49 : Activité anti-radicalaire (APR) des extraits bruts (Annexes)	
Fig. 50 : Activité anti-radicalaire (APR) des différents témoins (Annexes)	



Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	2
Tableau 02 : Le contenu de polyphénols dans l'infusion aqueuse du <i>Thymus vulgaris</i>	3
Tableau 03 : Les flavonoïdes trouvés dans les feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	4
Tableau 04: Classification botanique de <i>Laurus nobilis</i>	9
Tableau 05: Aspects, couleurs et rendements des extraits des feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> et <i>Laurus nobilis</i>	49
Tableau 06: Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.....	50
Tableau 07: Résultats des réactions de caractérisation des flavonoïdes dans nos extraits.....	50
Tableau 08: Résultats de la séparation par CCM des extraits apolaires.....	52
Tableau 09: Résultats de la séparation par CCM des extraits polaires.....	53
Tableau 10: Temps de rétention des différents témoins obtenus par la séparation avec HPLC....	55
Tableau 11: Résultats de l'HPLC des différents extraits.....	55
Tableau 12: Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits.....	57
Tableau 13: Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques.....	61
Tableau 14 Activité antimicrobienne des extraits bruts des plantes de l'étude.....	64
Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrices des différents extraits.....	68
Tableau 16: Le pouvoir anti-radicalaire des extraits bruts et du control positif	71
Tableau 17: IC50 et puissance anti-radicalaire (APR) des extraits bruts et des standards.....	75

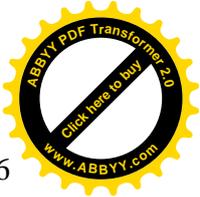


SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA PLANTE <i>Thymus vulgaris</i> L.	1
I.1. Généralités	1
I.2. Origine et distribution de la plante	1
I.3. Place de la plante dans la systématique	2
I.4. Description botanique de la plante	2
I.5. Composition chimique.....	3
I.6. Utilisations des feuilles de <i>Thymus vulgaris</i>	4
I.7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours.....	5
II. LA PLANTE <i>Laurus nobilis</i> L.	9
II.1. Généralités	9
II.2. Origine et distribution de la plante.....	9
II.3. Place dans la systématique	9
II.4. Description botanique de la plante.....	10
II.5. Composition chimique	10
II.6. Utilisations des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	11
II.7. Propriétés pharmacologiques et recherche en cours	11
III. LES FLAVONOÏDES	16
III.1. Vue d'ensemble sur les polyphénols.....	16
III.2. Généralités sur les flavonoïdes	16
III.3. Structure chimique et classification.....	17
III.4. Biosynthèse des flavonoïdes	20
III.5. Localisation et distribution des flavonoïdes	21
III.6. Biodisponibilité des flavonoïdes.....	22
III.7. Activités biologiques des flavonoïdes.....	22
IV. RAPPELS SUR LES ACTIVITES ETUDIEES.....	29
IV.1. Activité antioxydante.....	29
IV.2. Activité antimicrobienne.....	32
<h3>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</h3>	
I. MATERIEL ET METHODES.....	35
I.1. Matériel végétal.....	35
I.2. Détermination de la teneur en eau.....	35



I.3. Préparation des extraits.....	36
I.4. Détermination du rendement.....	37
I.5. Etude phytochimique des extraits	37
I.5.1. Analyse qualitative	37
I.5.1.1. Essais de caractérisation en tube	38
I.5.1.2. Essais de caractérisation par CCM	38
I.5.1.3. Essais de caractérisation par HPLC	39
I.5.2. Analyse quantitative	40
I.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux	40
I.5.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	41
I.6. Tests des effets biologiques	42
I.6.1. Tests de l'activité antimicrobienne	42
I.6.1.1. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide	43
I.6.1.2. Méthode des microdilutions en milieu solide.....	44
I.6.2. Tests d'activité antioxydante	44
I.6.2.1. Méthode de blanchissement de la β -carotène.....	44
I.6.2.2. Méthode de réduction du radical libre DPPH	45
II. RESULTAS ET DISCUSSION.....	48
II.1. Le taux d'humidité.....	48
II.2. L'extraction	48
II.3. Résultats de l'étude phytochimique.....	50
II.3.1. Résultats de l'analyse qualitative.....	50
II.3.2. Résultats de l'analyse quantitative.....	58
II.4. Résultats des tests des effets biologiques... ..	61
II.4.1. Résultats du test du pouvoir antimicrobien.....	61
II.4.2. Résultats du test du pouvoir antioxydant.....	69
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	



Introduction



INTRODUCTION

L'utilisation des plantes aromatiques par l'homme est une pratique antique (Majinda et al., 2001). De nos jours la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles.

Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides produites au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) conduit à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments. Les antioxydants de synthèse généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides se sont avérés responsables d'effets indésirables. De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans l'élevage animal conduit à l'apparition de souches bactériennes résistantes (Mau et al., 2004).

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Ils font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation.

Ce travail vise à étudier l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits bruts de deux plantes aromatiques, *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L., qui appartiennent respectivement à la famille des lamiacées et des lauracées. Elles sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante.

La sélection de ces plantes s'est fondée sur les critères suivants : sont parmi les plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, leur utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, à côté du fait que leurs huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique, leur efficacité dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur reconnue traditionnellement, elles représentent récemment un sujet de recherche scientifique intéressant.



Notre travail sera réparti en deux parties :

- une partie relative à l'étude bibliographique des deux plantes, des flavonoïdes et des activités recherchées.
- Une autre partie réservée à l'étude expérimentale subdivisée en deux chapitres : l'un présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail et l'autre consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.



Etude Bibliographique



I. LA PLANTE *Thymus vulgaris* L.

I. 1 GENERALITES

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales, 2002). Comme beaucoup de labiées elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris* L. localement connu "*zaatar*". En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre ("thym" et "thyme" respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* (Amiot, 2005).

Le nom "*Thymus*" dérive du mot grec « thymos » qui signifie "parfumer" à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante, 2001). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin, 2001).

Il existe une variation de la production des composés secondaires chez certaines espèces végétales que l'on appelle polymorphisme chimique. Cette variation peut être quantitative ou qualitative. Un grand nombre d'espèces possèdent des individus dont les composés secondaires varient quantitativement d'un individu à un autre. Par contre, les exemples de variation qualitative, c'est-à-dire l'existence de chémotypes au sens strict dont les individus peuvent porter des molécules de nature chimique différentes les un des autres, sont moins fréquents. C'est notamment le cas de *Thymus vulgaris* qui exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotype est nommé suivant le composant principal de son huile essentielle (exemples : thymol (T), carvacrol (C),...). (Amiot, 2005).

I.2. ORIGINE ET DISTRIBUTION DE LA PLANTE

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

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

I.3. PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Morales, 2002) synthétisée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Classification botanique de *Thymus vulgaris*

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

I.4. DESCRIPTION BOTANIQUE DE LA PLANTE

Thymus vulgaris L. est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur.

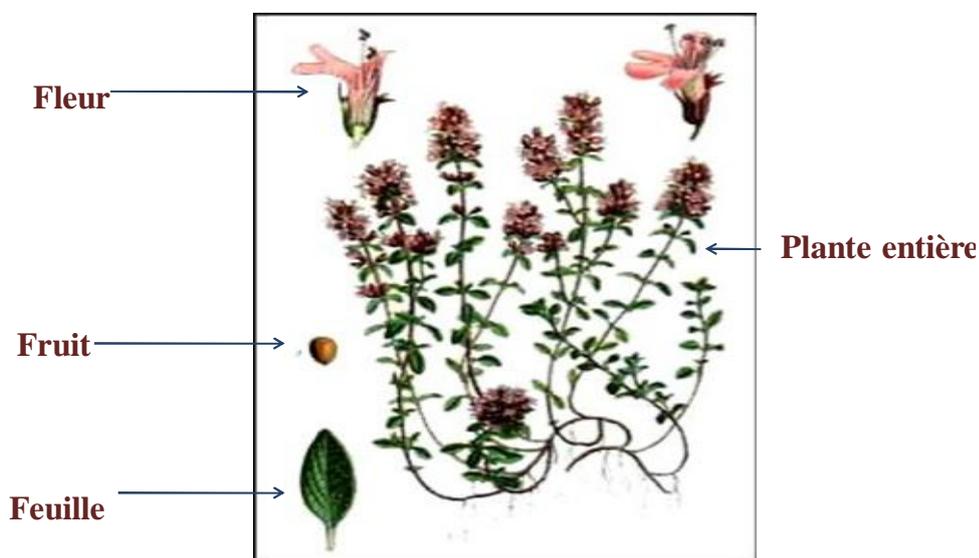
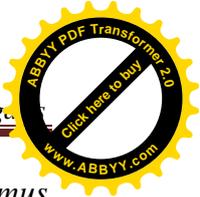
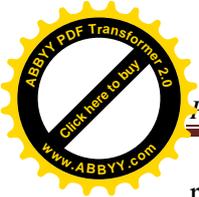


Fig. 1 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L.
(Iserin, 2001)

Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncés, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont



regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *Thymus vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton, 1999 ; Morales, 2002) (**Fig. 1**).

1.5. COMPOSITION CHIMIQUE

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intraspécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimique (Balladin et Headley, 1999 ; Amiot, 2005).

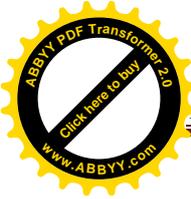
La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondant sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), *p*-cymene (9,1 - 18,5 %), γ -terpinène (6,9 - 18,0 %), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén et Manzanos, 1998 ; Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib et al., 2002 ; Bouhdid et al., 2006).

Le contenu phénolique total, flavonoïdes, catéchine, et anthocyanine dans l'infusion aqueuses préparée du *thymus vulgaris* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques (Kulišić et al., 2006). Le **tableau 2**, ci-dessous résume les résultats.

Tableau 2 : Teneur en polyphénols (en μg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du *Thymus vulgaris* (Kulišić et al., 2006)

Plante	Phénols totaux	Flavonoïdes	Non- flavonoïdes	Catéchines	Anthocyanines
<i>Thymus vulgaris</i>	33.3	25.0	8.3	1.2	6.7

La méthodologie habituelle pour étudier les dérivés flavonoïdiques dans les plantes implique les extractions successives employant plus d'un solvant, plusieurs étapes de fractionnement et différentes techniques de chromatographie pour extraire, séparer, isoler, épurer et identifier les composés d'intérêt. Le **tableau 3** énumère les flavonoïdes trouvées dans les feuilles *Thymus vulgaris* L., par plusieurs auteurs, en utilisant la méthodologie ci-dessus mentionné.



De nombreuses études ont confirmé que les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une bonne source d'acide rosmarinique, l'identification des composés polyphénoliques dans l'infusion aqueuse de *Thymus vulgaris* par analyse HPLC a montré une présence dominante d'acide rosmarinique (17,45 mg/g = 1,7 % de la masse sèche de *Thymus vulgaris*) et un autre composé significatif est l'eriodictin (1,96 mg/g) (Kulišić et al., 2006).

D'autres composants ont été détectés seulement en traces, l'acide caféique (0,02 mg/g) et l'acide *p*-hydroxybenzoïque. La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence de la vitamine E (α -tocophérol) (4,4 mg/Kg) (Guillén et Manzanos, 1998 ; Kulišić et al., 2006).

Tableau 3 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de *Thymus vulgaris* L.

Flavonoïdes	Références
- Cirsilineol (5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone)	Adzet et al., 1988 Morimitsu et al., 1995
- Thymonine (5,6,4' - trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone)	Morimitsu et al., 1995
- Eriodictyol (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet et al., 1988 Morimitsu et al., 1995
- Sideritoflavone (5,3',4'-trihydroxy- 6,7,8- triméthoxyflavone)	Adzet et al., 1988 Guillén et Manzanos, 1998
- 5-Desmethylnobiletine (5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone)	Adzet et al., 1988 Guillén et Manzanos, 1998
- Apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone)	Adzet et al., 1988 Kulišić et al., 2006
- Lutéoline (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet et al., 1988 Kulišić et al., 2006
- Xanthomicrol (5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone)	Guillén et Manzanos, 1998
- 5-Desmethylinensetine (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone)	Guillén et Manzanos, 1998
- Quercétine (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)	Morimitsu et al., 1995 Kulišić et al., 2006

1.6. UTILISATION DES FEUILLES DE *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris est une des plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, ces applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (Adwan et al., 2006). De plus son huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Jordán et al., 2006).



L'épice *Thymus vulgaris* est intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, des potages et des légumes (Özcan et Chalchat, 2004).

La feuille et la sommité fleurie de *Thymus vulgaris* sont traditionnellement utilisées par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructation, flatulence ainsi que dans le traitement symptomatique de la toux et de la bronchite (Bruneton, 1999). Sa feuille est énumérée dans la pharmacopée de fines herbes allemande et britannique a été employée en tant que bronchospasmodique, expectorant et antibactérien. On dit que la tisane des feuille de *Thymus vulgaris* favorise le repos et le sommeil (Kitajima *et al.*, 2004).

En usage local, elles sont traditionnellement utilisées en cas de nez bouché, de rhume, pour le traitement des petites plaies après lavage abondant, pour soulager les piqûres d'insectes et les douleurs rhumatismales, en bain de bouche pour l'hygiène buccale (Poletti, 1988 ; Brunton, 1999) ainsi comme additif de bain préparé par décoction qui stimule l'écoulement de sang vers la surface du corps humain, soulageant de ce fait la dépression nerveuse (Özcan et Chalchat, 2004).

L'huile essentielle de cette plante entre dans les formulations de diverses spécialités : pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour traitement des affections des voies respiratoires, préparation pour inhalation (Bruneton, 1999).

1.7. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET RECHERCHE EN COURS

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

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

a) Effets antioxydants

Thymus vulgaris L. se situait parmi les fines herbes séchées contenant les plus grandes capacités antioxydantes. Différents composés du thym lui permettent de posséder un tel statut, comme les phénols (thymol et carvacrol), les flavonoides, l'acide rosmarinique, l'acide caféique et la



vitamine E (Kulišić *et al.*, 2006 ; Guillén et Manzanos, 1998). Ces constituants inhibent la peroxydation lipidique induite *in vitro* au niveau des mitochondries et des microsomes. Ils inhibent également partiellement la production de l'anion superoxyde (Bruneton, 1999).

Des recherches menées dans les années 1990 en Écosse ont établi les vertus potentielles de la plante et de son huile essentielle, en prévention du vieillissement. Des études récentes indiquent que *Thymus vulgaris* est un puissant antioxydant et assure des doses élevées d'acides gras essentiels dans le cerveau (Iserin, 2001).

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été testée pour son activité antioxydante par deux méthodes différentes : la technique de décoloration de la β carotène et le test du DPPH (Diphénylpicrylhydrazyl). Les résultats obtenus montrent que l'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une grande activité antioxydante *in vitro* (Bouhdid *et al.* 2006).

À côté de l'huile, qui a été largement étudiée pour ses propriétés antioxydantes, l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* a présenté une activité antioxydante importante, et les caractéristiques antioxydantes observées n'étaient pas entièrement liées à la teneur en phénols de l'huile essentielle dans n'importe quelle méthode analytique, mais vraisemblablement fortement dépendantes de l'acide rosmarinique, composé phénolique principal dans l'extrait aqueux de *Thymus vulgaris* (Thuille *et al.*, 2003).

b) Effets antimicrobiens

L'huile essentielle de thym, riche en phénols, est douée de propriétés antibactériennes facilement mises en évidence *in vitro* (Bruneton, 1999). L'huile essentielle de trois plantes dont *Thymus vulgaris* a été testée, par Bouhdid et ses collaborateurs (2006), pour leur activité antibactérienne, l'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries gram positives comme sur les bactéries gram négatives. En effet, *L. monocytogenes*, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée à cette huile.

Des résultats similaires ont été obtenus par Ettayebi et ses collaborateurs (2000), qui ont montré que l'activité de l'huile du thym a été plus efficace contre les bactéries gram positive (*S. aureus*, *S. pyogenes* et *S. pneumoniae*) que contre les gram négative (*E. coli* et autre). D'autre part ces mêmes auteurs ont trouvé que cette grande activité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est reliée au thymol qui est majoritaire de cette huile.

L'activité antibactérienne de 11 huiles essentielles de plantes aromatiques contre la souche bactérienne *Bacillus cereus* INRA L2104, microbe pathogène développé en bouillon de carotte à



16° C, a été étudiée. Une inhibition totale de la croissance des spores bactériennes a été observée pour l'agent antimicrobien *Thymus vulgaris* (Valero et Salmerón, 2003).

En outre, l'extrait organique entier de *Thymus vulgaris* est avéré être actif contre différentes souches bactériennes, alors que l'extrait aqueux indiquait la meilleure activité contre *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 3,5 mg/ml (Tabak et al., 1996 ; Iserin, 2001). L'activité améliorée de l'extrait alcoolique du thym comparée à l'aqueux peut être expliquée par la présence du thymol, un phénol alkylique qui cause la perforation des membranes bactériennes et le flux rapide des composants cytosoliques (Thuille et al., 2003).

De même, l'extrait acétonique de *Thymus vulgaris* a montré une activité inhibitrice à une concentration de 0.5 mg/ml contre la *Mycobacterium tuberculosis* (Lall et Meyer, 1999).

L'extrait hydrosol (extrait aqueux sans huile essentielle) de *Thymus vulgaris* a été examiné pour ses effets inhibiteurs contre quatre bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *E. coli O157:H7*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica*). Basé sur les résultats de cette étude, les hydrosols de thym ont semblé empêcher la croissance des quatre microbes pathogènes examinés. Les hydrosols de thym à concentration de 50 à 75ml/100ml étaient complètement prohibitif sur la croissance bactérienne dans la culture de bouillon. Les résultats de cette étude ont confirmé la possibilité d'employer des hydrosols de thym dans la conservation des aliments et des boissons. Ces hydrosols peuvent être utilisés dans différentes concentrations pour stocker et protéger les produits alimentaires contre les microbes pathogènes (Sağdıç, 2003).

En plus de l'activité antibactérienne, des études (réalisées *in vitro* et *in vitro*) ont prouvé que l'huile essentielle (surtout le thymol) de *Thymus vulgaris* possède des propriétés antifongiques contre un certain nombre de mycètes. Reddy et ses collègues (1998), dans leur étude, ont montré le potentiel antifongique élevé de l'huile volatile de *Thymus vulgaris* comme agents protecteurs des fruits de fraise (*Fragaria ananassa*) contre la détérioration causée par les mycètes *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonijer*. Une étude similaire réalisée par Giordani et ses collaborateurs (2008), qui ont examiné les huiles essentielles de quelques plantes aromatiques dont *Thymus vulgaris* pour leurs effets antifongiques contre une espèce de levure *Candida albicans* par la détermination de leurs CMI (3.71 µg/ml).

c) Effet spasmolytique :

L'activité spasmolytique de *Thymus vulgaris* est le plus souvent attribuée aux phénols de l'huile essentielle. Beer et ses collaborateurs (2007) dans leur étude ont montré que l'effet



spasmolytique du thymol est enregistré à la concentration de 10^{-6} M. A la concentration de 10^{-4} M le thymol inhibe à 100% l'activité contractile spontanée des muscles lisses de l'estomac du cobaye et à 10^{-5} M réduit les effets de l'acétyl choline à 35%. Ils supposent que le thymol a un effet analgésique par son action sur les récepteurs α_2 adrénergique des cellules de nerf.

Par ailleurs, Lemli et Van Den Brouke (Bruneton, 1999) ont montré que si les phénols de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* s'opposent effectivement aux contractions provoquées sur les muscles lisses du cobaye par l'histamine, l'acétyl choline ou d'autres réactifs, leur concentration dans les préparations aqueuses de la drogue est insuffisante pour justifier leur activité. Ces auteurs ont montré que l'activité spasmolytique de ces préparations est liée à la présence des polyméthoxyflavones.



II. LA PLANTE *Laurus nobilis* L.

II.1. GENERALITES

Laurus nobilis L., membre de la famille des lauracées qui renferme 32 genres et environ 2000-2500 espèces (Barla et al., 2007). *Laurus*, nom latin, d'origine celte qui veut dire « toujours vert » allusion au feuillage persistant de la plante (Pariante, 2001).

Les feuilles sont largement appliquées et connues comme assaisonnement et herbe médicinale depuis les périodes antique grec et romain (Demir et al., 2004). Il est intéressant de noter que cette herbe qui était pendant longtemps employée dans la nourriture comme condiment et en médecine traditionnelle a, en fait, des propriétés qui peuvent suggérer de nouvelle application (Ferreira et al., 2006).

II.2. ORIGINE ET DISTRIBUTION DE LA PLANTE

Originaire du bassin méditerranéen, *Laurus nobilis* pousse dans les lieux humides et ombragés, mais également dans les jardins, où elle est cultivée comme condiment (Iserin, 2001). Actuellement, la plante est largement cultivée dans beaucoup de pays comme plante ornementale et pour la production commerciale tels que la Turquie, l'Algérie, la France, la Grèce, le Maroc, l'Amérique centrale et les Etats-Unis Méridionaux (Demir et al., 2004; Barla et al., 2007).

II.3. PLACE DANS LA SYSTEMATIQUE

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Quezel et santa, 1962) synthétisée dans le tableau 4.

Tableau 4 : Classification botanique de *Laurus nobilis* L.

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Laurales
Famille	Lauracées
Genre	<i>Laurus</i>
Espèce	<i>Laurus nobilis</i> L.

II.4. DESCRIPTION BOTANIQUE DE LA PLANTE

Laurus nobilis, Arbuste ou arbre aromatique de 2 à 10m de haut à tige droite grise dans sa partie basse et verte en haut. Ses feuilles sont alternés, coriaces, légèrement ondulées sur les bords, longues de 16 cm sur 8 cm de large, persistantes vert foncé et glacés sur leur face supérieure et plus pale en dessous. Les fleurs sont dioïques (petites fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés), jaunes, groupées par 4 à 5 en petites ombelles. Le fruit est une petite baie ovoïde de 2cm de longueur sur 1cm de largeur, noir vernissé à maturité (Iserin, 2001 ; Demir et al., 2004 ; Beloued 2005).

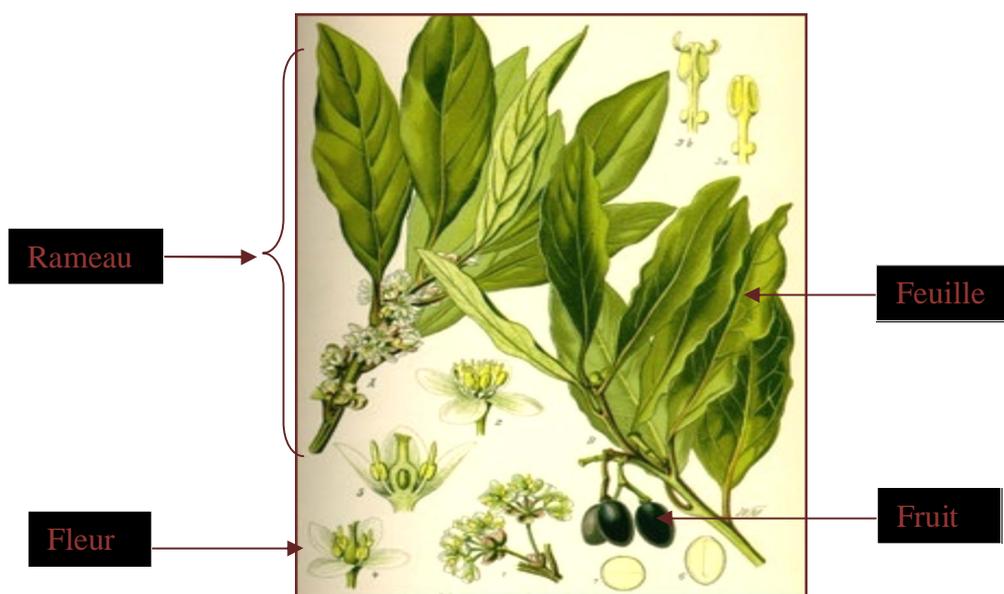


Fig. 2 : Aspect morphologique de *Laurus nobilis*
Beloued (2005).

II.5. COMPOSITION CHIMIQUE

De nombreuses études ont été réalisées pour la détermination de la composition chimique des feuilles de *Laurus nobilis* et plusieurs ont prouvé la richesse de ses feuilles en substances actives. Par hydrodistillation les feuilles fournissent environ 10-30 ml/Kg (1-3%) d'huile essentielle (Bruneton 1999, Demir et al., 2004) dont les constituants majoritaires inclut : cinéol, α et β pinène, sabinène, linalol, eugénol, terpinéol, plus d'autres esters et terpenoïdes, mais dont les proportions varient selon l'origine géographique (Iserin 2001 ; Sayyah et al., 2002 ; Demir et al., 2004).

Les feuilles de *Laurus nobilis* contiennent aussi des flavonoïdes polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol) (Fiorini et al., 1998 ; Kivçak et Mert, 2002), sesquiterpènes lactones, alcaloïdes



d'isoquinoline (Kivçak et Mert, 2002 ; Simić et al., 2003), en plus Demo et al. (1998) et Gómez-Coronado et al. (2004) ont montré la richesse de ses feuilles en vitamine E.

II.6. UTILISATION DES FEUILLES DE *Laurus nobilis*

Les feuilles de *Laurus nobilis* sont parmi les assaisonnements les plus connus dans tous les pays, elles sont généralement utilisées comme épice valable en culinaire (en potages, ragoûts, sauce,...) et aromatisant en industrie alimentaire. Cette plante a aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représente récemment un sujet de recherche scientifique intéressant (Sinić et al., 2003), le laurier est principalement utilisé, par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles de l'appareil digestif supérieur tels que le ballonnement épigastrique, lenteur de la digestion, éructations et flatulence (Iserin, 2001).

L'extrait aqueux est utilisé dans la médecine traditionnelle turque en tant qu'anti-hémorroïdal, antirhumatismal, diurétique et comme un antidote dans des morsures de serpent et pour le traitement du mal d'estomac (Kivçak et Mert, 2002).

Dans la médecine traditionnelle iranienne, les feuilles de cette plante ont été employées pour traiter l'épilepsie et le parkinsonisme (Aqili Khorasani, 1992).

L'huile essentielle obtenue des feuilles de cette plante a été employée pour le soulagement d'hémorroïdes et des douleurs rhumatismales (Sayyah et al., 2002). En outre, l'huile essentielle est employée par l'industrie cosmétique en parfumerie et dans la fabrication des savons. Elle compte parmi les meilleurs moyens d'éloigner les insectes gênants (Demir et al., 2004 ; Beloued, 2005).

II.7. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET RECHERCHE EN COURS

a) Effets antioxydants

L'activité antioxydante des extraits méthanolique (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorce et des fruits de *Laurus nobilis* ont été étudiés au niveau de la peroxydation de lipide (LP) dans les liposomes, induite par le système Fe^{+2} / ascorbate et mesuré spectrophotométriquement à 533 nm. Les résultats ont montré que tous les extraits de recherche possédaient une activité antioxydante. L'extrait dégraissé des feuilles montre une inhibition plus élevée du LP que l'extrait brut et que tous les autres extraits et le maximum de son activité (68,4%) a été atteint avec une plus petite quantité (2,0 mg) (Simić et al., 2003).



Ferreira et al. (2006) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de dix espèces de plantes médicinales dont *Laurus nobilis*, cette espèce a montré des valeurs élevées pour l'activité antioxydante pour chacun des trois extraits et elle est plus haute pour les extraits polaires. Dans le laurier, l'isoquercitrin et les glycosides flavonol peuvent expliquer l'activité exhibée.

Dans une autre étude, Demo et al. (1998) ont démontré la présence des tocophérols (vitamine E), principalement la γ - tocophérol, dans les feuilles de *Laurus nobilis* obtenue dans la fraction apolaire par extraction hexane. Dans cette étude on rapporte que le contenu tocophérol est strictement corrélé avec l'activité antioxydante de l'extrait hexane des feuilles.

Ces résultats préliminaires ont confirmé que l'utilisation traditionnelle des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arome plaisant, mais probablement aussi a des possibilités préservatives des substances présentes dans les feuilles et d'autres pièces de cette plante.

b) Effets fumigènes et insecticide

Récemment, il ya un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme solution de rechange aux insecticides synthétiques.

Treize huiles essentielles dont ceux de *Laurus nobilis* ont été examinées sous leurs formes de vapeur contre une espèce d'insectes attaquant les produits stockés, *Acanthoscelides obtectus* (bruche du haricot). Les résultats ont indiqués que l'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* a une action répulsive, réduit la fécondité, diminue la couvaison d'œufs, augmente la mortalité larvaire de nouveau-né et influence défavorablement l'apparition de progéniture (Papachristos et Stamopoulos, 2002).

Une étude similaire a été réalisée par Erler et ses collaborateurs (2006), où l'huile essentielle extraite à partir du feuillage frais de *Laurus nobilis* a été examinée pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique (*Culex pipiens*), cette huile a montré un degré de répulsion intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria, fièvre jaune, dengue, encéphalite...etc.

De même, l'activité fumigène de certains composés qui se produisent naturellement dans les huiles essentielles des plantes aromatiques dont cinéol, eugénol et linalol, composés principales



de l'huile essentielle de *Laurus nobilis*, a été évalué contre trois espèces d'insectes parasites des produits entreposés (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* et *Tribolium castaneum*).

L'activité insecticide a changé avec l'espèce d'insecte, le composé et le temps d'exposition. Les résultats ont prouvé que ces composés peuvent convenir comme fumigène en raison de leur volatilité élevée, efficacité et leur sûreté (non toxique aux humains) (Rozman et al., 2007).

c) Effet anticonvulsif

L'huile essentielle des feuilles de *Laurus nobilis* a été évaluée pour l'activité anticonvulsif contre des saisies expérimentales, l'huile a protégé des souris contre des convulsions toniques, induites par électrochoc maximal et particulièrement par pentylène-tétrazol. Aux doses d'anticonvulsif, l'huile essentielle a produit la sédation et relâchement du cœur. Les composants responsables de cet effet peuvent être le cinéol, eugénole et le méthyle eugénole mais d'autres études sont exigées avant que toutes conclusions puissent être tirées (Sayyah et al., 2002).

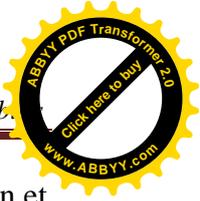
d) Effet cytotoxique

Les extraits *n*-hexane, éthanol et aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* ont été testés pour leurs propriétés cytotoxiques en utilisant l'essai biologique de crevette de saumure (*Artemia salina*). Seul l'extrait *n*-hexane exhibé une activité cytotoxique contre la crevette de saumure même si on l'avérait moins active que l'umbellifère et la colchicine. Dans le criblage phytochimique tous les extraits ont donné des résultats positifs pour les sesquiterpènes, les extraits éthanol et aqueux pour les alcaloïdes mais seulement l'extrait *n*-hexane était positif pour les flavonoïdes et la vitamine E. En conclusion, les glycosides flavonol pourraient être des principes actifs responsables de l'activité cytotoxique observée (Kivçak et Mert, 2002).

D'autres études ont réalisé l'isolement et l'identification des composés des feuilles et des fruits de *Laurus nobilis* supposés être cytotoxique. Ils ont isolés six sesquiterpènes lactone connue et un nouveau sesquiterpène le lauroxépine, ces substances actives se sont avérées fortement cytotoxiques contre la lignée cellulaire ovarienne cancéreuse A2780. (Fang et al. 2005 ; Barla et al., 2007).

e) Effet gastroprotectif

Une seule étude a été réalisée à ce sujet par Gürbüz et al. (2002) où cinq plantes aromatiques dont *Laurus nobilis*, sont employées traditionnellement en Turquie pour traiter le



mal d'estomac. Ils ont été choisis pour déterminer leur pouvoir anti-ulcère. Une décoction et un extrait méthanol ont été préparés à partir des fruits de Laurier pour déterminer leurs effets sur un modèle d'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez des rats. Les expériences pharmacologiques et les techniques histopathologiques ont clairement montré que ces extraits donnés oralement ont significativement protégé l'estomac contre ce modèle d'ulcère. Cette étude doit être continue pour l'isolement des constituants actifs et pour révéler leur mode d'activité.

f) Effet inhibiteur d'absorption d'alcool

L'extrait méthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* a efficacement empêché l'élévation du taux d'éthanol dans le sang chez un rat chargé d'éthanol. Sept sesquiterpènes actifs ont été isolés en tant qu'inhibiteurs d'absorption d'alcool. La partie active dans ces sesquiterpènes s'est avéré la partie α -méthylène- γ -butyrolactone qui était essentielle pour montrer la suppression de l'absorption d'éthanol. En outre, le retard de vider gastrique a été présumé impliqué partiellement dans leur effet inhibiteur (Matsuda et al. 1999 ; Yoshikawa et al., 2000). Ces sesquiterpènes ont non seulement un effet préventif efficace pour la toxicité aiguë d'alcool mais peuvent également aider des patients à éviter l'abus d'alcool (Yoshikawa et al., 2000).

g) Effet curatif de blessures

L'effet curatif de blessures de l'huile de feuille de *Laurus nobilis* a été examiné par Khalil et ses collaborateurs (2007). Une blessure en pleine épaisseur a été faite dans le secteur dorsal des souris *Mus musculus*. Les blessures ont été traitées quatre fois avec la préparation d'huile pendant deux jours successifs. Cette opération est répétée pendant plusieurs jours avec 12 h d'intervalle. Après 16 jours, les blessures ont été visuellement observées, photographiquement documenté et le secteur de blessure a été mesuré. Après le 16^{ième} jour, les animaux ont été sacrifiés et l'histologie du secteur de blessure est examinée. L'huile de *Laurus nobilis* a montrée une bonne activité curative de blessures.

h) Effet inhibiteur d'enzyme

Ferreira et ses collaborateurs (2006) ont étudié l'effet de l'huile essentielle, l'extrait éthanol et la décoction des feuilles de *Laurus nobilis* sur l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine donnant la choline et l'acétyle. La fraction éthanol a montré une valeur élevée d'inhibition d'AChE de 64% (1g/ml), donc la plante *Laurus nobilis* peut aider à traiter ou soulager des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, puisque les drogues approuvées pour la thérapie de cette maladie agissent en contrecarrant le déficit d'acétylcholine.



i) Effet antimicrobien

Des huiles essentielles de plusieurs plantes ont été évaluées pour leur potentiel dans le control du mycète aflatoxinogénique *Aspergillus parasiticus* CFR 223 et de la production d'aflatoxine. L'huile des feuilles de laurier a stimulée *in vitro* la croissance des mycéliums du mycète mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21% (Atanda et al. 2007).



III. LES FLAVONOÏDES

III.1. VUE D'ENSEMBLE SUR LES POLYPHENOLS

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales (Gee et Johnson, 2001).

Les polyphénols, qui forment une immense famille de plus de 8000 composés naturels, sont divisés en plusieurs catégories : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (Dacosta, 2003).

De nombreuses études sont en faveur d'un impact positif de leur consommation sur la santé. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies comme le cancer (Brown et al., 1998), les maladies dégénératives et cardio-vasculaires (Paganga et al., 1999). Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. Parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme (Gee et Johnson, 2001).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (Bruneton, 1999). Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (Dacosta, 2003).

Notre intérêt est essentiellement focalisé sur les flavonoïdes, substances que nous avons pu identifier dans tous nos extraits bruts et qui en particulier s'avèrent des composants phénoliques sur possédant une action biologique très diversifiée.

III.2. GENERALITES SUR LES FLAVONOÏDES :

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Structuralement, les

flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000).

III.3. STRUCTURE CHIMIQUE ET CLASSIFICATION :

Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atome de carbone ($C_6-C_3-C_6$) constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux), que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (Harborne et Williams, 2000) comme le montre la figure 3.

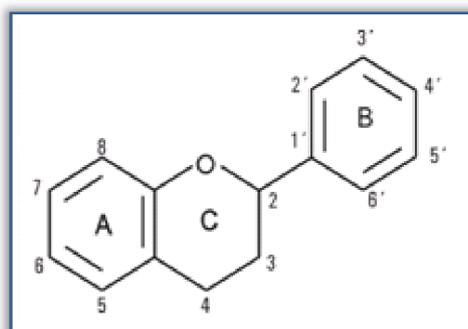


Fig. 3 : Structure de base des flavonoïdes.

On remarquera qu'afin de distinguer les positions sur l'anneau A et celles sur l'anneau B, la nomenclature normalisée appose à ces dernières le symbole ' (prime). L'hétérocycle C est attaché au noyau B par une liaison carbone-carbone. De façon générale, les flavonoïdes peuvent être hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4', 5'et/ou 6'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, ou sulfatés (Bruneton, 1999).

Ils existent soit à l'état libre (dans ce cas ils sont dits aglycones ou génines), soit sous forme de C- ou O- glycosides, ce qui tend à les rendre hydrosolubles (ils sont alors liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, le plus souvent aux positions 3 et 7). Ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes se différencient par le degré d'oxydation de l'hétérocycle C et par les modes d'hydroxylation des anneaux A et B. Dans toutes les classes de flavonoïdes mentionnées ci-dessous, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' de la génine ; cependant, l'un d'entre eux peut être absent. Six grandes classes de flavonoïdes peuvent être mentionnées. Les flavones et les flavonols sont les composés flavonoïdiques les plus répandus, alors que les flavanones, les flavanols, les chalcones et les anthocyanidines sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte (Bruneton, 1999 ; Harborne et Williams, 2000 ; Havsteen, 2002 ; Dacosta, 2003) :

1. les flavones :

Le noyau flavone dérivé du noyau flavane de base (dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) par la fixation à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison.

Les principaux flavones sont l'apigénine et la lutéoline. Elles ont dans la majorité des cas la forme de glycosides.

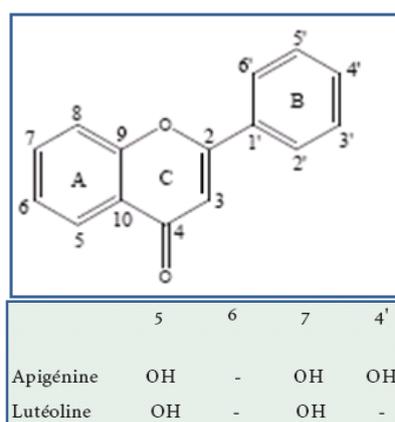


Fig. 4 : Structure de base des flavones.

2. les flavonols :

Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3. En plus de ce radical OH, les diverses molécules de flavonols en comprennent deux, trois, quatre ou cinq autres. Les flavonols sont beaucoup plus abondants dans le règne végétal que les flavones et leurs concentrations sont plus élevées. Les principaux sont la quercétine, kaempférol et myricétine.

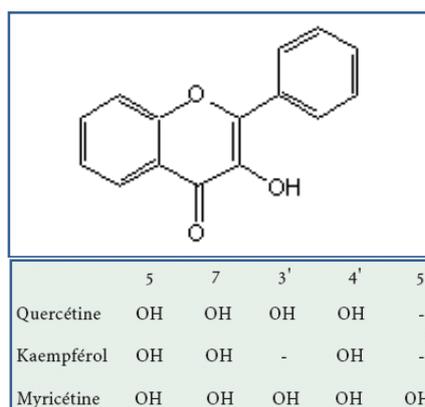


Fig. 5 : Structure de base des flavonols.

3. les flavanones :

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. Elles existent sous forme libre ou sous formes glycosylées. Sous forme

libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylés ou méthoxylés. Le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'. La principale flavanone est : La naringénine.

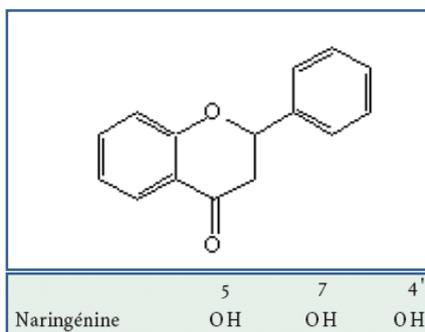


Fig. 6 : Structure de base des flavanones.

4. Les flavanols :

Ils se distinguent des flavanones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison la plus rencontré est la catéchine.

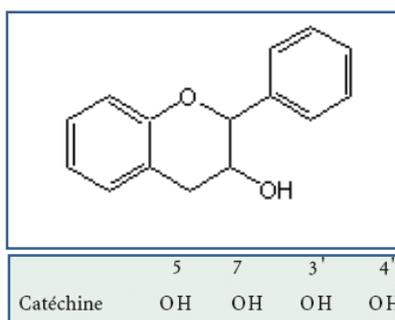


Fig. 7 : Structure de base des flavanols.

5. les chalcones :

Les chalcones et par défaut les dihydrochalcones sont uniques au sein de la famille des flavonoïdes. Dépourvus du cycle C central, les deux cycles A et B sont reliés par une chaîne tricarbonée cétonique α, β insaturée (saturée dans le cas des dihydrochalcones). Les cycles A et B sont équivalents aux cycles A et B des autres flavonoïdes mais leurs numérotations sont inversées. Les plus abondants sont : butéine et phlorétine.

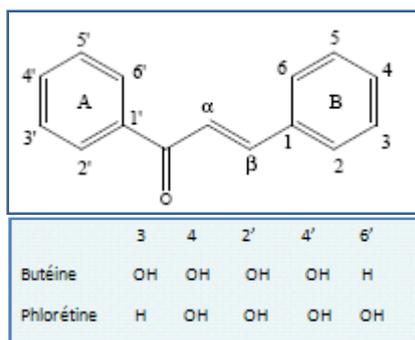


Fig. 8 : Structure de base des chalcones.

6. Les anthocyanidines :

Les anthocyanidines ne possèdent pas de groupe OH à la position 4 et ont une double liaison entre les positions 3 et 4. Les plus importants sont : pélagonidine, cyanidine et péonidine.

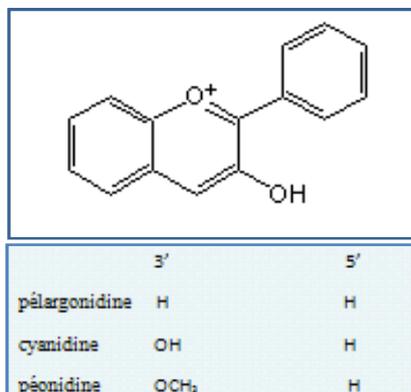


Fig. 9 : Structure de base des anthocyanidines.

III.4. BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES :

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phényl-2 chromane.

L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde (4-coumaroyl-CoA) avec trois unités malonyl-CoA, la structure de base en C-15 sous forme d'une chalcone soit 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone (Bruneton, 1999) **Fig. 10**.

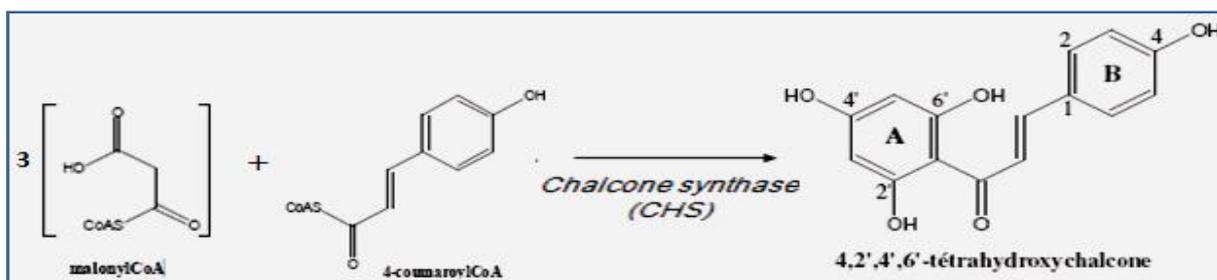


Fig. 10 : L'étape clé de la formation des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes. Elle est en équilibre avec les flavonoïdes. Cet équilibre étant contrôlé par une enzyme « la chalcone isomérase », cette dernière induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une flavanone. Il est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes comme le montre la **Fig. 11** (Remesy et al., 1996).

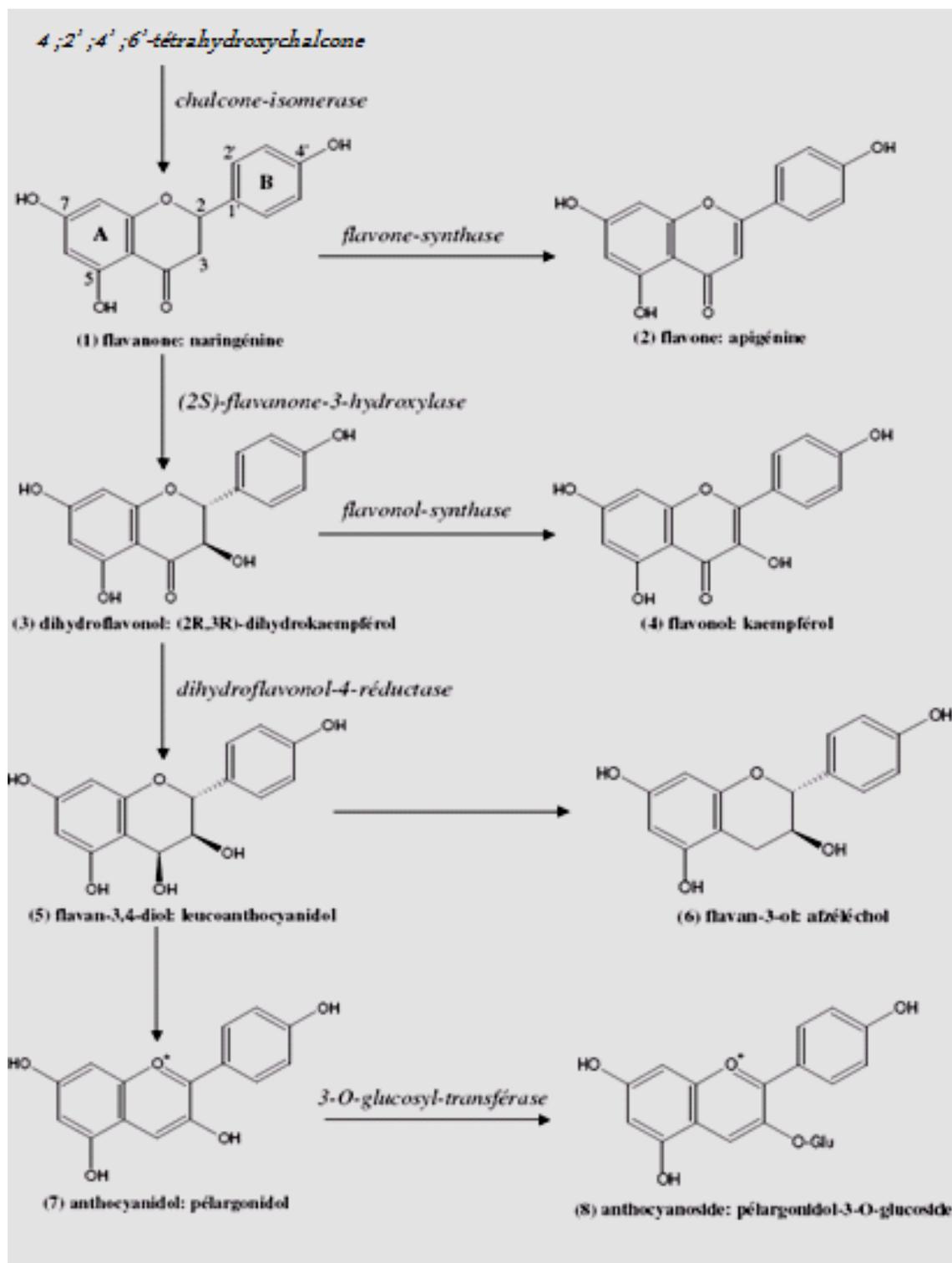
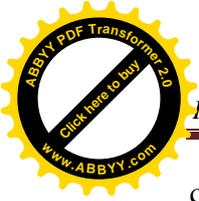


Fig. 11 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Remesy et al., 1996)

III.5. LOCALISATION ET DISTRIBUTION DES FLAVONOÏDES :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est



caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remesy et al., 1996).

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Brunton, 1993).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner et Beecher, 1995 ; Remesy et al, 1996).

III.6. BIODISPONIBILITE DES FLAVONOIDES

Les effets santé des flavonoïdes ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Peu d'études systématiques ont été menées sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes provenant de l'alimentation, il apparaît que seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être absorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes absorbés (Hollman et Katan, 1998 ; Walle, 2004).

Une meilleure connaissance de la biodisponibilité des flavonoïdes est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs sur la santé.

III.7. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES FLAVONOIDES

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

a. Effets antioxydants

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont

susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman et al., 1995). L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R•), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (Fl-O•) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Jovanovic et al., 1998) :

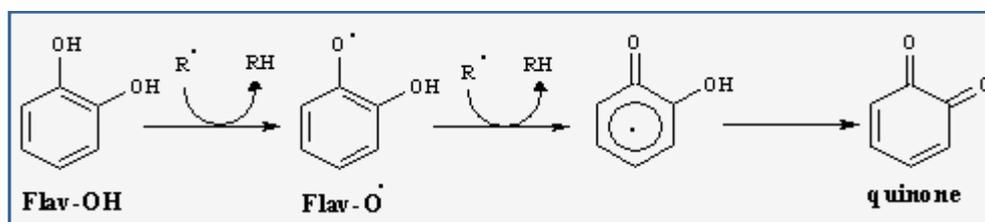
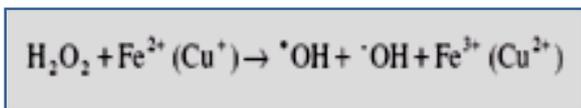


Fig. 12 : Piégeage des ROS (R•) par les flavonoïdes.

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (Hanski et al., 1994 ; Cos et al., 1998). Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown et al., 1998 ; Dacosta, 2003), comme les ions du fer (Fe²⁺) et du cuivre (Cu⁺) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés. La **Fig. 13** résume les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Van Acker et al., 1996).

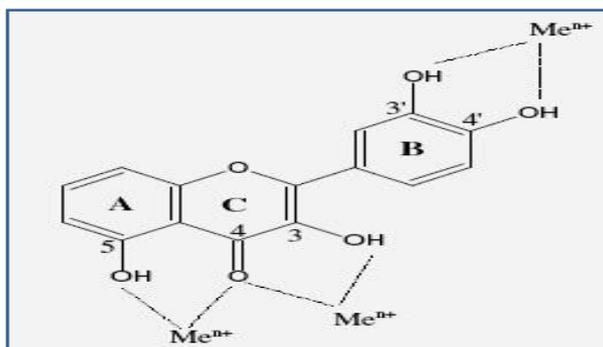


Fig. 13 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (D' après Van Acker et al., 1996)

Plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996 ; Van Acker et al., 1996 ; Harborne et Williams 2000 ; woodman et al. 2005). Ces travaux permettent de connaître les activités anti-oxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales. En fait, leur activité antiradicalaire nécessite:

- a- Les molécules possédant une double liaison entre les carbones C_2 et C_3 et un groupement carbonyle en C_4 sont les flavonoïdes dont les activités anti-oxydantes sont les plus marquées, ainsi l'activité de la quercétine (un flavonol) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (un flavan-3-ol). Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C2-C3 et une fonction 4-oxo (Van Acker et al., 1996 ; Harborne et Williams 2000).

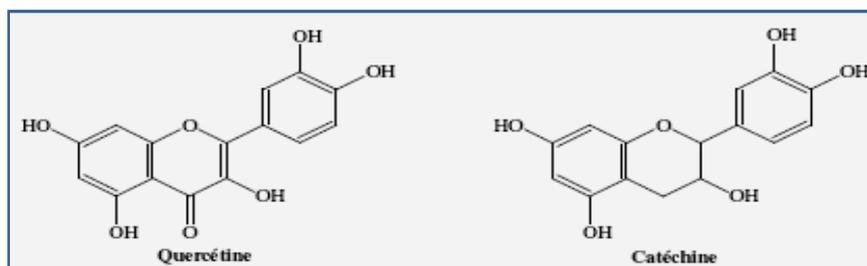


Figure 14 : Comparaison entre deux pentahydroxyphénols (Harborne et Williams 2000).

- b- La structure ortho-diphénolique du cycle B (=les groupements hydroxyles en position $C_{3'}$, $C_{4'}$) ainsi qu'un nombre important de résidus hydroxyles augmenteraient le potentiel antioxydant des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé (Fuhrman et al., 1995 ; woodman et al. 2005). Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont développé un test basé sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cation chromophore, l'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (une forme soluble de l' α -tocophérol), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Il est à noter que plus la

valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Les résultats de cette étude ont montré que la morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyle en ortho) (**Fig. 15**).

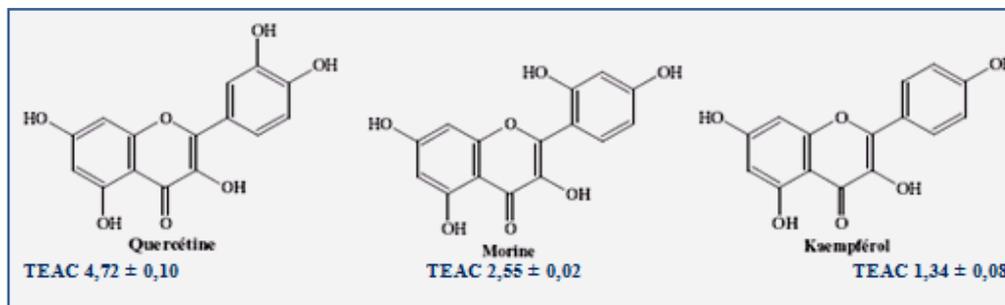


Fig. 15 : Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols (Rice-Evans, 1996).

- c- Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont démontré l'importance ce dernier. En effet, La glycosylation du groupe 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante.

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres on peut conclure que la quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol, sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996).

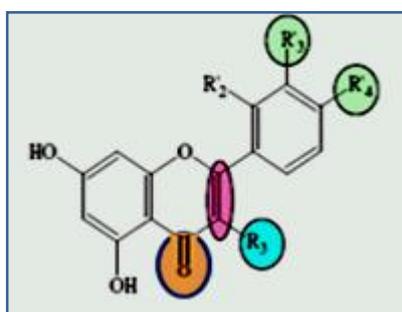
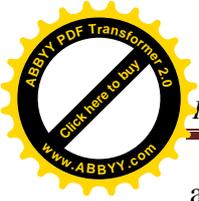


Fig. 16 : Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996).

b. Effets antimicrobiens

Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes vis-à-vis de différents micro-organismes pathogènes ont été mises en évidence (Jassim et Naji, 2003 ; Taguri et al., 2004 ; Takahashi et



al., 2004 ; Yadava et Tiwari, 2005). Les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont été rapportés posséder une activité antimicrobienne (Tereschuk et al., 1997 ; Essawi et Srour, 2000). Beaucoup de groupes de recherche ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent l'activité antimicrobienne ou ont mesuré l'activité des flavonoïdes disponibles dans le commerce (Sakar 1992 ; Kono et al., 1994 ; Verma et al. 1997 ; Hamilton-Miller et Shah, 2000).

Les propriétés antibactériennes de propolis ont été attribuées à sa teneur élevée en flavonoïdes (Grange et Davey, 1990). Sato et ses collaborateurs (1995), ont démontré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *staphylococcus aureus*. Une étude plus récente a montré le pouvoir antibactérien d'un flavonoïde glycoside contre des souches de bactéries gram (+) et gram (-) (Harikrishna et al., 2004),

En raison de la capacité répandue des flavonoïdes d'inhiber la germination des spores pathogènes des plantes, on leur a proposé pour l'usage contre les microbes fongiques pathogènes de l'homme (Harborne et Williams, 2000). Deux nouveaux flavonoïdes, un flavone et un flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme posséder l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (Valsaraj et al., 1997 ; Wachter 1999). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus*, une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (Zheng, 1996). Galangin, un flavonol généralement trouvé dans des échantillons de propolis a été montré avoir l'activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (Afolayan et Meyer, 1997).

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmood et al., 1993).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer :

- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (Hilliard, 1995),
- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Tsuchiya et Iinuma, 2000),
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne,
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (Haraguchi et al., 1998).

c. effets anti-inflammatoires

Sous l'action de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, l'acide arachidonique (acide gras C20 : 4) se métabolise respectivement en prostaglandines + thromboxane et en leucotriènes, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoires. *In vitro*, plusieurs flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique plaquettaire (Middleton, 1998 ; Pelzer et al., 1998 ; Yeon, 2001). Ils ont même reporté que les effets de la quercétine et la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cyclooxygénase et la lipooxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipooxygénase est affectée. En outre, d'autres flavonoïdes tels que la lutéoline, la morine, l'apigénine et la chrysrine agissent principalement sur l'activité de la cyclooxygénase (Laughton, 1991 ; Read, 1995 ; Sánchez de Medina et al., 2002).

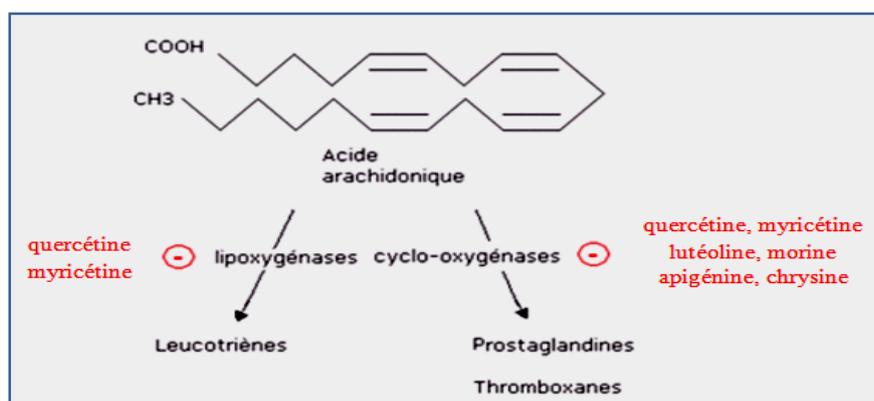


Fig. 17 : Inhibition de la lipoygénases et de la cyclo-oxygénases sous l'action de différents flavonoïdes.

d. Effets protecteurs vasculaires

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins pour le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (Youdim, 2002). Deux flavonoides, l'hespéridine et l'hespérétine (connus sous le terme citroflavonoides) exercent des propriétés vasorelaxantes (Orallo et al., 2004). D'autres flavonoides, la quercétine et la silybine, sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoides sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine (Stoclet et al., 2004).

e. effets antiallergiques



Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ces effets sont attribués à leur influence sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{++} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{++} -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 (Yamamura et al., 1998).

En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur, de la libération d'histamine à partir des mastocytes, 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 (Formica et Regelson, 1995).

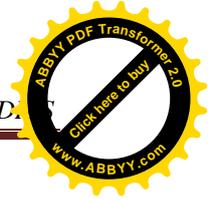
f. Autres effets biologiques

Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire, mais leur action est complexe et demeure encore mal élucidé. A doses élevées, les flavones et flavonols sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés (Namgoong et al., 1994 ; Middleton, 1998).

Les flavonoïdes peuvent prévenir le diabète ou au moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Une étude récente montrée que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Ong et Khoo, 2000).

Les flavonoïdes ont été également étudiées pour leurs propriétés anti-tumorales (Birt et al., 2001). Parmi les flavonoïdes naturels anticancéreux, la catéchine témoigne d'une activité remarquable (Bracke, 1991).

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol (Martin et al., 1994).



IV. RAPPELS SUR LES ACTIVITES ETUDIEES

IV.1. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTES

IV.1.1. Introduction

Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert, 2005).

IV.1.2. Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003 ; Vansant, 2004).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires [Radical peroxyde (ROO^\bullet), Radical alkoxyde (RO^\bullet)], se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (**ROS**). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit [radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hydroxyl (OH^\bullet), monoxyde d'azote (NO^\bullet)], mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante [l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxydinitrite (ONOO^-)] (Dacosta, 2003 ; Favier, 2003). La **fig. 18** résume l'origine des différentes espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.

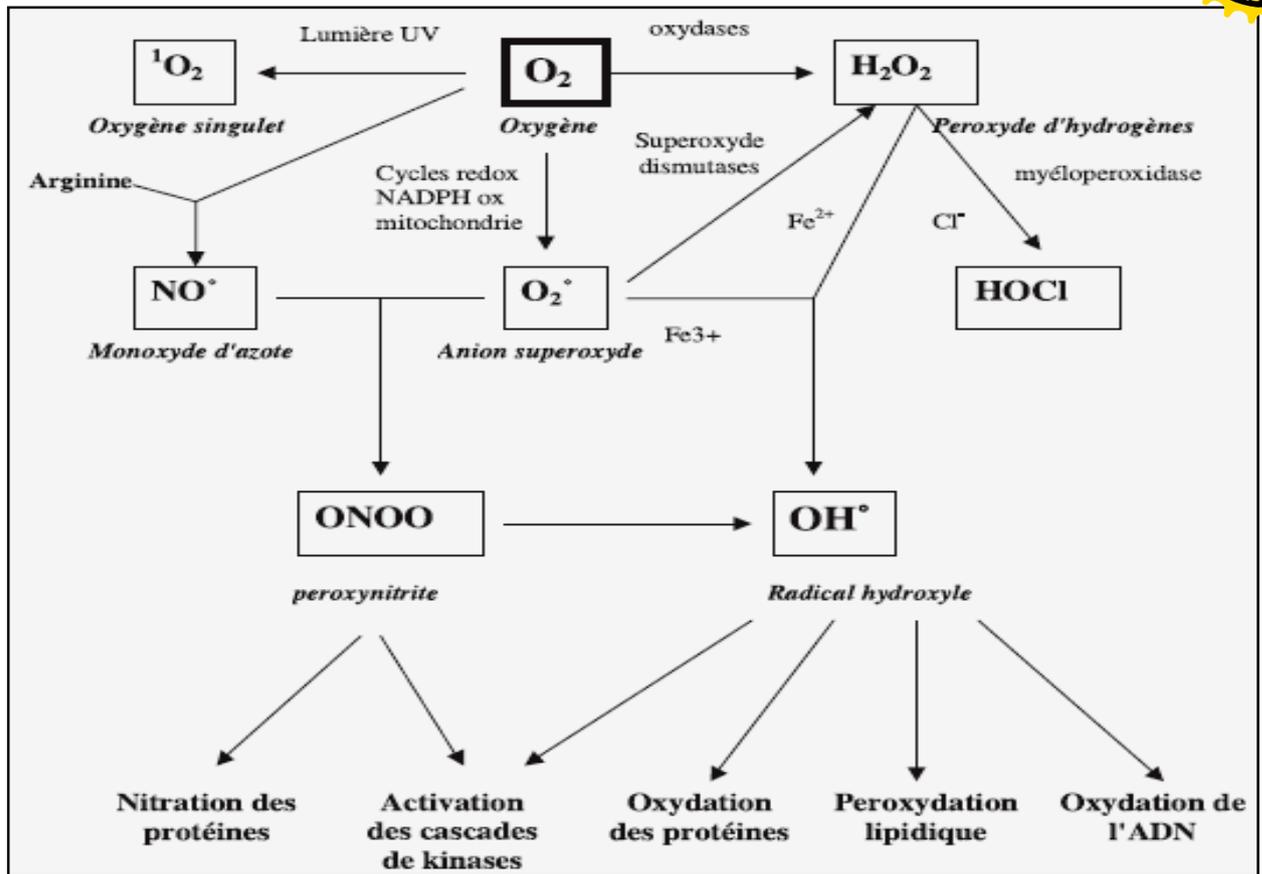


Fig. 18 : Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie (Favier, 2003).

IV.1.3. Les antioxydants

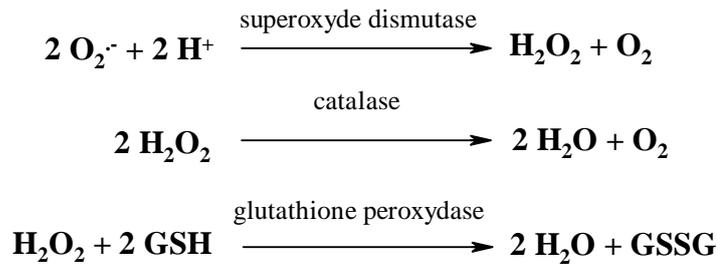
Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (Vansant, 2004).

Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

a- Les antioxydants primaires :

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces puisque les enzymes ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente. Cette ligne de défense (Fig. 19) est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Lehucher-Michel, 2001).

Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

b- Les antioxydants secondaires :

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Dacosta, 2003).

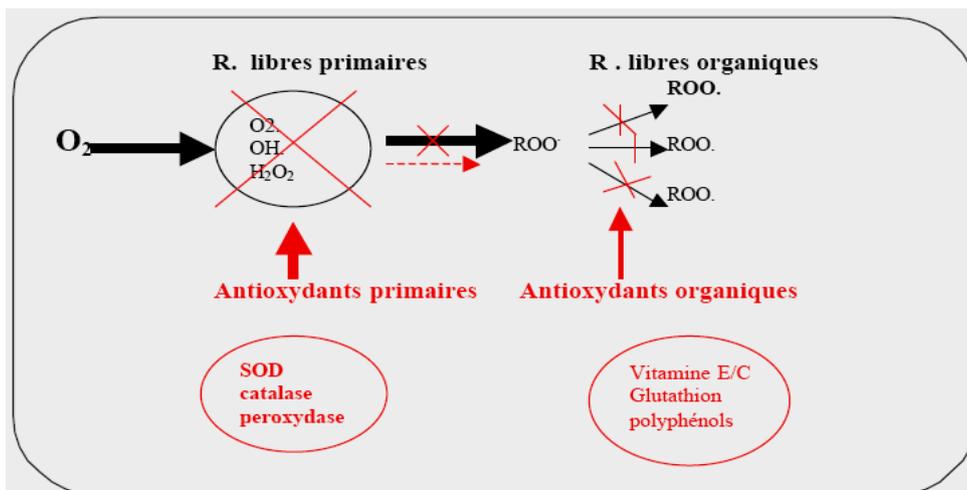


Fig. 19 : les systèmes de défense contre les radicaux libres.

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Kohen et Nyska, 2002).

IV.1.4. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

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



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

Le stress oxydant est responsable du dommage cellulaire lié au vieillissement, aux maladies cardio-vasculaires, au cancer et à la plupart des maladies dégénératives. Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols.) (Kohen et Nyska, 2002).

IV.2. ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

IV.2.1. Introduction

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

IV.2.2. Les principales substances antimicrobiennes

a- Les antibiotiques

Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques (Bergogne-Berezin et Dellamonica, 1995).

. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments (Billing et Sherman, 1998).



b- Les huiles essentielles

Produites comme métabolites secondaires par les plantes aromatiques, les huiles essentielles sont toujours utilisées comme substances aromatisantes et parfumantes en parfumerie, industries alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire, en aromathérapie et en industrie alimentaire (Baudoux, 2000). Différentes études récentes ont confirmé, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de diverses huiles essentielles (Hili et al., 1997 ; Billing et Sherman, 1998).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs. En effet, l'activité antimicrobienne remarquable de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est en relation avec sa teneur élevée en thymol (un composé phénolique) qui est réputé avoir une très grande action antimicrobienne (Ettayebi et al., 2000 ; Ultee et al., 2000 ; Friedman et al., 2002 ; Chun et al., 2005).

IV.2.3. Les bactéries étudiées

a- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas. Une espèce, *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales (Chambers, 1997).

b- *Escherichia coli*

Escherichia coli (bacille à Gram négatif), commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales (Nataro et Kaper, 1998).

c- *Pseudomonas aeruginosa*

Un certain nombre de bacilles à Gram négatif de l'environnement se comportent comme des bactéries opportunistes et sont souvent à l'origine d'infections nosocomiales. Il s'agit souvent de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. Une des plus redoutables est *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon, 1995).

d- *Salmonella typhimurium*

Salmonella (bacille à Gram négatif) est la première cause de toxi-infections alimentaires collectives bactérienne dans le monde, elle est l'une des préoccupations majeures des laboratoires de contrôle de qualité alimentaire. *S. Typhimurium* est largement répandue dans les différents réservoirs animaux (porcs, bovins, volailles...) et dans certaines denrées destinées à l'homme (Medjbar, 2008).

IV.2.4. La levure *Candida albicans*

Les levures sont typiquement unicellulaires, quoique très souvent les cellules restent collées les unes aux autres après la division cellulaire (**fig. 20**) (Fuerst, 1976).

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

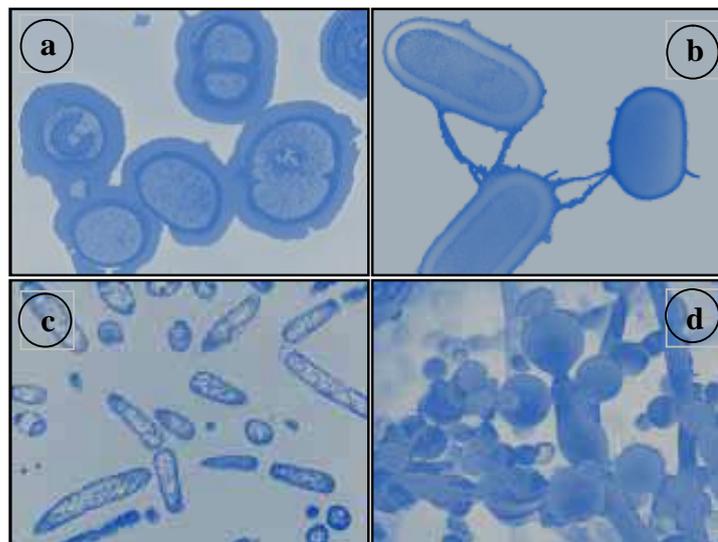


Fig. 20 : Aspect morphologique des micro-organismes étudiés (Pieri et Kirkiacharian, 1992)

(a) : *S. aureus* ; (b) : *E. coli* ; (c) : *P. aeruginosa* ; (d) : *C. albicans*.



Matériel et Méthodes



I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Matériel végétale

Les feuilles (sèches) des deux espèces de plantes *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. ont été achetées au marché local de Batna (Rahba), en février 2007. L'identification botanique des deux espèces a été réalisée par D^r OUDJEIH B., laboratoire de botanique, département d'agronomie, université *EL-Hadj Lakhdar*, Batna.

Les feuilles ont été nettoyées, lavées avec de l'eau du robinet et séchées à l'ombre. Elles ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs propres.

I.2. Détermination de la teneur en eau

Le taux d'humidité, dans nos échantillons (la poudre des feuilles sèches de nos plantes), a été déterminé par le procédé de dessiccation à une température de 105° C dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Linden et Lorient, 1994).

Considérons :

x → Poids de l'échantillon ;

y → Poids de l'échantillon après déshydratation ;

$T\%$ → Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

$$T\% = \frac{x - y}{x} \times 100 ;$$

Pour plusieurs mesures, on calcule l'humidité moyenne :

$$T\% (moy.) = T_1 \% + T_2 \% + \dots + T_n \% / n ;$$

n : Nombre totale d'échantillon ;

Moy. : Moyenne ;

T_1 % : Humidité de l'échantillon N° 1;

T_n % : Humidité de l'échantillon N° n .

I.3. Préparation des extraits

I.3.1. Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épuisement successive du matériel végétal, en utilisant trois solvants à polarité croissante : éther de pétrole (EP), dichlorométhane (DCM) et méthanol (MeOH), méthode décrite par Biallo et al. (2004). La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas, 2 L de solvant pour 200 g de drogue). L'extraction est effectuée sous agitation continue et à température ambiante durant 24 heures. Après filtration, le résidu est ensuite concentré par évaporation rotative dans un Rotavapeur (BÜCHI) la **fig. 22** illustre les étapes suivies dans cette extraction.

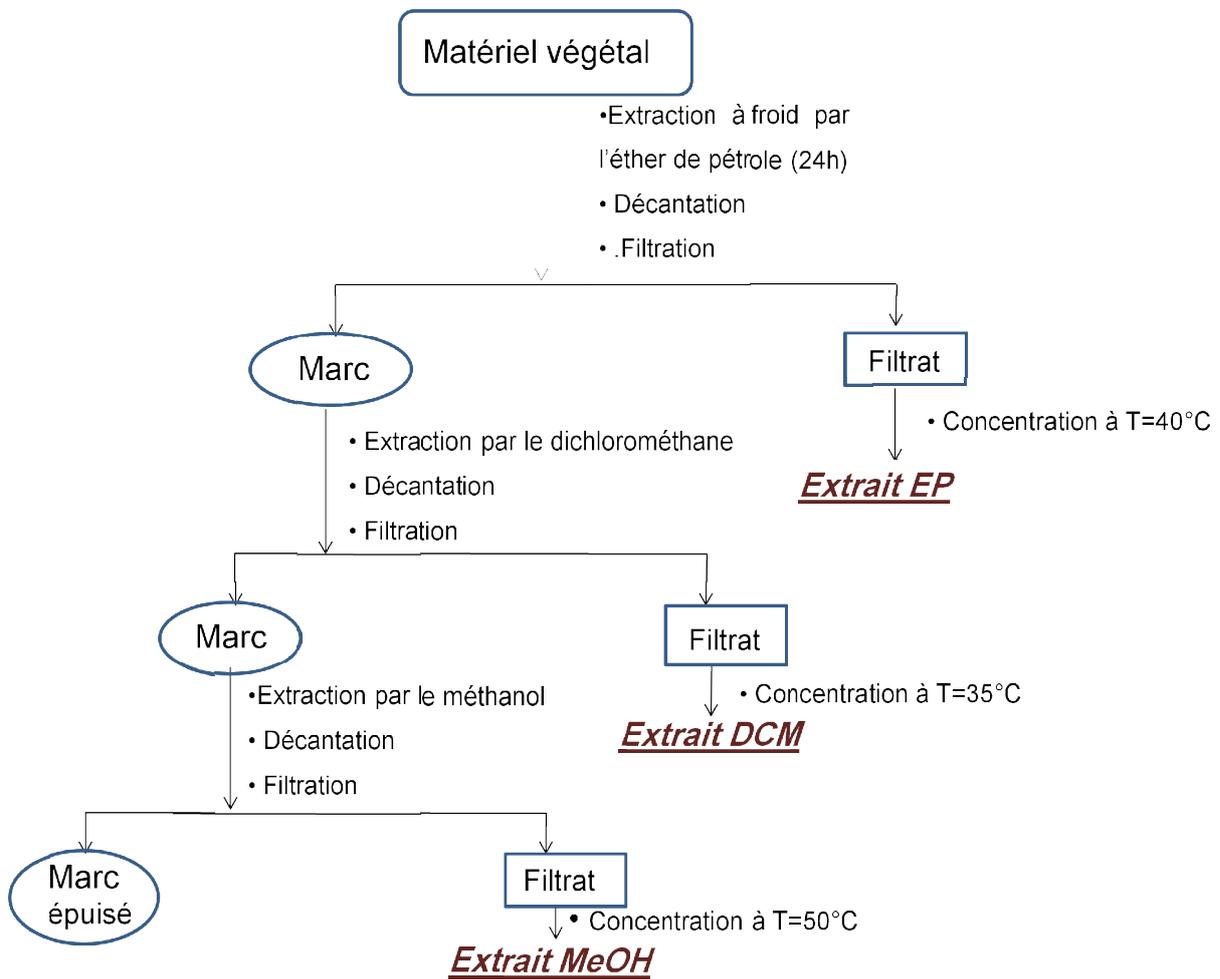


Fig. 22 : Schéma d'extraction par les solvants organiques des poudres de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*.

I.3.2. Extraction par macération à l'eau

La poudre de feuilles (200 g) de chacune des deux espèces sélectionnées est mise à macérer à température ambiante dans l'eau distillée (2 L) pendant 24 heures. Après décantation du

mélange, l'extrait hydrique est récupéré par filtration sur papier Wattman. Le filtrat obtenu est immédiatement congelé à -4°C puis lyophilisé dans un lyophilisateur. Les lyophilisats ont été récupérés dans des flacons en verre hermétiquement fermé et conservé à -4°C jusqu'à leur utilisation où ils sont reconstitué avec de l'eau distillée aux concentrations voulues.

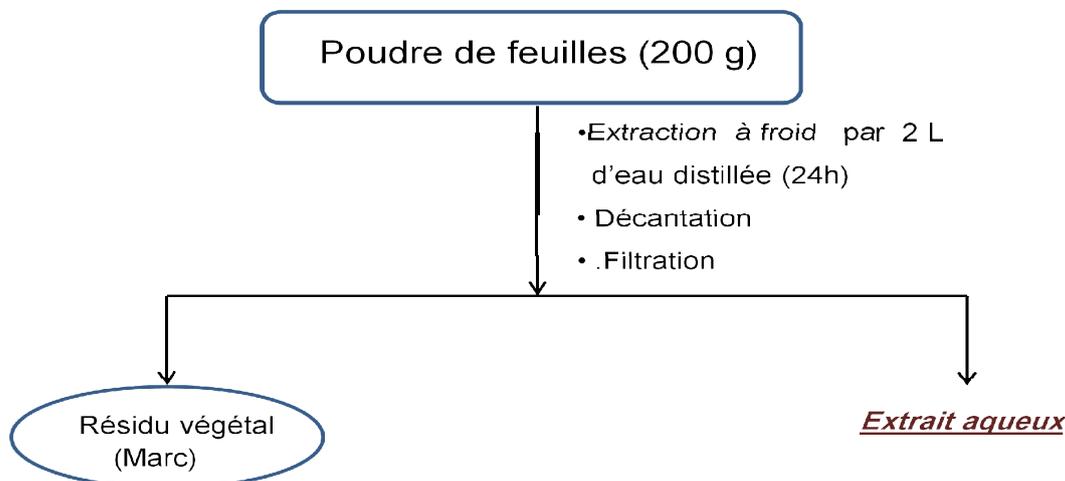


Fig. 21 : Schéma de macération par l'eau distillée des poudres de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*.

La série d'extraction permet d'obtenir quatre extraits bruts : un extrait aqueux (Aq) et trois extraits organique : extrait éther de pétrole (EP), extrait dichlorométhane (DCM) et extrait méthanolique (MeOH). Les extraits secs sont conservés à -4°C jusqu'à utilisation.

I.4. Détermination du rendement

Le poids en extraits secs est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après élimination du solvant par évaporation rotatif) et le poids du ballon vide.

I.5. Etude phytochimique des extraits

Dans le but de caractériser les extraits préparés à partir des feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, des analyses qualitatives et quantitatives ont été effectuées.

I.5.1. Analyses qualitatives

Cette étude permet de mettre en évidence la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols, flavonoïdes) dans nos extraits. Les essais de caractérisation en tube permettent une recherche grossière des composants chimiques; les résultats peuvent être difficilement interprétables. La CCM et l'HPLC confirme les tests en tube.



I.5.1.1. Essais de caractérisation en tube

La raison principale pour le choix de ces substances (flavonoïdes) réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

Méthode :

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide appelé " réaction de Shinoda" (Lock et al., 2006). Le test consiste à ajouter à 1ml de l'extrait, quelques gouttes d'HCl concentré (2N) et environ 0,5g de magnésium métallique. Laisser agir 3 min et regarder le changement de couleur. La présence de flavonoïdes est confirmée par la coloration rouge, orangée, rosée ou rouge violacé.

I.5.1.2. Essais de caractérisation par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM, TLC en anglais) nous permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les différentes classes de composés contenus dans les extraits testés.

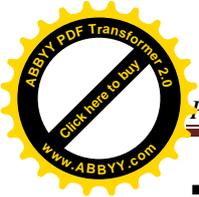
Principe :

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile (Braithwaite et Smith, 1999).

Méthode :

Les analyses sont effectuées en phase normale, avec des plaques de silice (Silicagel 60 F₂₅₄, de 0,25 mm d'épaisseur) déposées sur feuille d'aluminium, ce qui constitue la phase stationnaire. Sur les plaques préparées, on a déposé 10 µl de chaque extrait (100 mg/ml) et standard (5 mg/ml) et les plaques sont ensuite introduites dans des cuves conventionnelles en verre préalablement saturée par la phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée. Dans notre cas, deux systèmes de solvants ont été utilisés (Biallo et al., 2004) :

- Ether de pétrole - Acétate d'éthyle (80 : 20 V/V) pour les extraits apolaire (EP et DCM) ;



▪ *n*-Butanol - Acide acétique - Eau (60 : 15 : 25 V/V/V) pour les extraits MeOH et Aq ;
Après développement, les plaques CCM sont séchées, observées sous lampe UV à 254 nm et 366 nm, pulvérisées par un mélange vanilline sulfurique, puis séchées à 60°C pendant 5 minutes à fin de révéler les spots issus de la séparation.

A 254 nm, les tâches sont encerclées en trait plein et à 366 nm, elles sont encerclées en pointillés, se sont les substances UV actives. La vanilline sulfurique (réactif de Godin) est un réactif à spectre large permet de caractériser des terpenoïdes, des dérivés de type phénylpropanes et des phénols. Elle est formée d'un mélange (V/V) d'une solution éthanolique d'acide sulfurique (V/V) et d'une solution éthanolique de vanilline à 1%.

Les R_f sont comparés à ceux des témoins disponibles facilitant ainsi l'identification de quelques constituants des différents extraits. La valeur du R_f est définie comme suit :

$$R_f = D_i / D_s \quad \text{Où}$$

D_i : Distance entre l'origine et la tâche du produit après élution.
 D_s : Distance entre l'origine et le front du solvant après élution.

Chaque substance a été identifiée par sa fluorescence sous UV, par son rapport frontal (R_f) dans un système de solvant précis et par sa couleur après révélation avec le réactif de la vanilline sulfurique.

1.5.1.3. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance (pression), abrégée HPLC (CLHP en français).

Principe :

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire, mais avec un appareillage plus sophistiqué. La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluant, elle se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système (Braithwaite et Smith, 1999).



Mode opératoire :

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe **HPLC-RP-C18**, équipé d'éléments suivants :

- une colonne (d'une longueur de 125 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm) contenant la phase stationnaire apolaire (phase inverse), cette dernière est constituée de silice modifié chimiquement par greffage de résidus (C-18), ces colonnes en phase inverse permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques ;
- un système de pompage, Pompe: VARIAN 9010, pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars) ;
- un injecteur : VARIAN 9100, pour introduire l'échantillon, dans le système à haute pression ;
- un détecteur monochrome: VARIAN 9065 ;
- un logiciel informatique permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur.

Les conditions opératoires sont les suivantes:

- Débit: 0,5 ml/min ;
- Pression de travail : 100-150 bars ;
- Volume d'injection: 30 μ l ;
- Longueur d'onde: 254 nm ;
- Concentration de l'échantillon: 1-5 mg/ml ;
- Temps d'analyse : 15 min ;

Phase mobile est de composition constante (mode isocratique), elle est composée d'un mélange méthanol - eau (60 : 40 V/V) (Kuntie et al., 2007).

Déférentes substances sont identifiées dans nos extraits par comparaison des chromatogrammes des standards avec ceux des échantillons.

I.5.2. Analyses quantitatives

I.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (Singleton et al., 1999).

**Principe :**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéropolyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéropolyacides, d'où la formation d'un complexe bleu. (Daels-rakotoarison, 1999).

Mode opératoire :

A 0.2 ml d'extrait (préparé dans l'eau distillée avec les dilutions convenables) est ajouté à 0.8 ml de la solution de Na_2CO_3 (75 mg/ml d'eau distillée), après agitation, 1ml de la solution de Folin Ciocalteu (dilué dix fois dans l'eau distillée) est ajouté à l'ensemble, après 2 h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 765 nm contre un blanc sans extrait.

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits, a été calculé à partir d'une courbe d'étalonnage linéaire ($y = ax + b$), établie avec des concentrations précises d'acide gallique (0-200 $\mu\text{g/ml}$), comme standard de référence, dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait de feuilles en poudre ($\mu\text{g EqAG/mg}$).

I.5.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Yi et al., 2007) est employée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans les différents extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*. 1 ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol avec les dilutions convenables) est ajouté à 1ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) établie par la quercétine (0-40 $\mu\text{g/ml}$), réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EqQ/mg d'ext}$).



I.6. Tests des effets biologiques

I.6.1. Tests d'activité antimicrobienne

a- Les souches microbiennes testées

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antimicrobienne des extraits *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* sont les suivants :

- Trois souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 ;
- Trois souches cliniques isolées de patients hospitalisés (au Centre Hospitalier Universitaire de Batna "CHU") pour des infections urinaires : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ;
- Une bactérie aviaire isolée localement de poulets souffrants d'une gastro-entérite d'origine microbienne : *Salmonella typhimurium* ;
- Nous avons utilisé un seul type de levure de référence, à savoir *Candida albicans* ATCC 2071.
- Ils ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie et immunologie, faculté des sciences, département de vétérinaire, université *EL-Hadj Lakhdar* -Batna.

b- Conservation des souches

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

c- Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux différents extraits de plantes ;
- La gélose Sabouraud pour l'isolement et l'entretien de la levure et l'étude de sa sensibilité aux extraits.

d- Préparation des précultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité



optique de 1 McFarland ont été préparées, pour chaque microorganisme, dans 10 ml d'eau distillée stérile.

e- Essais antimicrobiens

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antimicrobien des différents extraits bruts des feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* : la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier (Essawi et Srour, 2000) qui permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des différents extraits et la méthode des microdilutions (Billerbeck et al., 2002) qui a pour objectif la détermination des CMI_s (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture.

I.6.1.1. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des germes pathogènes vis-à-vis des antibiotiques et des extraits bruts.

a. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

On a utilisé cinq antibiotiques différents [ampicilline (**AMP**), céfotaxime (**CTX**), ofloxacine (**OFX**), ticarciline (**TE**) et spiramycine (**SP**)] et un antifongique (nystatine). Le choix a été fait en fonction de la disponibilité.

b. Test de sensibilité aux extraits bruts des plantes : antibioaromatogramme

Les différents extraits organiques des deux plantes sont solubilisés dans le DMSO et les extraits aqueux sont dissouts dans l'eau distillée stérile. La gélose appropriée est coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre et inoculée avec une suspension microbienne pure fraîchement préparée. Deux boîtes sont utilisées pour chaque souche. Un disque de papier Whatman stérile de 6 mm de diamètre est imbibé de 30µl d'extrait (reconstitué selon la concentration voulue) puis déposé à la surface de la gélose ensemencée, l'ensemble est incubé pendant 24 heures à 34°C. Dès l'application des disques imprégnés l'extrait diffuse de manière uniforme et après 24 heures d'incubation, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition



circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition est grande, plus le germe est sensible. Le screening antimicrobien a été effectué avec 3 types de concentrations pour chaque extrait (1g/ml, 0,5 g/ml et 0,25 g/ml).

I.6.1.2. Méthode des microdilutions en milieu solide

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dans le milieu de culture. D'après la méthode de Benjilali et *al.* (1986), rapportée par Billerbeck et *al.* (2002), une solution-mère de chaque extrait (d'une concentration finale de 10 % = 0.1 g/ml) est obtenue en DMSO, puis une série de dilutions de raison géométrique 2 est réalisée extemporanément en DMSO, à partir de la solution-mère ; 2 ml de chaque dilution sont alors incorporés à 38 ml de milieu MH (bactéries) ou de Sabouraud (levure), maintenu en surfusion. Les mélanges sont immédiatement repartis dans deux boîtes de pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0.5 - 0.25 - 0.125 - 0.0625 - 0.0312 - 0.0156 - 0.0078 - 0.0039 - 0.0019 et 0.0010 %. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin) est effectuée en surface, sous forme de dépôts de 1 μ l (réalisés à l'aide d'une micropipette).

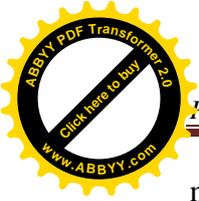
Pour les bactéries, la CMI a été déterminée seulement pour les extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide (dont les diamètres d'inhibition sont ≥ 20 mm), dans une boîte contenant le produit dans le milieu MH plusieurs dépôts ont été effectués (une concentration d'extrait pour toutes les souches). Pour la levure, un seul dépôt est réalisé par boîte contenant l'extrait dans le milieu Sabouraud. Des témoins de croissance et de stérilité du milieu sont réalisés pour chaque souche et chaque série d'essais. Tous les essais sont réalisés deux fois. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans extrait.

I.6.2. Tests d'activité antioxydante

I.6.2.1. Méthode de blanchissement de la β -carotène

Principe :

Ce test mesure l'activité antioxydante envers l'acide linoléique relativement à la β -carotène. Cette dernière n'est pas due être affectée à la présence d'un antioxydant fort. Dans ce cas la solution restera avec la même couleur initial se qui signifie que la β -carotène n'était pas



nécessaire pour empêcher l'oxydation de l'acide linoléique car la présence d'un antioxydant dans l'extrait pouvait faire ainsi (Tepe et al., 2005).

Mode opératoire :

La méthode décrite par Tepe et ces collaborateurs (2005) a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène/acide linoléique a été préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur et 100 ml d'eau oxygénée sont ajoutés, l'émulsion résultante est vigoureusement agitée.

À 2,5 ml du mélange précédent, 350 μ l de chaque extrait ont été ajoutés (à une concentration de 2 mg/ml dans le méthanol sauf l'extrait aqueux dans l'eau distillée), trois répétitions ont été effectuées pour chaque extrait. Les tubes à essai ont été incubés en obscurité à la température du laboratoire. Deux tubes contrôle ont été aussi préparés avec la même procédure, l'un contenant un antioxydant de référence BHT (contrôle positif) et l'autre sans antioxydant (contrôle négatif) où l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR}\% = [\text{Abs}_{48\text{h}} (\text{échantillon})/\text{Abs}_{48\text{h}} (\text{BHT})] \times 100.$$

I.6.2.2. Méthode de réduction du radical libre DPPH :

Principe :

Le DPPH (**fig. 23**) est un radical stable et il présente en solution une absorption caractéristique à 517 nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres. On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où $(\text{AH})_n$ représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH' (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (Brand-Williams et al., 1995).

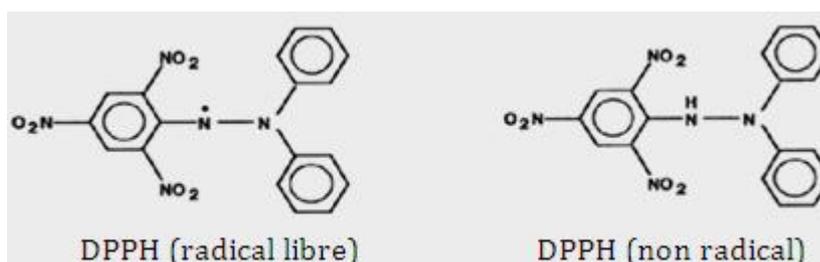


Fig. 23 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

Mode opératoire :

La méthode au DPPH est réalisée par deux techniques différentes :

a. Test anti-radicalaire contre le DPPH sur plaques CCM

Nous avons utilisé la méthode mise au point par Takao et ses collaborateurs (1994). Sur plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) possédant un support en aluminium, nous avons déposé 10 µl de chaque solution d'extrait à la concentration de 10 mg/ml. La plaque a été placée dans une cuve à chromatographie contenant les systèmes de solvant suivant :

- Ether de pétrole - Acétate d'éthyle (80 : 20 V/V) pour les extraits apolaire (EP et DCM).
- *n*-Butanol - Acide acétique - Eau (60 : 15 : 25 V/V/V) pour les extraits polaires (MeOH et Aq).

Après migration, les chromatogrammes ont été séchés, puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH (2mg/ml dans le méthanol). Les constituants de l'extrait présentant une activité antiradicalaire apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune-blanc sur fond violet.

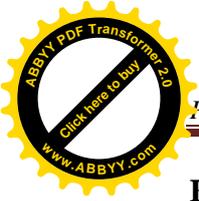
b. Test anti-radicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre

La méthode décrite par Tepe et autres (2005) a été employée. Différentes concentrations comprises entre 0-50 mg/ml des échantillons étudiés (les différents extraits) et des témoins (acide ascorbique et BHT « des antioxydants de référence » ; quercétine et rutine « substance pure »).

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 3 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol, 50 µl de solution échantillons et témoins sont ajoutées à 2 ml de la solution de DPPH, après incubation de 30 min en obscurité à la température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant. L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de deux mesures séparés ± écart type. Le paramètre IC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu) est défini comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur).



Etude statistique

Les analyses de la variance ont été réalisées par le logiciel statistique GraphPad Prism V 5,00. Quelques expériences ont été faites en double et d'autres en triple, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type (n= 2 ou 3) pour chaque cas.

La différence entre les extraits et les contrôles et la détermination des taux de signification sont effectués par test ANOVA suivi du test Tukey. Les différences ont été considérées significatives à $P < 0,05$.



Résultats et Discussion

II. RESULTATS ET DISCUSSION

II.1. Le taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % (Paris et Moyses, 1965). Nous avons utilisé la méthode pondérale pour déterminer la teneur en eau dans la poudre des feuilles sèches de nos plantes. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Les résultats de cette analyse ont révélé un taux d'humidité inférieure à 10% pour les deux plantes *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* (**fig. 24**), les proportions sont respectivement de 9.40 % (± 0.03) et 6.79 % (± 0.18). La teneur en eau, inférieure à 10% confère à notre poudre une meilleure conservation à long terme.

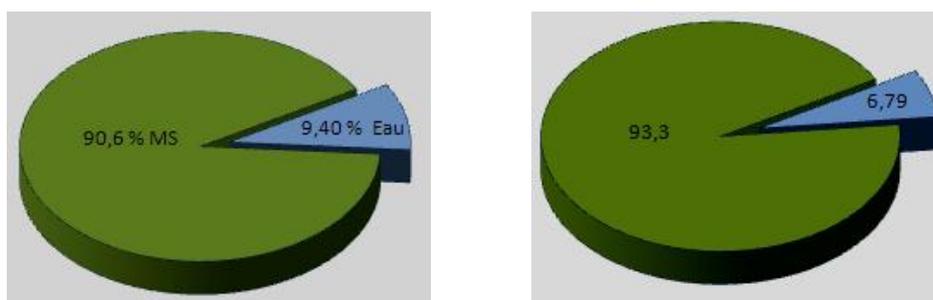
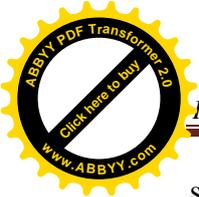


Fig. 24 : Teneur en humidité des feuilles sèches des deux plantes médicinales.

II.2. L'extraction

Pour l'obtention des différents extraits de la poudre de feuilles des deux plantes *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, nous avons réalisé des extractions aqueuses (avec l'eau distillée) et organiques par la méthode de Biallo et al. (2004) (avec des solvants à polarité croissante : EP, DCM et MeOH).

Cette extraction a permis d'obtenir quatre extraits bruts pour chaque plante : l'extrait aqueux (EAq), l'extrait éther de pétrole (EEP), l'extrait dichlorométhane (EDCM) et l'extrait méthanol (EMeOH). Le calcul des rendements par rapport au poids total de la poudre de feuilles montrent que les deux plantes ont donné des masses en extraits sec supérieures à 1 g / 100 g de plante en poudre. Du point de vue rentabilité en poids, les extraits polaires (MeOH et Aq) ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits apolaires (EP et DCM) ; cela peut



s'expliquer par le fait que l'EP et le DCM sont des solvants organiques apolaires très volatils et juste utilisés pour dégraisser les drogues.

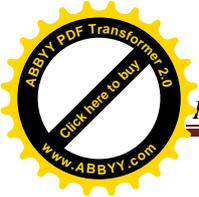
L'extrait MeOH de *Laurus nobilis* représente le rendement le plus élevé (21.94 %) suivi de l'EAq de *Thymus vulgaris* (20.05 %), l'EEP de *Thymus vulgaris* a le plus faible rendement avec 1.94 %. Le rendement des extractions, l'aspect et la couleur des extraits sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Aspects, couleurs et rendements des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*

Plante	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
<i>Thymus vulgaris</i>	EP	Pâte huileuse	Vert foncé	1.94
	DCM	Pâteux	Noire	2.73
	MeOH	Pâte collante	Noire	6.24
	Aq	Poudre	Marron foncé	20.05
<i>Laurus nobilis</i>	EP	Huileux	Vert	4.59
	DCM	Pâteux	Noire	2.96
	MeOH	Pâte collante	verdâtre	21.94
	Aq	Poudre	Jaune	15.2

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre de feuilles selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer ses flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés) (**Tableau 6**). Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante (Lee et al., 2003).

**Tableau 6** : Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés (D'après Ciulei, 1981).

Extraits	Constituants probables
EP	Cires, chlorophylle, lipides, acides gras, stérols, triterpènes, caroténoïdes, huiles essentielles, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines.
DCM	Terpénoïdes, polyphénols aglycones (flavonoïdes, coumarines, tanins, anthracenosides), chlorophylle.
MeOH	Flavonoïdes et coumarines glycosylés, flavonoïdes sulfatés, alcaloïdes, acides aminés, tanins, acides phénoliques, triterpènes et stérols glycosylés.
Aq	Flavonoïdes, aminoacides, terpènes, cires, tanins.

II.3. Résultats de l'étude phytochimique

II.3.1. Résultats de l'analyse qualitative

II.3.1.1. Réactions de caractérisation

Le test de recherche des flavonoïdes dans les différents extraits de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* a donné des réactions positives. Les résultats de cette étude phytochimique sont reportés dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Résultats des réactions de caractérisation des flavonoïdes dans nos extraits

Plante	Extrait	Flavonoïdes
<i>Thymus vulgaris</i>	EP	+++
	DCM	++++
	MeOH	+++
	Aq	++
<i>Laurus nobilis</i>	EP	+
	DCM	++++
	MeOH	+++
	Aq	+

++++ : très abondant ; +++ : abondant ; ++ : moyen ; + : réaction louche.



Ces résultats sont confirmés par la CCM, l'HPLC et le dosage colorimétrique par spectrophotomètre.

II.3.1.2. Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des différents extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, une chromatographie sur couches minces (CCM) a été réalisée suivant la méthode de (Biallo et al., 2004). Les systèmes solvants utilisés :

- Ether de pétrole - Acétate d'éthyle (80 : 20 V/V) pour les extraits apolaires (EP et DCM) ;
- *n*-Butanol - Acide acétique - Eau (60 : 15 : 25 V/V/V) pour les extraits polaires (MeOH et Aq) ;

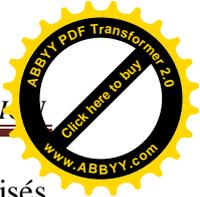
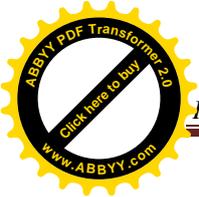
ont permis d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots, (**Fig. 25 et 26**). Les extraits Aq ont été éliminés du fait qu'ils donnent une tâche diffuse massive dû à la phase mobile utilisée, inadéquate pour la séparation des composés très polaires.

Les témoins utilisés dans cette analyse n'ont pas migrés avec le système de solvant apolaire et par conséquent on ne peut pas comparer leurs R_f avec ceux des extraits apolaires (EP et DCM) puisque ils ont migré dans deux systèmes de séparation différents.

Les résultats de la chromatographie sur couche mince de tous nos extraits sont résumés dans les **tableaux 8 et 9**. Il s'agit des informations sur les facteurs de rétention des constituants chimiques, leur comportement à la lumière UV (à 254nm et à 366nm), et leur coloration après révélation avec le réactif de Godin.

La majorité des spots observés avec l'extrait EP se retrouvent au niveau de l'extrait DCM et cela pour les deux plantes étudiées. (**Fig. 25**).

Les extraits apolaires (EP et DCM) des feuilles des deux plantes (*Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*) ont montré après observation à l'UV (254 et 366 nm) et révélation par le réactif de Godin une richesse en constituants chimiques. A 254 nm, la majorité des spots apparaissent sombres. A 366 nm, les spots apparaissent en vert et en jaune. Après révélation par le Godin, la majorité des spots apparaissent en bleu sombre, signalons la présence des spots franches de couleur violet foncé, rose et vert-bleu. Tout ce nombre de spots élevé et de couleurs variés constitue une indication sur la présence de plusieurs types de substances chimiques. Selon Bruneton (1993), la fluorescence à 366 nm pourrait indiquer la présence des coumarines, des stérols ou des triterpènes et jaune intense au Godin pourraient être des flavonoïdes.

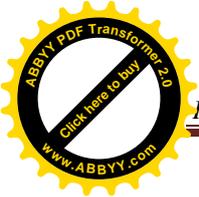


Les solvants éther de pétrole et dichlorométhane sont apolaires et sont généralement utilisés pour dégraisser la drogue. A l'œil nu, les taches à R_f égal à 0.02, 0.07, 0.18 et 0.87 apparaissent vertes. Les colorations vertes de certaines taches à l'oeil nu des extraits éther de pétrole et dichlorométhane sont typiques des chlorophylles.

La tache à $R_f = 0.28$ dans les extraits EP et DCM a une fluorescence verte à 366 nm et se colore en jaune intense après révélation au Godin. Cette coloration serait une indication sur la présence de flavonoïdes (Andersen et Markham, 2006).

Tableau 8 : Résultats de la séparation par CCM des extraits apolaires (EP et DCM) des feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* dans le système solvant : Ether de pétrole - Acétate d'éthyle (80 : 20).

EXTRAIT	N°Spot	R_f	Observation à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Godin
EP (Tv)	EP ₁	0.02	-	Jaunâtre	-
	EP ₂	0.18	-	Vert	-
	EP ₃	0.28	-	Vert	Jaune foncé
	EP ₄	0.55	-	Jaune	Rose
	EP ₅	0.65	Visible	-	-
	EP ₆	0.87	Visible	-	-
DCM (Tv)	DCM ₁	0.02	-	Jaunâtre	-
	DCM ₂	0.18	-	Vert	-
	DCM ₃	0.28	-	Vert	Jaune foncé
	DCM ₄	0.55	-	Jaune	Rose
	DCM ₅	0.61	Visible	-	Bleu sombre
	DCM ₆	0.65	Visible	-	-
	DCM ₇	0.87	Visible	-	-
EP (Ln)	EP ₁	0.02	-	Jaunâtre	-
	EP ₂	0.07	Visible	Vert clair	-
	EP ₃	0.09	-	-	Bleu sombre
	EP ₄	0.11	Visible	-	-
	EP ₅	0.28	-	Vert	Jaune foncé
	EP ₆	0.29	Visible	-	-
	EP ₇	0.49	Visible	-	Violet foncé
	EP ₈	0.87	Visible	Jaune	Bleu sombre
DCM (Ln)	DCM ₁	0.04	-	Vert clair	-
	DCM ₂	0.06	Visible	-	-
	DCM ₃	0.09	-	-	Bleu sombre
	DCM ₄	0.11	Visible	-	-
	DCM ₅	0.28	-	Vert sombre	Jaune foncé
	DCM ₆	0.49	-	-	Violet foncé
	DCM ₇	0.55	Visible	-	-
	DCM ₈	0.62	Visible	-	-
	DCM ₉	0.68	Visible	-	-
	DCM ₁₀	0.82	Visible	-	-
	DCM ₁₁	0.87	Visible	Jaune	Bleu sombre



Par calcul des rapports frontaux des extraits MeOH et leur comparaison avec ceux des témoins (**Tableau 9**) les composés suivants ont été identifiés :

- La rutine et la quercétine dans l'extrait MeOH de *Thymus vulgaris* ;
- La catéchine dans l'extrait MeOH de *Laurus nobilis*.

Les différences de couleurs entre les spots issus de la séparation des extraits et leurs témoins correspondants peuvent être expliquées par le fait qu'un composé, présent dans un mélange complexe (extrait), acquière des propriétés différentes de celles du même composé pur. Ces résultats restent tout de même préliminaires.

Tableau 9 : Résultats de la séparation par CCM des extraits polaires (MeOH et Aq) des feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* dans le système solvant :
B.A.W. (60 : 15 : 25)

Extraits / Témoins	N°Spot	Rf	Observati on à 254 nm	Fluorescence à 366 nm	Godin
Rutine		0.60	-	Brun	Jaune foncé
Ac gallique		0.83	-	Bleu clair	Rose clair
Ac tannique		0.87	-	Bleu	Rose clair
Quercétine		0.93	-	Brun	Jaune marron
Catéchine		0.95	-	Bleu clair	Rose foncé
MeOH (Tv)	MeOH ₁	0.14	-	-	Marron sombre
	MeOH ₂	0.42	-	Bleuâtre	-
	MeOH ₃	0.54	-	-	Violet
	MeOH ₄	0.60	-	Bleuâtre	-
	MeOH ₅	0.68	-	Bleuâtre	-
	MeOH ₆	0.81	Visible	Vert clair	-
	MeOH ₇	0.93	-	Orange	Vert
MeOH (Ln)	MeOH ₁	0.54	Visible	Bleuâtre	-
	MeOH ₂	0.68	Visible	Orange	-
	MeOH ₃	0.95	Visible	Brun	Orange

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (fluorescence, coloration, facteur de rétention...).

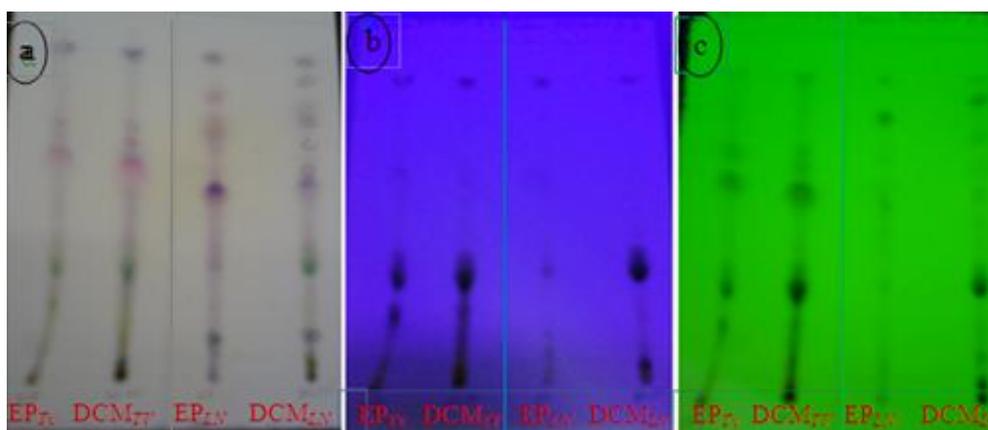


Fig. 25 : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits bruts apolaires par CCM (dans le système solvant : Ether de pétrole - Acétate d'éthyle 80 : 20).

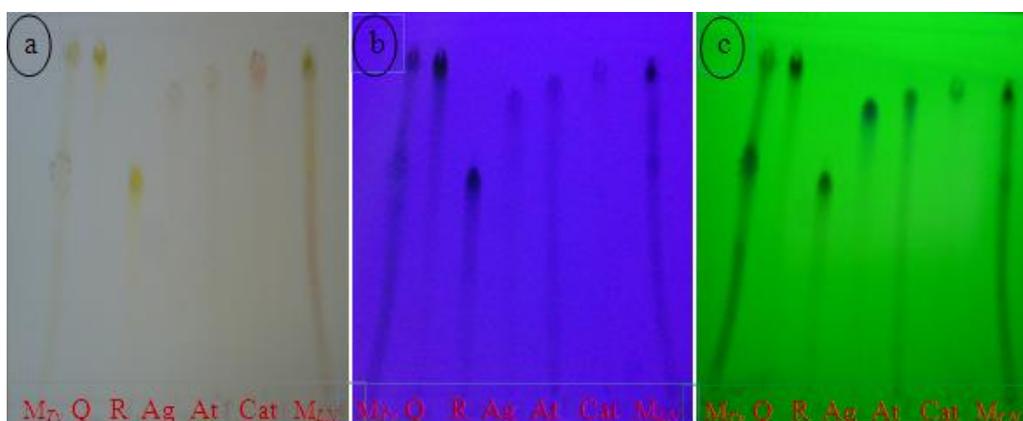


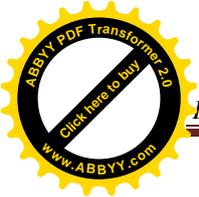
Fig. 26 : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits Bruts MeOH par CCM (dans le système solvant : BAW 60 : 15 : 25).

- a : chromatogramme photographié après révélation avec le réactif de Godin.
- b : chromatogramme photographié sous lampe UV à 366 nm.
- c : chromatogramme photographié sous lampe UV à 254 nm.

II.3.1.3. Résultats de caractérisation par HPLC

Les résultats de l'analyse HPLC-RP-C18 des extraits de feuilles des deux plantes aromatiques sont présentés dans le **tableau 11**. Les chromatogrammes de cette analyse HPLC sont présentés dans les **fig. 27** et **28**. Comme peut être observé (suivant le nombre de pics sur les chromatogrammes), Les extraits apolaires (EP et DCM) sont plus riches en substances chimiques que les extraits polaires (MeOH et Aq) et cela confirme les résultats obtenus par CCM.

Six composés phénoliques purs (Ac gallique, Ac tannique, Ac caféique, catéchine, rutine, quercétine) ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme témoins. Leurs chromatogrammes sont représentés dans la **fig. 44** (Annexe) et leurs temps de rétentions (Tr) dans le tableau ci-suivant.

**Tableau 10** : Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec HPLC

Standards	Tr (min)
Ac gallique	1.67
Ac tannique	1.64
Ac caféique	1.96
Catéchine	1.77
Rutine	3.37
Quercétine	6.74

Tableau 11 : Résultats de l'HPLC des différents extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*

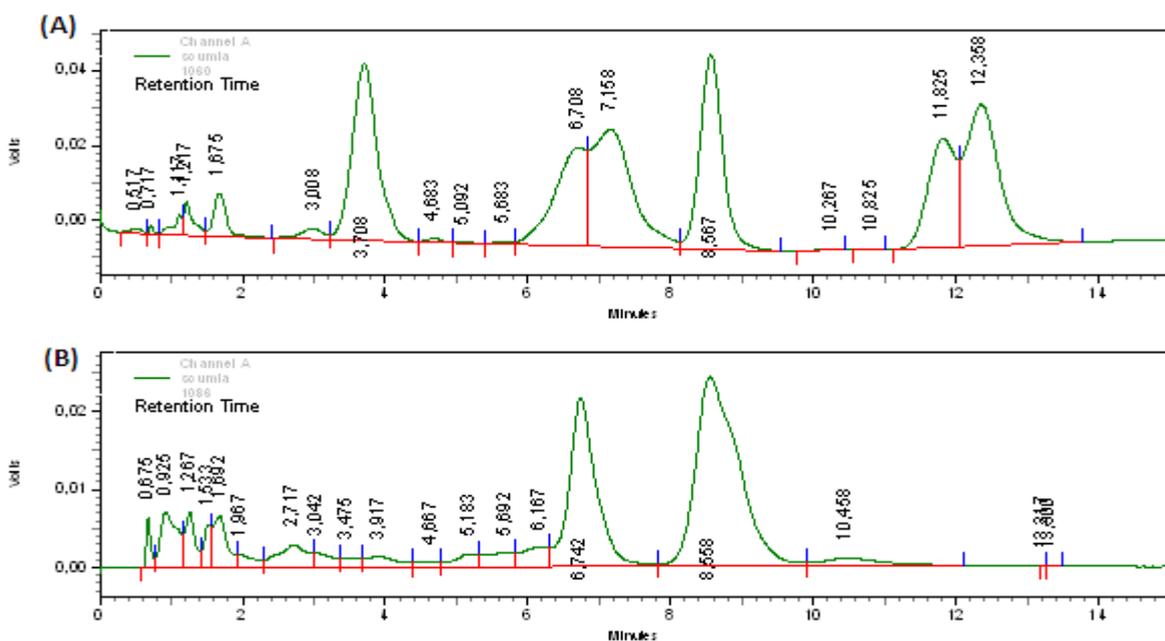
Plante	Standards	Ac gallique	Ac tannique	Ac caféique	Catéchine	Rutine	Quercétine
	Extraits						
<i>Thymus vulgaris</i>	EP	+	-	-	-	-	-
	DCM	-	-	+	-	-	+
	MeOH	-	-	-	-	+	-
	Aq	-	-	-	+	-	-
<i>Laurus nobilis</i>	EP	-	-	-	-	-	-
	DCM	-	-	-	-	-	-
	MeOH	-	+	-	-	-	-
	Aq	-	+	-	-	+	-

L'HPLC a permis d'identifier cinq polyphénols dans les extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* parmi les six étudiés, à savoir : l'Ac gallique dans l'extrait EP, l'Ac caféique et la quercétine dans l'extrait DCM, la rutine dans l'extrait MeOH et la catéchine dans l'extrait Aq.

De nombreuses études se sont intéressées à l'identification des composés polyphénoliques dans les extraits de *Thymus vulgaris* par analyse HPLC (Morimitsu *et al.*, 1995 ; Guillén et Manzanos, 1998 ; Kulišić *et al.*, 2006) (voir la partie bibliographique). Ces études ne sont pas tout-à-fait en accord les un aux autres et de même à nos résultats. *Thymus vulgaris* est une plante médicinale active, elle représente un polymorphisme chimique remarquable. Dans la même espèce, le contenu biochimique de ces extraits différents de manière significative selon où et dans quelles conditions la plante a fait sa croissance. La présence et la concentration de certains constituants chimiques fluctuent également selon la saison et la maturation de la plante (Amiot, 2005).

Deux polyphénols seulement ont été identifiés dans les extraits polaires de *Laurus nobilis*, à savoir : l'Ac tannique dans les extraits MeOH et Aq et la rutine dans l'extrait Aq. Alors qu'aucun des six polyphénols étudié n'a été identifié dans les extraits apolaires. Très peu de recherches se sont intéressées aux flavonoïdes des feuilles de *Laurus nobilis*. Kivçak et Mert (2002) ont pu identifier des flavonoïdes polaires (dérivées glycosylées de quercétine, kaempferol et de catéchine) et apolaires (quatre dérivés acylés de kaempferol).

Ces résultats ne correspondent pas à ceux trouvé pour la CCM, sauf celui de la rutine identifiée dans l'extrait MeOH de *Thymus vulgaris*. Cela confirme que la CCM est insuffisante pour identifier un constituant précis, mais elle permet de donner des informations globale sur nos extraits.



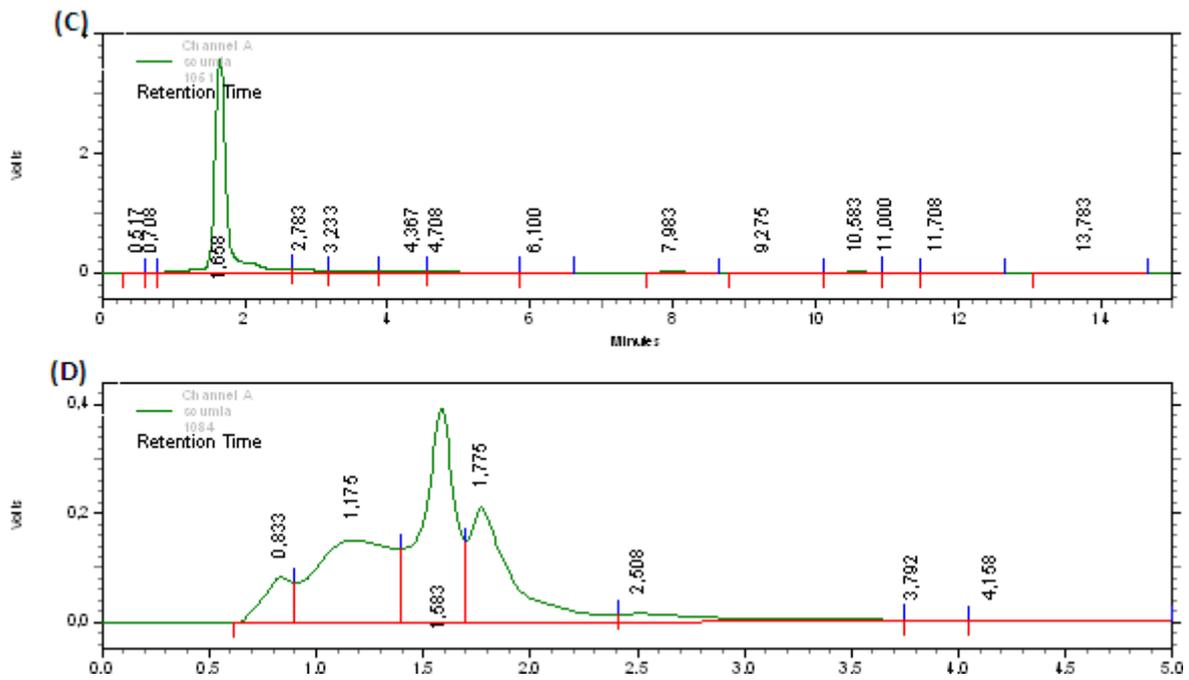
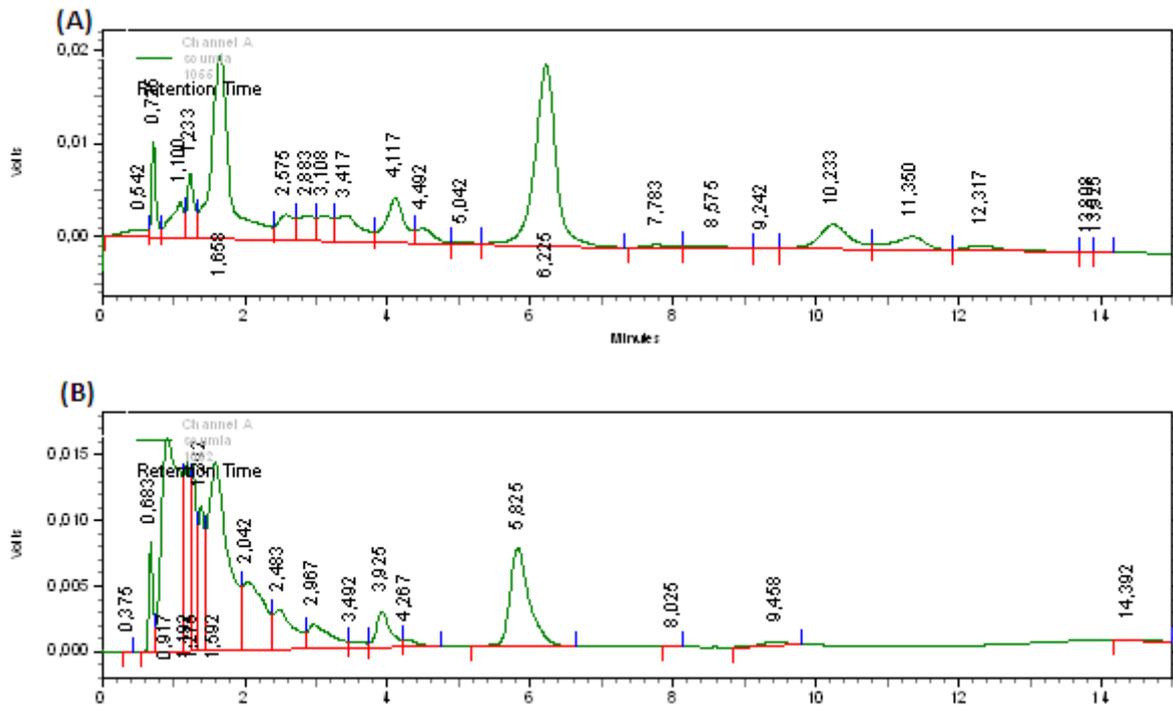


Fig. 27 : Chromatogrammes d'HPLC des extraits de *Thymus vulgaris* organisés selon leur polarité croissante [(A) : EP ; (B) : DCM ; (C) : MeOH ; (D) : Aq].



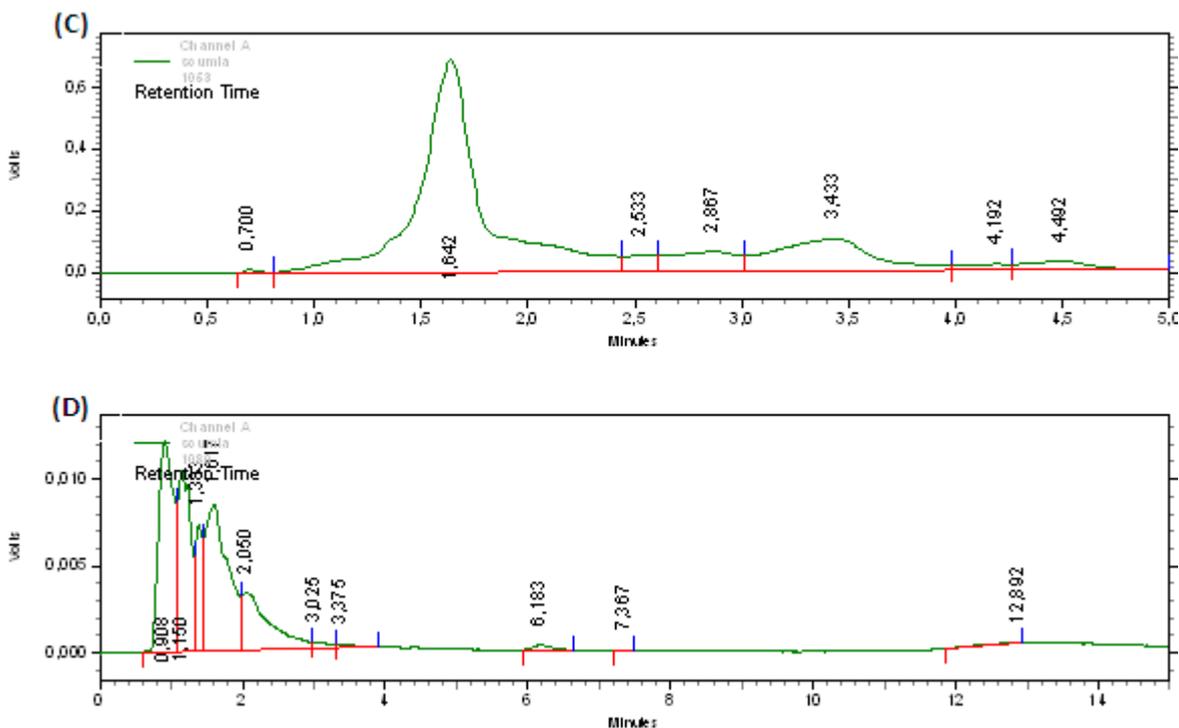


Fig. 28 : Chromatogrammes d’HPLC des extraits de *Laurus nobilis* organisés selon leur polarité croissante.

II.3.2. Résultats de l’analyse quantitative

II.3.2.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

L’étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir des feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués. Deux droites d’étalonnages (fig. 29 et 30) ont été tracées pour cette objectif qui sont réalisées avec des solutions d’étalons à différentes concentrations.

Les quantités des polyphénols et des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en microgramme d’équivalents de l’étalon utilisé par milligramme d’extrait ($\mu\text{g EE/mg d'extrait}$) et déterminés par l’équation de type : $y = a x + b$.

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (Singleton et al., 1999). L’acide gallique a été utilisé comme étalon (Fig. 29). Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d’aluminium (Yi et al., 2007) et l’étalon été la quercétine (Fig. 30). Les résultats sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*.

Plante	Extrait	Teneur en polyphénols	Teneur en flavonoïdes
<i>Thymus vulgaris</i>	EP	79.27 ± 6.05	9.83 ± 1.03
	DCM	218.09 ± 38.37	14.60 ± 3.14
	MeOH	165.45 ± 32.14	7.68 ± 0.86
	Aq	67.63 ± 5.73	1.20 ± 0.07
<i>Laurus nobilis</i>	EP	33.18 ± 0.65	0.77 ± 0.13
	DCM	40.63 ± 3.02	14.45 ± 4.15
	MeOH	166.81 ± 8.69	4.75 ± 0.21
	Aq	129.09 ± 7.50	0.14 ± 0.02

Les valeurs représentent la moyenne de 2 à 3 mesures ± SD.

Suivant le tableau ci dessus, les teneurs en polyphénols enregistrés en équivalent d'acide gallique en µg par mg d'extrait, montre des proportions allant de 6.7 à 21.8 % de poudre de *Thymus vulgaris* et de 3.3 à 16.6 % de poudre de *Laurus nobilis*.

Concernant la teneur en flavonoïdes, les résultats sont exprimés en équivalent quercétine en µg par mg d'extrait et les proportions vont de 0.1 à 1.4 % pour les extraits de *Thymus vulgaris* et de 0.0 à 1.4 % pour les extraits de *Laurus nobilis*.

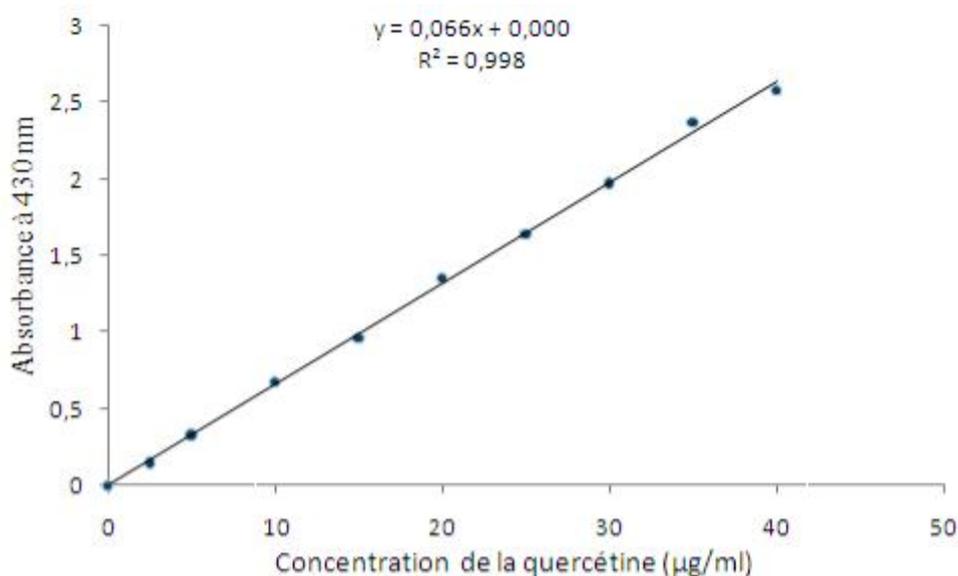


Fig. 29 : Droite d'étalonnage des flavonoïdes (moyenne ± SD de trois mesures).

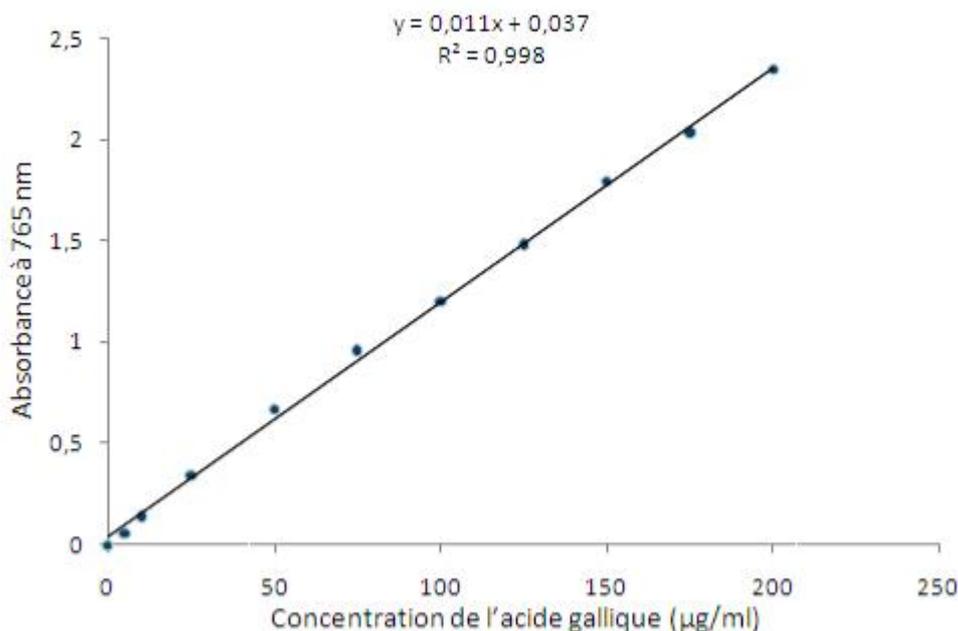


Fig. 30 : Droite d'étalonnage des polyphénols (moyenne ± SD de trois mesures).

L'extrait DCM de *Thymus vulgaris* représente la teneur la plus élevée en polyphénols, ce résultat confirme la grande richesse des feuilles de *Thymus vulgaris* en substances polyphénoliques. L'extrait EP de *Laurus nobilis* représente la fraction la plus pauvre en polyphénols avec 3.3 %. Alors qu'en contenu flavonoïdique, l'extrait DCM de *Thymus vulgaris* ainsi que celui de *Laurus nobilis* ont les teneurs les plus importantes. Les teneurs les plus basses ont été obtenues avec l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* avec une proportion de 0.01%.

Kulišić et ses collaborateurs (2006) ont déterminé, par des méthodes spectrophotométriques, le contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans l'infusion aqueuse préparée des feuilles de *thymus vulgaris*. La teneur en polyphénols dans cette extrait est de 33.3 µg EAG/mg d'extrait, la comparaison entre la teneur en polyphénols trouvée dans le macéré aqueux des feuilles de *thymus vulgaris* (présente étude) et celle de l'infusion aqueuse des feuilles de la même plante étudiée par Kulišić et ses collaborateurs nous a permis de déduire que la teneur en polyphénols dans notre extrait est deux fois plus élevée. Cet extrait est, en outre, plus pauvre en flavonoïdes en comparaison à l'infusion aqueuse étudiée par Kulišić et ses collaborateurs qui est de 25.0 µg EAG/mg d'extrait. Il est important de souligner que l'utilisation de plante d'origine géographique et climatique distinctes ainsi que des méthodes d'extraction et de dosage différentes réduisent la fiabilité d'une comparaison entre les deux études.

II.4. Résultats des tests des effets biologiques

II.4.1. Résultats du test du pouvoir antimicrobien

II.4.1.1. Résultats de l'activité antimicrobienne testée par la méthode de diffusion à partir d'un disque solide

a. Sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Le tableau ci-dessous reporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions atteintes avec les différentes souches étudiées.

Tableau 13 : Antibiogramme des germes étudiés en présence des différents Antibiotiques (diamètre de la zone d'inhibition en mm)

ATB Souches	AMP	CTX	OFX	TE	SP
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25.08 ± 0.90	36.65 ± 0.58	37.33 ± 1.12	14.33 ± 0.00	12.67 ± 0.15
<i>S. aureus</i>	8.0 ± 0.10	33.00 ± 0.86	22.11 ± 3.46	12.05 ± 0.05	12.00 ± 0.00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	21.67 ± 0.21	26.32 ± 0.75	33.00 ± 0.28	14.0 ± 0.28	9.5 ± 0.50
<i>E. coli</i>	7.0 ± 0.00	22.00 ± 0.29	21.00 ± 0.00	8.0 ± 0.10	10.0 ± 0.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.33 ± 0.57	20.43 ± 0.11	18.5 ± 0.00	7.5 ± 0.86	7.33 ± 0.10
<i>P. aeruginosa</i>	0 ± 0.00	0 ± 0.00	16.83 ± 0.50	0 ± 0.00	6.5 ± 1.46
<i>S. typhimirium</i>	10.75 ± 0.50	24 ± 1.00	29.76 ± 0.58	9.5 ± 0.00	10.33 ± 0.57

On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés, même s'il s'agit de deux souches d'une même espèce bactérienne (exemple : *S. aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* clinique) ce qui montre le caractère mutagène de ces souches qui leur permet d'acquérir la résistance aux antibiotiques. Parmi les souches étudiées les *Pseudomonas* se révèlent multirésistantes.

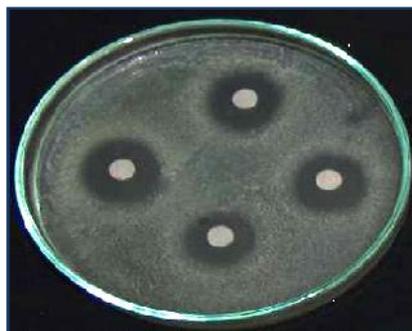


Fig. 31 : Activité de la nystatine sur la levure *C. albicans* ATCC 2071.

Concernant la levure *C. albicans*, un seul antifongique (nystatine = Mycostatine) a été utilisé et la zone moyenne d'inhibition est de 16.09 ± 1.15 mm (**fig. 31**).

a. Sensibilité aux extraits bruts des plantes : test d'inhibition

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux extraits (antibioaromatogrammes) sont regroupés dans le **tableau 14**. Les valeurs indiquées sont les moyennes de deux mesures. L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action bactériostatique si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm (Sağdaç, 2003).

Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées. On remarque aussi que la plante *Thymus vulgaris* est douée de propriétés antimicrobiennes très appréciées et cela justifie son utilisation dans le traitement traditionnelle comme un remède antibactérien. En plus, la plante *Laurus nobilis* montre aussi une certains activité inhibitrice de la croissance microbienne mais moins intéressante.

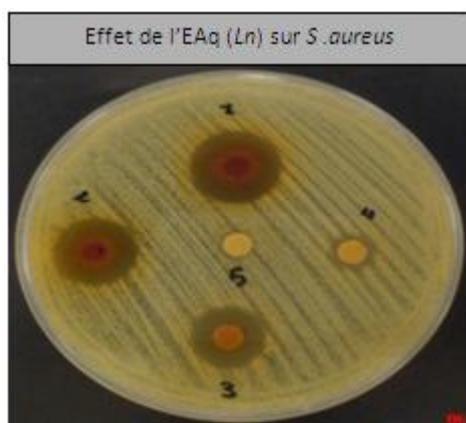


Fig. 32 : Effet inhibiteur dose dépendant de nos extraits.

1 : 1 g/ml ; 2 : 0,5 g/ml ; 3 : 0,25 g/ml ; 4 : 0.125 g/ml ; 5 : 0.0625 g/ml.

Le **tableau 14** ainsi que la **fig. 32** montrent clairement la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration de l'extrait appliquée (1 g/ml, 0.5 g/ml et 0.25 g/ml). On observe aussi de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibitions obtenues, allant de 7 mm à 64 mm.

L'activité antimicrobienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présents dans ces extraits, y compris les huiles essentielles (en particulier thymol et carvacrol),



les flavonoïde et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas et al. 1992 ; Marjorie, 1999). La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antimicrobienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes. L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000). Pour cela, la comparaison cas par cas de l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits, en se basant sur le dosage d'un seul constituant actif (flavonoïdes dans notre cas), nous semble inutile.

Nos extraits ont été tous trouvé contenir une quantité de flavonoïde plus ou moins importante, donc on peut dire que l'activité antimicrobienne de ces extraits est due, au moins partiellement, à la présence de se type de composés chimiques actifs dans leur composition, surtout pour les extraits polaires (MeOH et Aq).

Les extraits EP (apolaires) des deux plantes, malgré leurs teneurs très faibles en flavonoïdes, ils montrent une activité antimicrobienne remarquable (**tableau 14**). L'importante action antimicrobienne démontrée par l'extrait EP de *Thymus vulgaris* est en relation avec sa teneur élevée en huile essentielle qui contient un composé phénolique majoritaire thymol ($\approx 51.25\%$) et un autre minoritaire carvacrol ($\approx 3.3\%$). Ces deux derniers sont réputés avoir une très grande action antimicrobienne (Ettayebi et al., 2000 ; Ultee et al., 2000 ; Friedman et al., 2002 ; Chun et al., 2005), il cause la perforation de la membrane bactérienne et le flux rapide des composants cytosoliques (Thuille et al., 2003 ; Shunying et al., 2005).

L'extrait EP de *Thymus vulgaris* est plus actif que celui de la plante *Laurus nobilis*, parce que l'huile essentielle de cette dernière dont les constituants majoritaires inclut des alcools (cinéol, linalol, eugénol...) est reconnus mois actif que celle de *Thymus vulgaris* (dont les constituants principales : thymol et carvacrol) (Burt, 2004).



Tableau 14 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance microbienne par les différents extraits bruts étudiés (en mm)

Les plantes	Les extraits	Les dilutions (g/ml)	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>P. Aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. typhimirium</i>	<i>C. Albicans</i> ATCC 2071
<i>Thymus vulgaris</i> L	EP	1:1	42.19 ± 1.57***	45.90 ± 1.69***	33.64 ± 1.08***	42.54 ± 1.54***	15.72 ± 0.43***	23.64 ± 0.48***	32.10 ± 0.56***	64.12 ± 1.85***
		1:2	32.27 ± 1.33	39.07 ± 1.50	30.56 ± 0.76	36.68 ± 0.96	13.09 ± 0.26	20.56 ± 0.36	25.09 ± 0.31	34.90 ± 0.96
		1:4	31.60 ± 0.64	33.14 ± 0.87	26.61 ± 0.63	32.03 ± 0.66	12.26 ± 0.23	16.61 ± 0.33	19.58 ± 0.14	29.26 ± 0.27
	DCM	1:1	37.65 ± 1.27***	39.08 ± 1.43***	28.30 ± 0.36***	36.18 ± 0.84***	14.65 ± 0.50***	19.55 ± 0.56***	28.79 ± 0.76***	63.94 ± 1.89***
		1:2	28.83 ± 0.45	36.56 ± 1.07	25.07 ± 0.28	32.67 ± 0.69	11.83 ± 0.16	16.45 ± 0.43	24.53 ± 0.60	32.30 ± 0.65
		1:4	20.70 ± 0.11	23.38 ± 0.40	21.85 ± 0.21	12.34 ± 0.26	9.59 ± 0.07	13.00 ± 0.13	09.37 ± 0.06	27.23 ± 0.36
	MeOH	1:1	nd	38.05 ± 0.88***	nd	34.35 ± 1.21***	19.29 ± 0.41***	nd	25.90 ± 0.56***	00.00 ± 0.00
		1:2	nd	35.35 ± 1.00	nd	31.55 ± 1.00	15.83 ± 0.26	nd	19.92 ± 0.37	00.00 ± 0.00
		1:4	nd	27.80 ± 0.20	nd	24.8 ± 0.67	15.55 ± 0.17	nd	09.07 ± 0.11	00.00 ± 0.00
	Aq	1:1	nd	15.73 ± 0.50***	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
		1:2	nd	13.70 ± 0.46	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
		1:4	nd	13.26 ± 0.41	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
<i>Laurus nobilis</i> L	EP	1:1	13.19 ± 0.26 ^{ns}	16.14 ± 0.69 ^{ns}	00.00 ± 0.00	07.50 ± 0.09 *	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	14.48 ± 0.57 ^{ns}
		1:2	12.08 ± 0.16	12.09 ± 0.28	00.00 ± 0.00	06.89 ± 0.11	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	09.82 ± 0.41
		1:4	11.26 ± 0.05	10.56 ± 0.07	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.07	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	09.17 ± 0.06
	DCM	1:1	17.24 ± 0.33 ^{ns}	nd	12.41 ± 0.39 ^{ns}	09.96 ± 0.16 ^{ns}	00.00 ± 0.00	09.36 ± 0.16 ^{ns}	00.00 ± 0.00	16.40 ± 0.33 ^{ns}
		1:2	15.76 ± 0.31	nd	10.31 ± 0.52	08.70 ± 0.18	00.00 ± 0.00	09.30 ± 0.18	00.00 ± 0.00	10.36 ± 0.16
		1:4	11.52 ± 0.16	nd	08.59 ± 0.24	07.46 ± 0.05	00.00 ± 0.00	07.01 ± 0.07	00.00 ± 0.00	07.89 ± 0.07
	MeOH	1:1	21.15 ± 0.50 ^{ns}	nd	11.64 ± 0.45 ^{ns}	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
		1:2	18.16 ± 0.18	nd	09.52 ± 0.16	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
		1:4	16.35 ± 0.00	nd	08.77 ± 0.12	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
	Aq	1:1	nd	16.50 ± 0.00 ^{ns}	08.00 ± 0.19 ^{ns}	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
		1:2	nd	12.70 ± 0.45	06.15 ± 0.02	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00
		1:4	nd	07.80 ± 0.50	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00	00.00 ± 0.00

nd : zone non déterminé.

Les comparaisons sont effectuées entre le diamètre de la zone d'inhibition de l'antibiotique le plus actif pour chaque souche et celui obtenu par la concentration 1 : 1 (1g/ml) de chaque extrait brut. *** p≤0.001, **≤0.05, * ≤0.01, ns : non significatif.



Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits DCM des deux plantes étudiées sont très proches (**tableau 12**), cependant, l'activité antimicrobienne de l'extrait DCM de *Thymus vulgaris* est plus importante. Cela peut être expliquée par le fait que cet extrait peut contenir des traces de thymol (puisque c'est un extrait moyennement polaire) ou il contient en plus des flavonoïdes d'autres composés à activité antimicrobienne.

Le **tableau 13** montre que les différents antibiotiques possèdent des effets distincts sur les bactéries testées. Ces effets sont significativement inférieur ($P \leq 0.001$) à ceux des extraits EP et DCM de *Thymus vulgaris*. Ces résultats sont très intéressants puisqu'elles témoignent d'une très forte activité bactériostatique des extraits apolaires de *Thymus vulgaris*. Ces extraits agissent de façon très active sur l'ensemble des souches testées. Dans le cas de *Candida albicans*, levure responsable de mycoses chez l'homme, les résultats sont spectaculaires, il est évident que *Candida albicans* est la plus sensible aux extraits EP et DCM de *Thymus vulgaris*. En revanche, aucune activité anticandidosique (sur *Candida albicans*) n'a été observée avec les extraits polaires (MeOH et Aq) des deux plantes.

Par ailleurs, nos résultats montrent donc une grande variabilité des qualités bactériostatiques des extraits vis-à-vis des différentes souches. Les deux souches de *Staphylococcus aureus* à gram positif sont plus sensibles que les autres souches bactériennes testées à gram négatif. La résistance de ces dernières n'est pas surprenante, en fait, ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides qui est en relation avec la nature de leurs membranes externes composées de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisants de la membrane externe, des substances inactives contre ces bactéries deviennent actives.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* se révèlent les plus résistantes, cela est liée à sa grande capacité de développer des résistances vis-à-vis de nombreux agents antimicrobiens, d'où son implication fréquente dans les infections hospitalières (Mann et al., 2000). Plusieurs auteurs rapportent la faible sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (Thuille et al., 2003 ; Bouhdid et al. 2006).

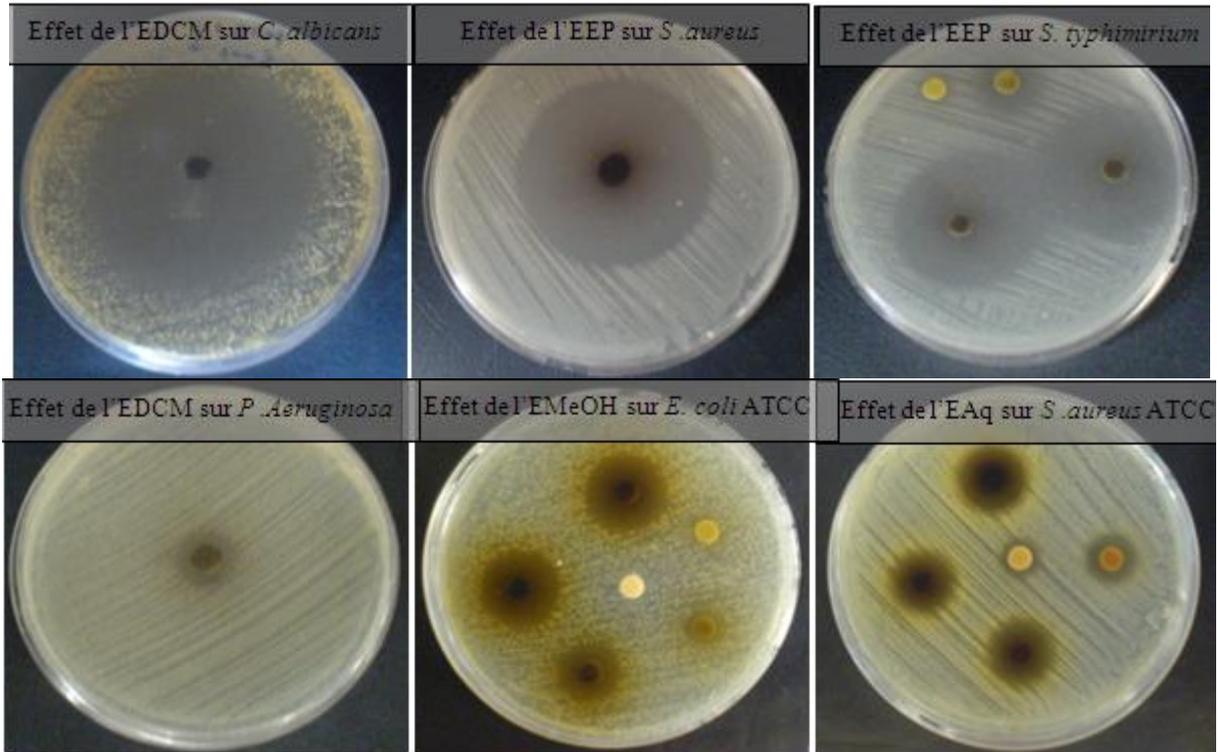


Fig. 33 : Exemples de l'effet des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* sur la croissance microbienne.

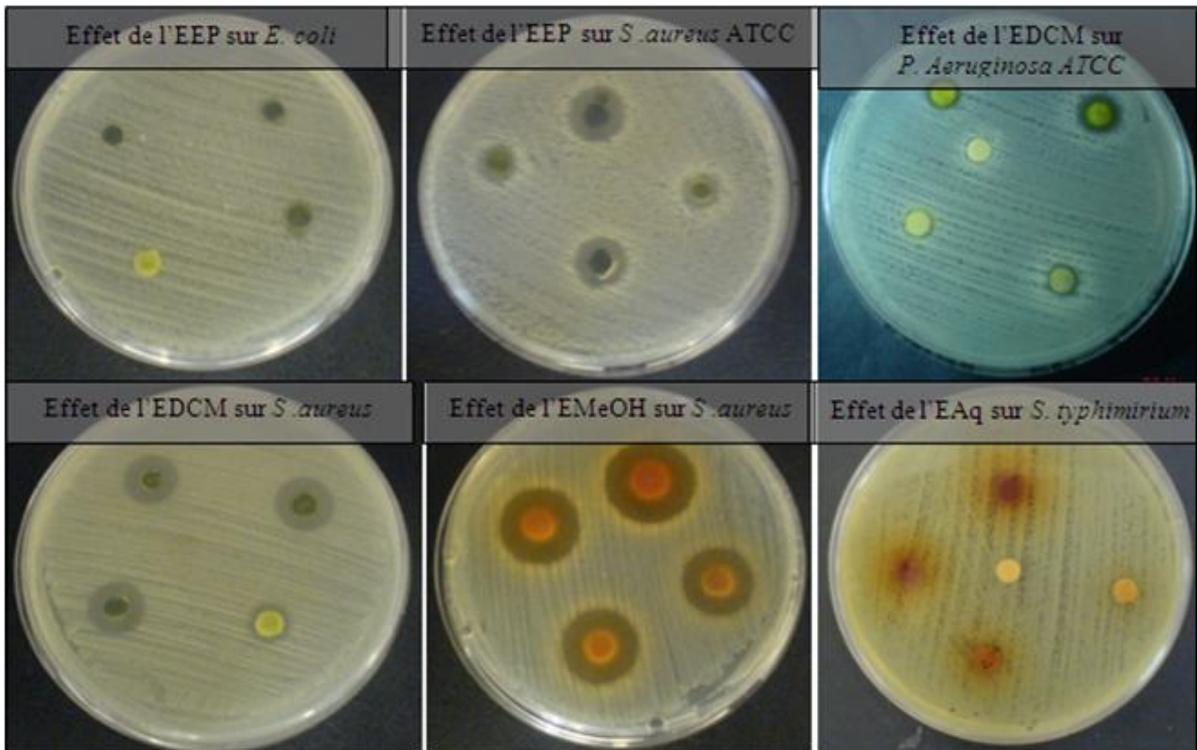


Fig. 34 : Exemples de l'effet des extraits de feuilles de *Laurus nobilis* sur la croissance microbienne.

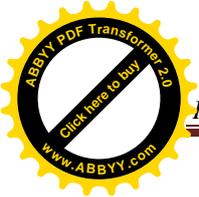


Plusieurs études ont eu pour objet la détermination du pouvoir antimicrobien de certains extraits de *Thymus vulgaris*, on cite celles de Tabak et ses assistants (1996), Ettayebi et ses collaborateurs (2000), Thuille et autres (2003), Bouhdid et collègues (2006) et plusieurs autres qui ont tous révélé une importante activité de ces extraits surtout les huiles essentielles. Nos résultats confirment ces travaux car les extraits de *Thymus vulgaris* sont les plus actifs sur presque toutes les souches testées.

Par ailleurs, nous avons comparé nos résultats obtenus avec l'extrait EP (extrait apolaire) de *Thymus vulgaris* avec ceux de Bouhdid et ses collaborateurs (2006), qui ont étudié le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à chémotypes thymol (36.58 %), sur plusieurs souches, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli*, et *S. aureus* ; ils ont obtenu les résultats suivants : 8.0 mm, 20.0 mm et 22.0 mm respectivement. Nos résultats sont beaucoup plus élevés par rapport à ces derniers, cela est dû à plusieurs raisons, premièrement, leurs souches sont peut être plus résistantes que les nôtres ; deuxièmement, au fait que les échantillons de plante (*Thymus vulgaris*) utilisés sont d'origine géographiques différentes, ce qui fait intervenir le phénomène de polymorphisme chimique ; enfin, ces chercheurs ont utilisé comme extrait l'huile essentielle pure alors que notre extrait (EP) contient en plus de l'huile essentielle d'autres composés chimiques à activité antimicrobienne (surtout les flavonoïdes apolaires) qui travaille en synergie au sein de l'extrait.

Nos résultats obtenus avec les extraits polaires (MeOH et AQ) de *Thymus vulgaris* ont été comparé avec ceux de Essawi et Srour (2000), ces deux savants ont étudié l'activité antibactérienne des extraits alcoolique et aqueux de *Thymus vulgaris*. Nous avons obtenu des résultats très proches pour l'extrait aqueux : *S. aureus* (13.5 mm), *E. coli* (0.0 mm), *E. coli ATCC* (0.0 mm) et *P. aeruginosa ATCC* (0.0 mm) ; en revanche, ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos résultats pour l'extrait alcoolique : *S. aureus* (26.0 mm), *E. coli* (18.5 mm), *E. coli ATCC* (0.0 mm) et *P. aeruginosa ATCC* (0.0 mm), cela est dû au fait que nous avons utilisé des méthodes d'extraction différentes en plus des deux premières raisons cité ci-dessus.

Cependant, très peu de recherches se sont intéressées à l'étude de l'activité antimicrobienne de *Laurus nobilis*. Une seule a été trouvée en littérature à ce sujet réalisé par Atanda et ces collègues (2007). Ils ont évalué le potentiel de control des mycètes aflatoxinogéniques (*Aspergillus parasiticus CFR 223*) et de la production d'aflatoxine par l'huile des feuilles de laurier. Cette dernière a stimulé *in vitro* la croissance des mycéliums du mycète mais a réduit la concentration de son aflatoxine de 55.21%.



La sensibilité des souches médicales, même celles multi-résistantes aux antibiotiques (*P. aeruginosa*, **tableau 13**), aux extraits DCM et EP de *Thymus vulgaris* suggère leur possible utilisation en thérapeutique comme alternative naturelle aux agents chimiothérapeutiques dont le spectre d'action est en réduction continue.

II.4.1.2. Résultats de l'activité antimicrobienne testée par la méthode de microdilution en milieu solide

Nous rapportons dans le **tableau 15** les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de nos extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide, dont les diamètres d'inhibition sont ≥ 20 mm (choix arbitraire), qui sont obtenues par la méthode de microdilution en milieu gélosé. Les CMI sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition, obtenus avec la méthode de l'antibioaromatogramme.

Tableau 15 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI exprimée en $\mu\text{g/ml}$) des différents extraits (dont les diamètres des zones d'inhibitions sont $\geq 20\text{mm}$) relatives aux bactéries testées

Plante	Souches		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. Albicans</i> ATCC 2071
	Extraits	<i>S. aureus</i>					
<i>Thymus vulgaris</i>	EP	156	156	2 500	156	2 500	< 10
	DCM	312	312	5 000	625	5 000	39
	MeOH	-	312	-	2 500	5 000	-
<i>Laurus nobilis</i>	MeOH	> 5 000	> 5 000	-	-	-	-

Aligiannis et ses collaborateurs (2001) ont proposés une classification des extraits du matériel végétal sur la base des résultats des CMI, comme suit : – forte inhibition : CMI inférieure à 500 $\mu\text{g/ml}$; – inhibition modérée : CMI varie de 600 $\mu\text{g/ml}$ à 1 500 $\mu\text{g/ml}$; – faible inhibition : CMI supérieure à 1 600 $\mu\text{g/ml}$. Ainsi, selon cette classification, on constate une très forte inhibition avec l'extrait EP de *Thymus vulgaris* sur les souches suivantes : *C. Albicans*, *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* respectivement, alors que l'extrait DCM de la même espèce est très active sur la levure *C. Albicans* et les deux souches de staphylocoques.

Par ailleurs, l'extrait MeOH de *Laurus nobilis* inhibe les staphylocoques (les bactéries les plus sensibles) à des CMI nettement supérieurs à celles obtenues avec les autres extraits de *Thymus vulgaris*, CMI > 5 000 $\mu\text{g/ml}$, donc possède la plus faible inhibition par rapport à ces dernier.



Globalement l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* est plus importante que celle de *Laurus nobilis* avec un spectre antimicrobien plus large et à des doses plus faibles.

Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Thuille et ses collaborateurs (2003), qui ont déterminé les CMI d'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris* sur sept souches microbiennes, notamment : *S. aureus* ATCC (2 500 µg/ml), *E. coli* ATCC (> 5 000 µg/ml). Ils ont enregistré une faible activité par rapport à nos souches.

II.4.2. Résultat du test du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante *in vitro* de nos extraits a été évaluée par deux méthodes différentes : la technique de décoloration de la β-carotène et le test de DPPH.

II.4.2.1. Méthode de blanchissement de la β-carotène (BCB)

L'aptitude de nos extraits bruts à inhiber la peroxydation des lipides a été évaluée par la technique de décoloration de la β-carotène, cette dernière est habituellement employée pour estimer l'activité antioxydante des substances dans les émulsions, accompagnée de l'oxydation couplée de la β-carotène et de l'acide linoléique. Cette analyse n'a pas pu être exécutée avec l'extrait DCM dû à une couleur verte sombre et au précipité formé avec cet extrait des deux plantes étudiées.

Pour se renseigner sur la puissance de nos extraits à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides, nous avons réalisé un suivi de la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps, ce qui est bien montré dans les **fig. 35** et **36**. On a remarqué expérimentalement, que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, mais cette diminution reste moins rapide par rapport à celle de la solution control (-), et devient stable dans un laps de temps assez prolongé pour les mélanges qui contiennent un extrait apolaire, ainsi la solution change de couleur instantanément du jaune au blanc. Ce qui n'est pas le cas avec un mélange qui contient un extrait polaire où la réaction de l'oxydation se produit dans un intervalle de temps plus court.

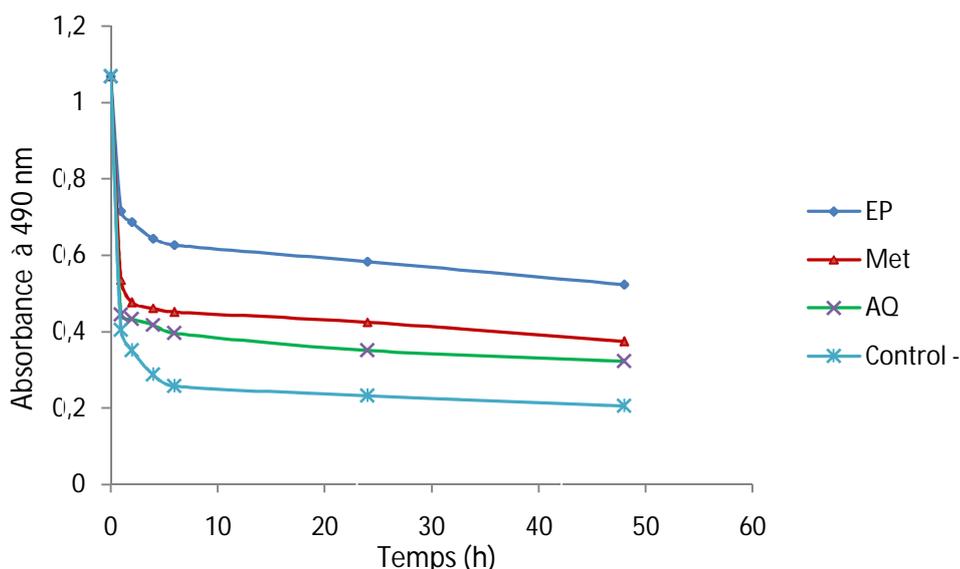
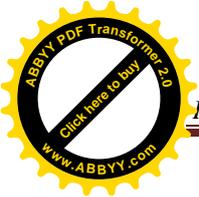


Fig. 35 : Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par 250 μ g/ml des extraits des feuilles de *Thymus vulgaris*.

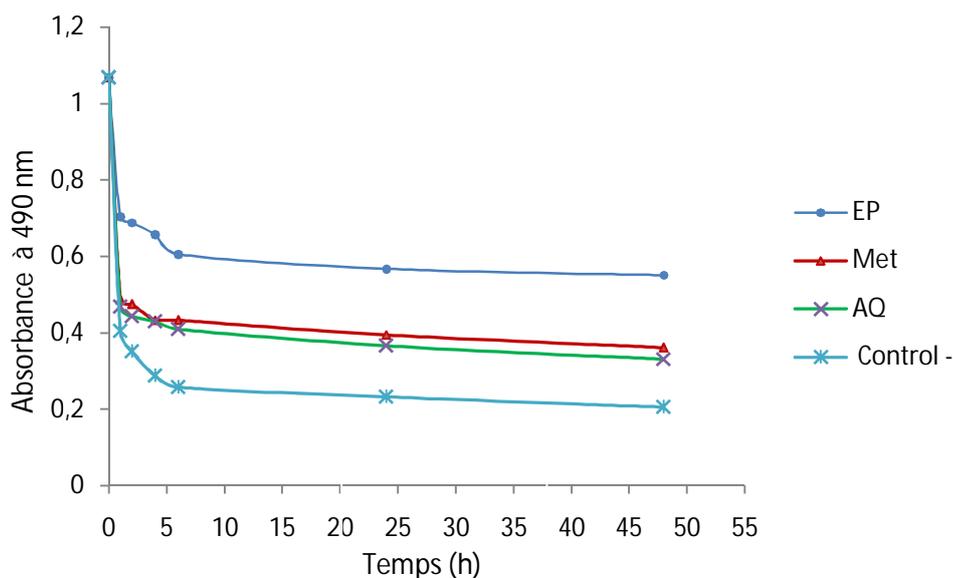
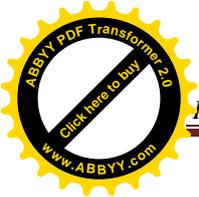


Fig. 36 : Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par 250 μ g/ml des extraits des feuilles de *Laurus nobilis*.

Le **tableau 16** rapporte les valeurs moyennes de trois mesures d'AAR% (coefficients d'activité anti-radicalaire) \pm SD calculées à partir de la formule donnée dans la partie matériel et méthode, ces valeurs facilitent des comparaisons de l'activité relative des différents extraits, du contrôle positif (BHT) et du contrôle négatif.

**Tableau 16** : Le pouvoir anti-radicalaire des extraits bruts et du control positif

Extraits et Control	AAR%
EP (<i>Tv</i>)	53.60 ± 0.88***
MeOH (<i>Tv</i>)	38.40 ± 1.28***
Aq (<i>Tv</i>)	34.20 ± 3.30***
EP (<i>Ln</i>)	56.48 ± 1,49***
MeOH (<i>Ln</i>)	37.03 ± 0,92***
Aq (<i>Ln</i>)	34.02 ± 0,92***
Control + (BHT)	99.10 ± 0,60 ^{ns}
Control -	16.69 ± 1,28***

Les valeurs sont une moyenne de trios mesures ± SD. Les comparaisons sont effectuées entre l'AAR% du control + (BHT) et celui des extraits bruts. *** $p \leq 0.001$, ns : non significatif.

Les résultats montrent que l'oxydation de l'acide linoléique est efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité anti-radicalaire la plus élevée est trouvée pour les extraits EP de *Laurus nobilis* et de *Thymus vulgaris* avec 56.48 et 53.60% d'inhibition respectivement, une activité qui reste significativement inférieure à celle du BHT (99.10%, $p \leq 0.001$). Les autres extraits montrent des activités voisines mineures.

Les extraits EP sont des fractions assez complexes dans leur composition et peuvent contenir différents composés agissant indépendamment ou en synergie. Ces deux extraits forment une bonne source d'antioxydants vu que leur capacité d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique n'est pas très loin de celle du BHT, l'un des antioxydants majeurs.

Les extraits polaires sont surtout riches en substances chimiques hydrosolubles, leur activité antioxydante démontrée par cette méthode (BCB), peu quelle soit, est peut être due surtout à la présence des composés flavonoïdes présents dans ces extrait, ce qui est confirmé par la corrélation linéaire notable et significative observée ($r=0.9827$, $p < 0.01$) entre leur teneur en flavonoïdes et leur pouvoir antioxydant (**fig. 37**).

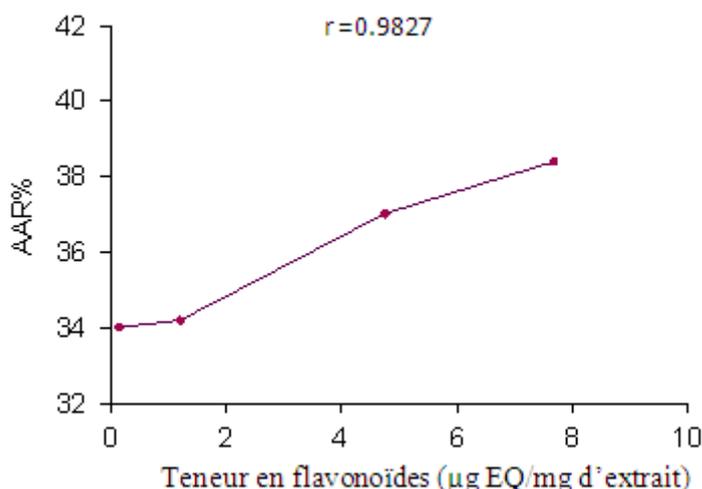


Fig. 37 : Courbe de corrélation entre l'activité antioxydante des extraits polaires et leur teneur en flavonoïdes.

L'activité antioxydante exprimée comme des valeurs d'AAR% diminuées dans l'ordre BHT > EP (Ln) > EP (Tv) > MeOH (Tv) > MeOH (Ln) > Aq (Tv) > Aq (Ln).

Kulšić et ses collaborateurs (2006) ont trouvé que malgré le fait que l'acide ascorbique, comme substance polaire, est un antioxydant bien connu, son activité antioxydante n'a pas été avérée par cette méthode.

Ceci peut être expliqué par un phénomène énoncé comme " paradoxe polaire " comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs (1994). Etant donné que le test de blanchissement de la β -carotène est similaire à un système d'émulsion des lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation de la β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant secondaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

D'une façon générale, le comportement antioxydant des composés dans les émulsions n'a pas encore été complètement expliqué (Schwarz, 2000). Les extraits bruts de notre étude, qu'on a obtenus à partir des deux plantes *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, représentent un mélange de composés différents, principalement apolaire pour les deux extraits EP et DCM et polaire pour extraits MeOH et Aq, qui complique l'explication détaillée de leur activité antioxydante par cette méthode.

II.4.2.2. Méthode de réduction du radical libre DPPH

a. Test anti-radicalaire contre le DPPH sur plaques CCM

Après révélation par le DPPH, les extraits bruts et les témoins (Rutine, Quercétine, Acide gallique et la Catéchine), ont montré des zones d'activités franches contre le DPPH de couleur jaune blanche sur un fond violet.

Les chromatogrammes des différents extraits apolaires révélés par une solution de DPPH, présentent quelques constituants à activité anti-radicalaire qui apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune blanc sur fond violet. Ces constituants, capables de réduire le radical DPPH oxydant, donnent des indications intéressantes pour une activité anti-radicalaire des extraits. La plus forte activité a été observée avec l'extrait DCM de *Thymus vulgaris*.

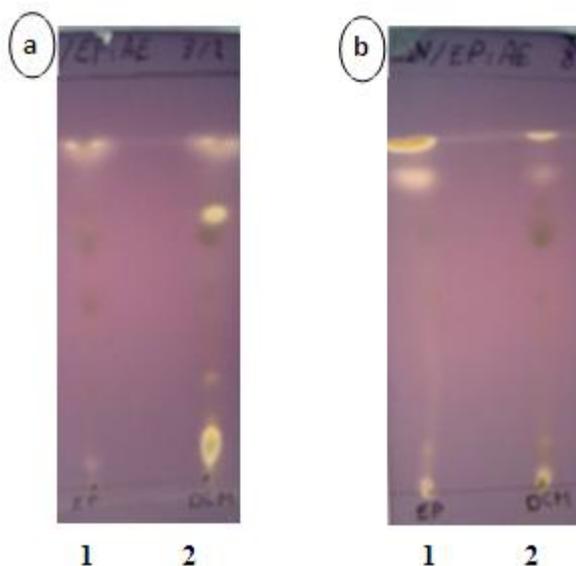


Fig. 38 : Résultats du test antioxydant des extraits apolaires de *Thymus vulgaris* (a) et *Laurus nobilis* (b) sur CCM après révélation au DPPH.

1 : Extrait EP, 2 : Extrait DCM.

L'extrait MeOH des feuilles de *Laurus nobilis* a présenté la meilleure activité anti-radicalaire avec une tâche massive étendue le long du trajet de l'élution (**Fig. 39**) Ce résultat témoigne de sa

richesse en substances chimiques hydrosolubles à haute activité anti-radicalaire, cette activité peut être due surtout à la présence de composés polyphénoliques présents en teneurs élevée dans cet extrait (**tableau 12**).

L'extrait MeOH de *Thymus vulgaris* montre aussi un pouvoir piègeur du radical DPPH intéressant mais moins important que celui de *Laurus nobilis*.

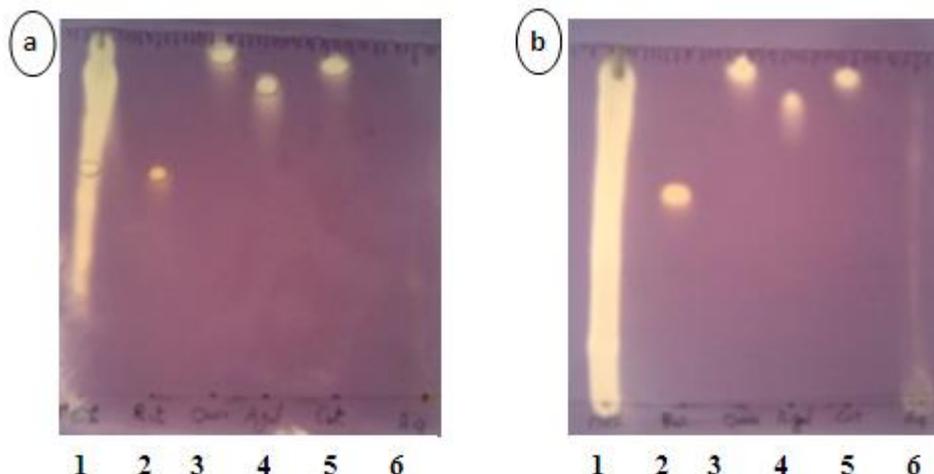


Fig. 39 : Résultats du test antioxydant des extraits polaires de *Thymus vulgaris* (a) et *Laurus nobilis* (b) sur CCM après révélation au DPPH.

1 : Extrait MeOH, 2 : Rutine, 3 : Quercétine, 4 : Acide gallique, 5 : Catéchine, 6 : Extrait Aq.

Les chromatogrammes (**Fig. 39**) montrent également la haute capacité de piégeage des radicaux libres par les acides phénoliques (acide gallique) et les flavonoïdes (quercétine, rutine, catéchine). Cependant, la diversité chimique des extraits MeOH de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* inclut différents composés avec une capacité de donner un hydrogène ou un électron.

Les extraits aqueux sont les moins actifs, avec des spots pas très nets, surtout pour l'extrait Aq de *Thymus vulgaris*, cela à cause de leurs teneurs faibles en composants actifs qui est peut être dû à la méthode d'extraction (extraction par macération à l'eau).

b. Test anti-radicalaire contre le DPPH mesuré au spectrophotomètre

Contrairement à la méthode de BCB, la méthode de DPPH est indépendante de la polarité de substrat. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. la forme non radicalaire DPPH-h est formée. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts des plantes aromatiques *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* ont été fait en comparaison avec celle des différents antioxydants : acide ascorbique, BHT, quercétine et rutine (**tableau 17**).

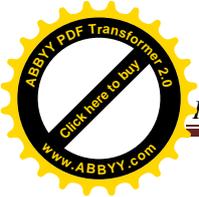


Tableau 17 : IC₅₀ et puissance anti-radicalaire (APR) des extraits bruts et des standards

Extraits et Standards	IC ₅₀ (µg/ml)	APR
EP (Tv)	88.00 ± 2.876	0.01***
DCM (Tv)	43.19 ± 1.149	0.02***
MeOH (Tv)	7.29 ± 0.407	0.14***
Aq (Tv)	13.97 ± 0.584	0.07***
EP (Ln)	94.44 ± 5.502	0.01***
DCM (Ln)	189.42 ± 8.591	0.005***
MeOH (Ln)	6.33 ± 0.136	0.16***
Aq (Ln)	8.19 ± 0.211	0.12***
Ac ascorbique	2.42 ± 0.036	0.41***
BHT	6.18 ± 0.412	0.16***
Quercétine	0.50 ± 0.011	2.00 ^{ns}
Rutine	1.08 ± 0.112	0.93***

Les comparaisons sont effectuées entre l'APR du standard le plus actif (Quercétine) et celui des autres standards et extraits bruts. *** p ≤ 0.001, ns : non significatif.

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC₅₀ (**tableau 17**), ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC₅₀ sont déterminés graphiquement des deux tests séparés, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. La valeur de chaque IC₅₀ exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50% de DPPH en solution.

Un autre paramètre exprime la puissance anti-radicalaire a été calculée à partir du premier paramètre noté : "ARP" (pouvoir anti-radicalaire, égale à 1/IC₅₀). Les valeurs ARP de tous les extraits sont significatives. Plus ces valeurs ne tendent pas et s'éloignent du zéro, plus la puissance antioxydante augmente. On peut dire que nos extraits présentent une activité antioxydante et que la capacité de piéger le radical libre DPPH est puissante avec les extraits polaires et modeste avec les extraits apolaires.

Comme figurant dans le tableau ci-dessus, la quercétine est le piègeur du radical DPPH le plus puissant parmi les quatre témoins utilisés (suivez de la rutine), ce qui est confirmé par la bibliographie que les flavonoïdes sont des capteurs puissants de radicaux (Fuhrman et al., 1995 ; Rice-Evans et ses collaborateurs 1996 ; Jovanovic et al., 1998).

Tous les IC₅₀ sont très basses, comprises entre 6 et 13 µg/ml. Suivant ce paramètre, les capacités de piégeage du radical sont classées dans l'ordre :

Quercétine > Rutine > Ac ascorbique > BHT > MeOH (Ln) > MeOH (Tv) > Aq (Ln) > Aq (Tv) > DCM (Tv) > EP (Tv) > EP (Ln) > DCM (Ln).

Nos extraits polaires surtout MeOH possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH intéressantes, puisqu'ils agissent à faible dose, mais reste significativement inférieur à celle des témoins. la quercétine est 12 à 14 fois plus active ($p \leq 0.001$), la rutine est 6 à 7 fois plus active ($p \leq 0.01$) et l'acide ascorbique est 2 à 3 fois plus actif ($p \leq 0.05$) alors que le BHT montre une activité analogue à celle des deux extraits MeOH (ils sont statistiquement similaires).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par le test réalisé sur les plaques CCM. Cette action réductrice peut être expliquée par la présence de taux relativement élevés de polyphénols dans ces deux extraits. Une corrélation linéaire remarquable et significative a été observée ($r=0.9601$, $p < 0.05$) entre la teneur en polyphénols dans les extraits MeOH_{Ln}, MeOH_{Tv}, Aq_{Ln} et Aq_{Tv} (respectivement) et leur pouvoir piégeur du DPPH (**fig. 40**).

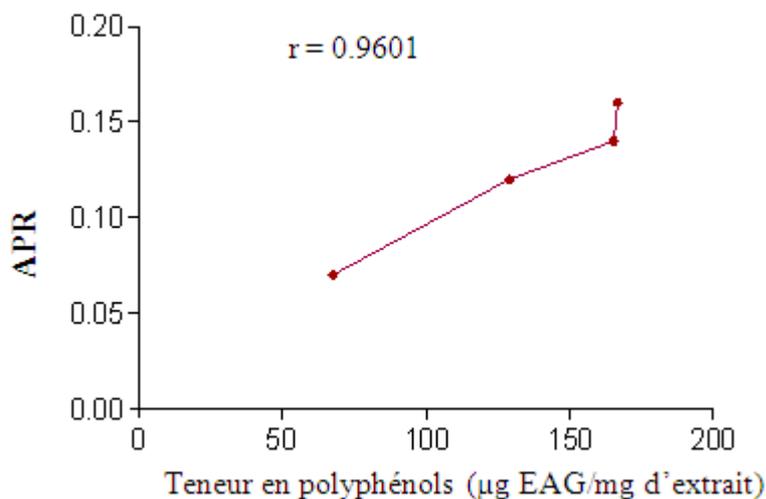


Fig. 40 : Courbe de corrélation entre l'activité anti-radicalaire des extraits polaires et leur teneur en polyphénols.

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical DPPH est présenté dans les figures ci-dessous (**Fig. 41, 42 et 43**). Le pourcentage du DPPH réduit par les différents antioxydants mesurés à 517 nm, montre une augmentation rapide de ce dernier dans un intervalle très réduit de la dose de l'extrait brut.

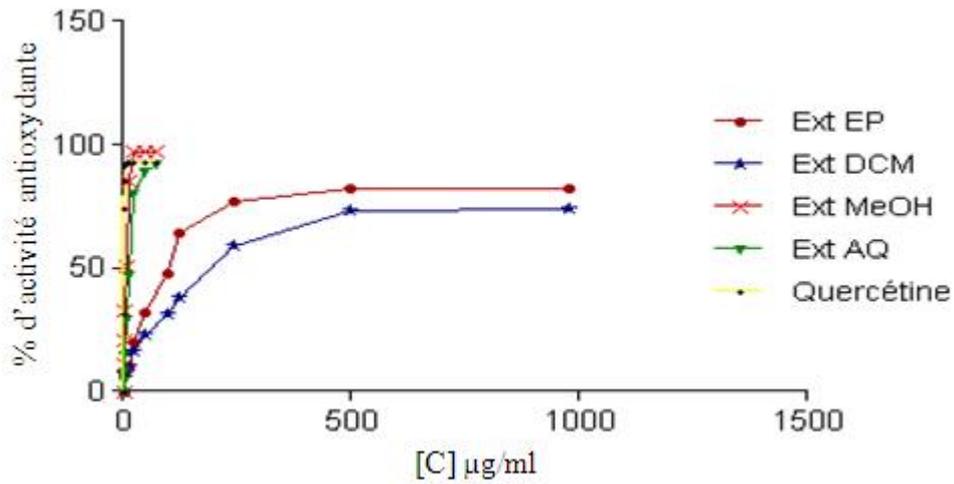


Fig. 41 : Activité antioxydante des différents extraits de *Laurus nobilis*.

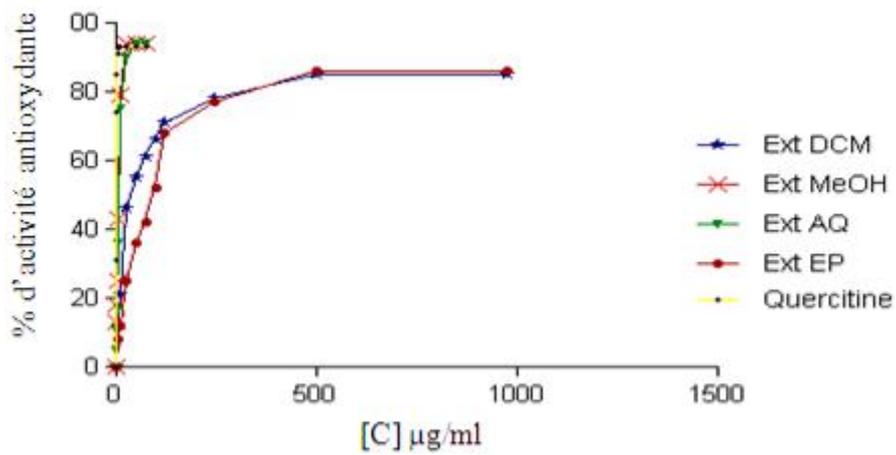


Fig. 42 : Activité antioxydante des différents extraits de *Thymus vulgaris*.

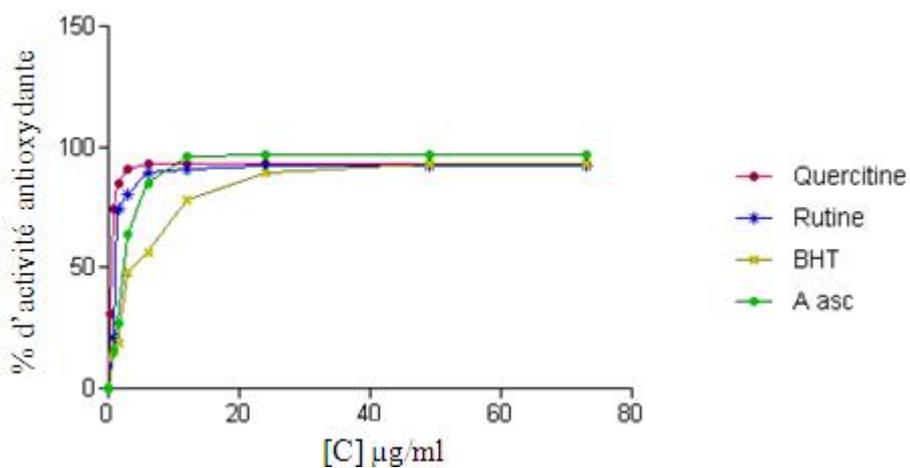


Fig. 43 : Activité antioxydante des différents Standards.



La capacité antioxydante de l'extrait EP estimée par la technique DPPH est très faible, cet extrait qui est un excellent antioxydant dans le test de BCB a faiblement réagit dans cet essai. La réaction chimique dans la technique DPPH implique un transfert d'électrons d'un donneur (antioxydant) vers le radical libre DPPH et la réduction de ce dernier en DPPH-h. Benzie et Strain (1996) ont considéré l'antioxydant comme toute molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprété l'activité antioxydante comme la capacité réductrice. Cependant, le pouvoir antioxydant d'un antioxydant n'est pas nécessairement égal à sa capacité de réduire le DPPH.

Les activités anti-radicalaires et antioxydantes d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* ont été testés par Bouhdid et ses collaborateurs (2006), par la technique de décoloration de la β carotène et le test du DPPH, le pouvoir antioxydant manifesté a été interprété par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'huile. Le thymol composé majeur de l'huile essentielle aussi bien que le carvacrol, sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH et inhibent la peroxydation lipidique (Brunton, 1999).

L'étude menée par Kulšic et ses collaborateurs (2006) a montré qu'aussi l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* en présente une activité antioxydante importante. Dans cette extrait, les polyphénols (surtout les flavonoïdes), l'acide rosmarinique, l'acide caféique et la vitamine E peuvent expliquer l'activité exhibée (Guillén et Manzanos, 1998 ; Thuille *et al.*, 2003 ; Kulišić *et al.*, 2006).

L'activité antioxydante des extraits méthanolique (bruts et dégraissés) des feuilles, d'écorce et des fruits de *Laurus nobilis* ont été étudiés au niveau de la peroxydation de lipide (LP) dans les liposomes. Les résultats ont montré que tous les extraits de recherche présentées une activité antioxydante. L'extrait dégraissé des feuilles montré une inhibition plus élevée du LP que l'extrait brut et que tous les autres extraits et le maximum de son activité (68,4%) a été atteint avec une plus petite quantité (2,0 mg) (Simić *et al.*, 2003).

Ferreira et ses collages (2006) ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits (huile essentielle, extrait éthanolique et décoction) de *Laurus nobilis*, cet espèce montre des valeurs élevées pour l'activité antioxydante en chacun des trois extraits et elle est plus haute pour les extraits polaires. Dans le laurier l'isoquercitrine, les glycosides flavonol et la vitamine E peuvent expliquer l'activité démontrée (Demo *et al.* 1998 ; Kivçak et Mert, 2002 ; Simić *et al.*, 2003).



Conclusion et Perspectives



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes.

Dans le présent travail, on s'est intéressé aux effets antimicrobiens et antioxydants des extraits bruts (EP, DCM, MeOH et Aq) de feuilles de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, plantes largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde.

La détermination des rendements en extraits bruts a montré une rentabilité importante en extraits polaires (MeOH et Aq) chez les deux espèces de plantes allant de 6.24 à 21.94 %, alors qu'elle s'affaiblit en passant aux extraits apolaires (EP, DCM), l'extrait EP de *Thymus vulgaris* a le plus faible rendement avec 1.94 %.

La présence des flavonoïdes dans nos extraits est mise en évidence par un essai de caractérisation en tube qui est confirmé par CCM et HPLC. Cette dernière a permis l'identification de cinq composés phénoliques dans les feuilles de *Thymus vulgaris*, à savoir : l'Ac gallique, l'Ac caféique, la quercétine, la rutine et la catéchine. Deux polyphénols seulement ont été identifiés dans les feuilles de *Laurus nobilis* : l'Ac tannique et la rutine.

Les extraits bruts de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis* ont été testés *in vitro*, par la méthode de diffusion à partir d'un disque solide, pour leur pouvoir inhibiteur contre un ensemble de bactéries pathogènes : trois souches de collection internationale, trois souches cliniques isolés de patient hospitalisés, une bactérie aviaire isolée localement de poulets malades et une seule espèce de levure *C. albicans* ATCC 2071. Les extraits ont révélé des activités antimicrobiennes variables contre les différentes souches microbiennes testées. Les extraits EP et DCM de *thymus vulgaris* ont témoigné une forte activité antimicrobienne même vis-à-vis de souches multirésistantes aux antibiotiques (*P. aeruginosa*). Leur effet inhibiteur sur la levure *C. albicans* été spectaculaire, il est beaucoup plus important que celui de la nystatine (antifongique). Nous avons conclu dans cette étude que les extraits de *Laurus nobilis* possèdent une capacité antimicrobienne mais faible en comparaison avec les extraits de *Thymus vulgaris*.



L'aptitude de nos extraits bruts à inhiber la peroxydation des lipides *in vitro* a été évaluée par la technique de décoloration de la β -carotène, habituellement employée pour estimer l'activité antioxydante des substances dans les émulsions. Les résultats montrent que l'oxydation de l'acide linoléique est efficacement inhibée par les extraits testés. En effet, la capacité anti-radicalaire la plus élevée des extraits est démontrés avec les extraits EP de *Laurus nobilis* et de *Thymus vulgaris* avec 56.48 et 53.60% d'inhibition respectivement. L'activité antioxydante exprimée comme des valeurs d'AAR% diminuée dans l'ordre EP (Ln) > EP (Tv) > MeOH (Tv) > MeOH (Ln) > Aq (Tv) > Aq (Ln).

L'activité antioxydante *in vitro* est aussi étudiée avec la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), cette méthode est indépendante de la polarité de substrat. Les extraits polaires surtout MeOH possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à de faibles doses. Tous les IC₅₀ sont très basses, comprises entre 6 et 13 μ g/ml. Suivant ce paramètre, les capacités de piégeage du radical sont classées dans l'ordre :

MeOH (Ln) > MeOH (Tv) > Aq (Ln) > Aq (Tv) > DCM (Tv) > EP (Tv) > EP (Ln) > DCM (Ln).

Contrairement à ce qui est montré par le test d'activité antimicrobienne les extraits de *Laurus nobilis* possèdent un pouvoir antioxydant plus important en comparaison avec les extraits de *Thymus vulgaris*.

Nos résultats préliminaires montrent que tous les extraits bruts testés témoignent d'activités antimicrobiennes et antioxydantes *in vitro*. D'autres études approfondies sont nécessaires et se résument dans les points suivants :

- 1) Partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps ; Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits testés.
- 2) Isolement et caractérisation des composés actifs dans les différents extraits par des méthodes plus spécifiques
- 3) Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des extraits bruts et de leurs composés actifs en utilisant différentes techniques.



Références

Bibliographiques



Références bibliographiques

- Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F. (2009) Antibacterial effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa* Turk. *J. Biol.* **30** : 239-242.
- Adzet T., Vila R., Cafiigueral S. (1988) Chromatographic analysis of polyphenols of some Iberian *Thymus*. *J. Ethnopharm.* **24** : 147-154.
- Afolayan A. J. et Meyer J. J. (1997) The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* **57**:177-1781.
- Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou I. B. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 4168-4170.
- Amiot J. (2005) *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de montpellier*.
- Andersen Ø. M., Markham K. R. (2006) FLAVONOIDS : Chemistry, Biochemistry and Applications. *Ed. Taylor & Francis*. London. 1197 p.
- Aqili khorasani M.S. (1992) Collection of drugs. *Educational Organization, Tehran*. Pp : 624-630.
- Atanda O.O., Akpan I., Oluwafemi F. (2007) The potential of some spice essential oil in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production, *Food Control* **18**: 601-607.
- Balladin D.A; Headley, O. (1999). Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herlos. *Renewable Energy.* **17**: 523-531.
- Barla A., Topçu G., Öksüz S., Tümen G., Kingston D.G.I., (2007) Identification of cytotoxic sesquiterpènes from *Laurus nobilis* L., *Food chemistry* **104** : 1487-1484.
- Baudoux D., (2000) L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. *Ed Atlantica*.
- Beer A.M., Lukanov J., Sagroche V. (2007) Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* **14**: 65-69.
- Beloued A. (2005) Plantes médicinales d'Algérie. *Office des publications universitaires. Alger*. Pp : 124.
- Benzie I. F. F., Strain J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. biochem.* **239**: 70-76.
- Bergogne-Berezin E., Dellamonica P. (1995) Antibiothérapie en pratique clinique. *Ed Masson*, Paris, 486 p.
- Biallo D., Sanogo R., Yasambou H. et autre (2004) Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae). *C. R. Chimie.* **7** : 1073-1080.
- Billerbeck V.-G., Roques C., Vanière P., Marquier P. (2002) Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes.* **3** (10) : 248-251.
- Billing J., Sherman P. W. (1998) Antimicrobial function of spices. *Q Rev Biol.* **73**: 3-49.
- Birt D. F., Hendrich, S., Weiqun, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention : flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Therap.* **90** : 157-177.



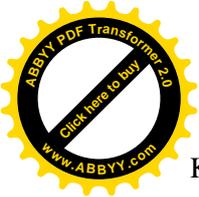
- Bojase, G. et al. (2001), Two new isoflavanoids from *Bolusanthus speciosus*, *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*. **15** : 131.
- Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J. (2006) Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir*. 324-327.
- Bracke M., Vyncke B., Opdenakker G., et al. (1991) Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion *in vitro*. *Clin. Exp. Metastasis*. **9** :13-25.
- Braithwaite A., Smith F. J. (1999) *Chromatographic Methods*. 5^{ème} Ed *Kluwer Academic Publishers*. London. 548 p.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol*. **28** : 25-30.
- Bronner W.E., Beecher G. R. (1995) Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of chromatography A*, **705** : 247-256.
- Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochem. J*. **330** : 1173-1178.
- Bruneton J. (1993) *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*. 2^{ème} Ed *Tec&Doc*. Paris.
- Bruneton J. (1999) *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*. 3^{ème} Ed *Tec&Doc*. Paris.
- Burt S. A. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods-a reiew International. *J. Food Microbiol*. **94**: 223-253.
- Chambers H. F., (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev*. **10** : 781-791.
- Chun S. S., Vattem D.A., Lin Y.T., Shetty K. (2005) Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process. Biochem*. **40**: 809-816.
- Ciulei J. (1982) *Methodology for analysis of vegetable drugs*. Ed. *Ministry of Chemical Industry, Romania*. 67 p.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K. et autre (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*. **61**: 71-76.
- Cotelle, N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*. **1**: 569-590.
- Dacosta, Y. (2003) *Les phytonutriments bioactifs*. Ed *Yves Dacosta*. Paris. 317 p.
- Daels-rakotoarison D. (1999) *Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier*. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 172 (64).
- Demir V., Guhan T., Yagcioglu A.K., Ddegirmencioglu A., (2004) Mathematical modeling and the Determination of some Quality Paramaters of Air-dried Bay leaves. *Biosystems Engineering*. **88** (3) : 325-335.
- Demo A., Petrakis C., Kefalas P., Bosliou D., 1998, Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plans leaves. *Food Research international*. **31** (5) : 351-354.



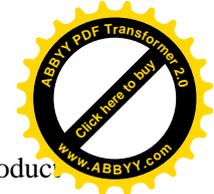
- Erler F., Ulug I., Yalankaya B. (2006) Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*. **77** : 491-494.
- Essawi T. et Srour M. (2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* **70** : 343-349.
- Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D. (2000) Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. **183**:191-195.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. (2006) The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- Fiorini C., David B., Fourastét I., Vercauteren J. (1998) Acylated Kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves, *J. Photochemistry*. **47 (5)** : 821-824.
- Formica J. V., Regelson W. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**: 1061-1080.
- Frankel E. N., Huang S.-W., Kanner J., German J. B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsions. *J. Agricultural and Food Chemistry*. **42**:1054-1059.
- Frankel E. N., Meyer A. S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Science of Food and Agriculture* **80** : 1925-1940.
- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. (2002) Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* **65** : 1545-1560.
- Fuerst F. (1976) Microbiologie Clinique. Ed HRW Québec. 507 p.
- Fuhrman B., Lavy A., Aviram M. (1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61** : 549-554.
- Gee J.M., Johnson I.T. (2001) Polyphenolic compounds : interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. **8** : 1-182.
- Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J. (2008) Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* **79**: 199-203.
- Gómez-Coronado D.J.M., Ibañez E., Rupérez F.J., Barbas C. (2004) Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin, *Journal chromatography*. **1054**: 227-233.
- Grange J. M., Davey R. W. (1990) Antibacterial properties of propolis. *J. R. Soc. Med.* **83** : 159-160.
- Guillén M. D., Manzanos M. J. (1998) Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plant. *Food chemistry*. **63** (3) : 373-383.
- Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R. (2005) Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*. Pp : 554-558.



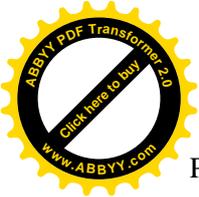
- Gürbüz İ., Üstün O., Yeşilada E., Sezik E., Akyürek N. (2002) In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions, *J. Ethnopharmacolog.* **83**: 241-244.
- Halliwell B. (1994) Free radicals and antioxidants. *Nutr. Rev.* **52** : 253-265.
- Hamilton-Miller J. M. T., Shah S. (2000) Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46** : 852-853.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 845-850.
- Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. (1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry.* **48** : 125-129
- Harborne J. B., Williams C. A. (2000) advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **55** : 481-504.
- Harikrishna D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M. C. (2004) Pharmacological investigation of a flavonoid glycoside. *Indian. J. Pharmacol.* **36** : 244-250.
- Havsteen B. H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therap.* **96**: 67-202.
- Hili P., Evans C. S., Veness R. G. (1997) Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulfoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett Appl Microbiol* **24** : 269-275.
- Hilliard J. J., Krause H. M., Bernstein J. I., et autre (1995) A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **390** : 59-69.
- Hollman P.C.H., Katan M.B. (1998) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol.suppl.* **25** : 237-239.
- Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *J. Pharmaceutical and Biomedicinal Analysis* **29**: 691-700.
- Iserin P. (2001) Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres Pp : 143 et 225-226.
- Jassim S.A., Naji M.A. (2003) Novell antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl. Microbiol.* **95** (3) : 412-27.
- Jordán M.J. , Martínez R.M. , K.L. Goodner , Baldwin E.A. , Stomayor J.A. (2006) Seasonl Variation of *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and products* **24**: 253-263.
- Jovanovic S.V., Steenken S., Simic M.G., Hara Y. (1998) Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal.* **7** : 137-161.
- Justesen U., Knuthsen P. (2001) Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food chemistry* **73** : 245-250.
- Kalmaanson, J.E- , Jäger A.K. , Van Staden, J. (2000). Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharmacology.* **69** : 241-246.
- Kaloustian J., El-Moselhy T. F., Portugal H. (2003) Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* **401** : 7786.
- Kaufmann S. H. E. (1997) Host response to intracellular pathogens. *New York.* 345 p.



- Khalil E.A., Afifi F.U., Al-Hussaini M., 2007, Evaluation of the Wond healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *J. Ethnopharmacology*. **109**: 104-112.
- Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., Satoh M. (2004) Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry*. **65** : 3279-3287.
- Kivçak B., Mert T. (2002) Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*. **73**: 242-243.
- Kohen R., Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol*. **30**: 620-650.
- Kono K., Tataru I., Takeda S., Arakawa K., Hara Y. (1994) Antibacterial activity of epigallocatechin gallate against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kansenshogaku Zasshi*. **68** : 1518–1522.
- Kulšic T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. (2006) Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol*. **44** (4) : 485-492.
- Kuntie V., Pejic N., Ivkovic B., Vugie Z., Ilie K., Micie S., Vukojevic V. (2007) Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **43** : 718-721.
- Lall N., Meyer J.M. (1999) *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J. of Ethnopharmacology*. **66** 347-354.
- Laughton M. J., Evans P.J., Moroney M. A. et autre (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol*. **42** : 1673-1681.
- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. et Lee C. Y. (2003) Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*. **51** : 7292-7295.
- Lee S.-J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K. G. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilium* L.) and thym leaves (*Thymus vulgaris* and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. **91** : 131-137.
- Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O. et autre (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med*. **30** : 1076-1081.
- Linden G., Lorient D. (1994) Biochimie agro-indusrielle. *Ed. Masson, Paris*. 360 p.
- Liyana-Pathirana C. M., Shahidi F. (2006) Antioxydant propreties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *J. Science of Food and Agriculture*. **86**: 477-485.
- Lock O., Cabello I., Doroteo V. H. (2006) analysis of flavonoids in plants. *Current Medicinal Chemistry*. **20** : 6-11.
- Mahmood N., Pizza C., Aquino R. et autre (1993) Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res*. **46** (7) : 1257-1271.



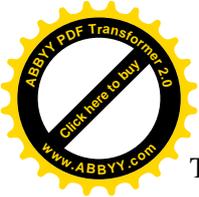
- Majinda R.R.T., Abegaz B.M., Bezabih M. et autres (2001) Resent resultants from naturel product research at the university of Botswana, *Pure. Appl. Chem.* **73** (7) : 1197-1208.
- Mann C. M., Cox S. D., Markham J. L. (2000) The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *Letters in appl. Microbiol.* **30** : 294-297.
- Marjorie M. C. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 564-582
- Martin M. J., Marhuenda E., Perez-Guerrero C., et al. (1994) Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology* **49** (3) : 144-150.
- Matsuda H., Shimoda H., Uemura T., Yoshikawa M., 1999, Preventive effect of sesquiterpenes from Bay leaf on blood ethanol elevation in ethanol-loaded Rat, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **9**: 212-216.
- Mau J-L. Huang P-n. Huang S-J. and C-C. (2004) Antioxydant properties of methanolic extracts from two kinds of *Anrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry.* **86** : 25-31.
- Medjbar M., Bouyoucef A., Benayad T., Zerrouki K. (2008) Caractérisation des salmonelles dans les tueries avicole de la wilaya de Blida. *Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.* Pp : 158-161.
- Middleton E. J. (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 175-182.
- Morales, R. (2002) The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In : *Thyme : the genus Thymus.* Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.
- Morimitsu Y., Yoshida K., Esaki S., Hirota, A. (1995) Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). *Biosci. Biotechn. Biochem.* **59** : 2018-2021.
- Namgoong S. Y., Son K. H., Chang H. W., Kang, S. S., Kim H. P. (1994) Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* **54** (5) : 313-320.
- Nataro J. P., Kaper J. B., (1998) Diarrheagenic *E. coli*. *Clin Microbiol Rev.* **11** : 142-201.
- Novelli G. P. (1997) Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* **48** : 517-527.
- Ong K.C. , Khoo H.E. (2000) Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* **67** : 1695-1705.
- Orallo F., Alvarez E., Basaran H., Lugnier C. (2004) Comparative study of the vasorelaxant activity superoxide-scarvenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **370** : 452-463.
- Özcan, M. (2004). Mineral contents of some plants used as condiments in Turkey. *Food Chemistry.* **84**: 437-440.
- Özcan M., J-C. Chalchat (2004) Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* **30** (4) : 68-73.
- Paganga G., Miller N., Rice-Evans C. A. (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. *Free Radic Res.* **30** : 62-153.



- Papachristos D.P., Stamopoulos D.C. (2002) Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae), *J. Stored products Research*. **38** : 117-128.
- Pariente L. (2001) Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2^{ème} Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.
- Paris R. et Moysse M. (1965). Précis de matière médicale. Edit. Masson. Paris. 412 p.
- Pelzer L. E., Guardia T., Juarez A. O., et al. (1998) Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmacologia*. **53** (6): 421-424.
- Pieri F., Kirkiacharian S. (1992) Pharmacologie et Thérapeutique, 2^{ème} édition Marketing. Paris. 443 p.
- Philippon A. (1995) Quelques bacilles à Gram négatif aérobies stricts non fermentaires et sensibilité aux antibiotiques. *Lett. Infectiol.* **10** : 619-630.
- Poletti A. (1988) Fleurs et plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Delachaux & Niestlé S. A. Suisse. Pp : 103 et 131.
- Quezel P. et Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Ed C.N.R.S. Tome I. 565 p.
- Read M. A., (1995) Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents *Vascular. Am.. J. Pathol.* **147** (2) : 235-237.
- Reddy M.V. B., Angers P., Gosselin A., Arul J. (1998) Antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Phytochemistry*. **47** (8) : 1515-1520.
- Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F. (1996) Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* **32** : 17-27.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20** : 933-956.
- Rios J. L. et Recio M. C. (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **100** : 80-84.
- Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., Mata R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacology*. **35** : 275-283.
- Rozman V., Kalinovic I., Korunic K. (2007) Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects, *Journal of Stored products Research* **43**: 349-355.
- Sağdıç O. (2003) Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **36**: 467-473.
- Sakagami Y., Mimura M., Kajimura K., et al. Anti-MRSA (1998) activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 98-100.
- Sakar M.K., Engelshower R., Tamer A.U. (1992) Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers. *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. **12** : 59-63.
- Sánchez de Medina F., Vera B., Gálvez J., et al. (2002) Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* **70** (26): 3097-3108.



- Sato M., Tsuchiya H., Takase I., Kureshiro H., Tanigaki S., Inuma M. (1995) Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. *Phytother Res.* **9** : 509-512.
- Sayyah M., Valizadeh J., Kamalinejad M. (2002) Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole. *Phytomedicine.* **9** : 212-216.
- Schwarz K., Huang S.W., German B.J. et al (2000) Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J. Agric. Food Chem.* **48** : 4874-4882.
- Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., et al. (2005) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* **96** : 151-158.
- Simić M., Kundaković T., Kovačević N. (2003) Preliminary assay on the antioxidant activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia.* **74**: 613-616.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology.* **299** : 152-178.
- Sohal R. S., Mockett R. J., Orr W. C. (2002) Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med.* **33** (5) : 575.
- Stoclet J. C., Chataigneau T., Ndiaye M., et al. (2004) Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur. J. Pharmacol.* **500** : 299-313.
- Tabak, M. , Armon, R. , Potasman, I. , Neeman, I. (1996). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *J. Appl. Bacteriol.* **8**: 667-672.
- Taguri T., Tanaka T., Kouno I. (2004) Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol. Pharm. Bull.* **27** (12) : 1965-1969.
- Taherian A. A. ; Vafaei A. A. ; Rashidy- Pour A. (1999). Comparison the effects of aqueous extract of *Thymus vulgaris* dexamethasone and stress on acute and chronic pains in mice. *Basic neurosci.*
- Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M (2004) Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Lett. Appl. Microbiol.* **39** (1) : 60-4
- Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shell fish. *Brusci. Brotech-Brochem.* **58** : 1780-1783.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry.* **90** : 333-340.
- Tereschuk M. L., Riera M.V., Castro G.R., Abdala L. R. (1997) Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J. Ethnopharmacol.* **56** : 227-232.
- Thuille N., Fille M., Nagl M. (2003) Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health.* **206** : 217-221.



- Tsuchiya H. et Inuma M. (2000) Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone C isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* **7**:161–5.
- Ultee A., Slump R. A., Steging G. Smid E. J. (2000) Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. of Food Protection*. 620-624.
- Valero M., Salmerón M.C. (2003) Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus creus* in tyndallized cravot broth. *Inter. J. Food Microbiology* **85**: 73-81.
- Valsaraj R., Pushpangadan P., Smitt U. W., et al. (1997) New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* **60** : 739-742.
- Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., et al. (1996) Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **20**: 331-342.
- Vansant G. (2004) Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Ed Institut Danone*.
- Verma D. K., Singh S. K., Tripathi V. (1997) A rare antibacterial flavone glucoside from *Lantana camara*. *Indian Drugs*. **34** : 32–35.
- Wachter G. A., Hoffmann J. J., Furbacher T., Blake M. E., Timmermann B. N. (1999) Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* **52** : 1469-1471.
- Walle T. (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **36** : 829-837.
- Woodman O. L., Meeker W. F., Boujaoude M. (2005) Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *J. Cardiovasc.Pharmacol.* **46** : 302-309.
- Yadava R.N., Tiwari L. (2005) A potential antiviral flavone glycoside from the seeds of *Butea monosperma*. *O. Kuntze. J. Asian. Nat. Prod. Res.* **7** (2): 185-188.
- Yamamura S., Ozawa K., Ohtani K., et al. (1998) Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry*. **48** (1) : 131-136
- Yeon, S.C., Hyon, G.J., Kun, H. S., et al. (2001) Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **62** : 1185-1191.
- Yi Z.-B., Yu Y., Liang Y.-Z., Zeng B. (2007) In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *LWT-Food Science and Technology*. **4** : 1000-1016.
- Yoshikawa M., Shimoda H., Uemura T. et autre (2000) Alcohol absorption inhibitors from Bay leaf (*Laurus nobilis*): Structure-Requirements of Sesquiterpenes for the activity. *Bioorganic & Medicinal chemistry* **8**: 2071-2077.
- Youdim K. A., McDonald J., Kalt W., et al. (2002) Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J. Nutr Biochem.* **13** (5): 282-8
- Zheng W. F., Tan R. X., Yang L., Liu Z. L. (1996) Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta. Med.* **62** :160-162.



Annexes

Annexes

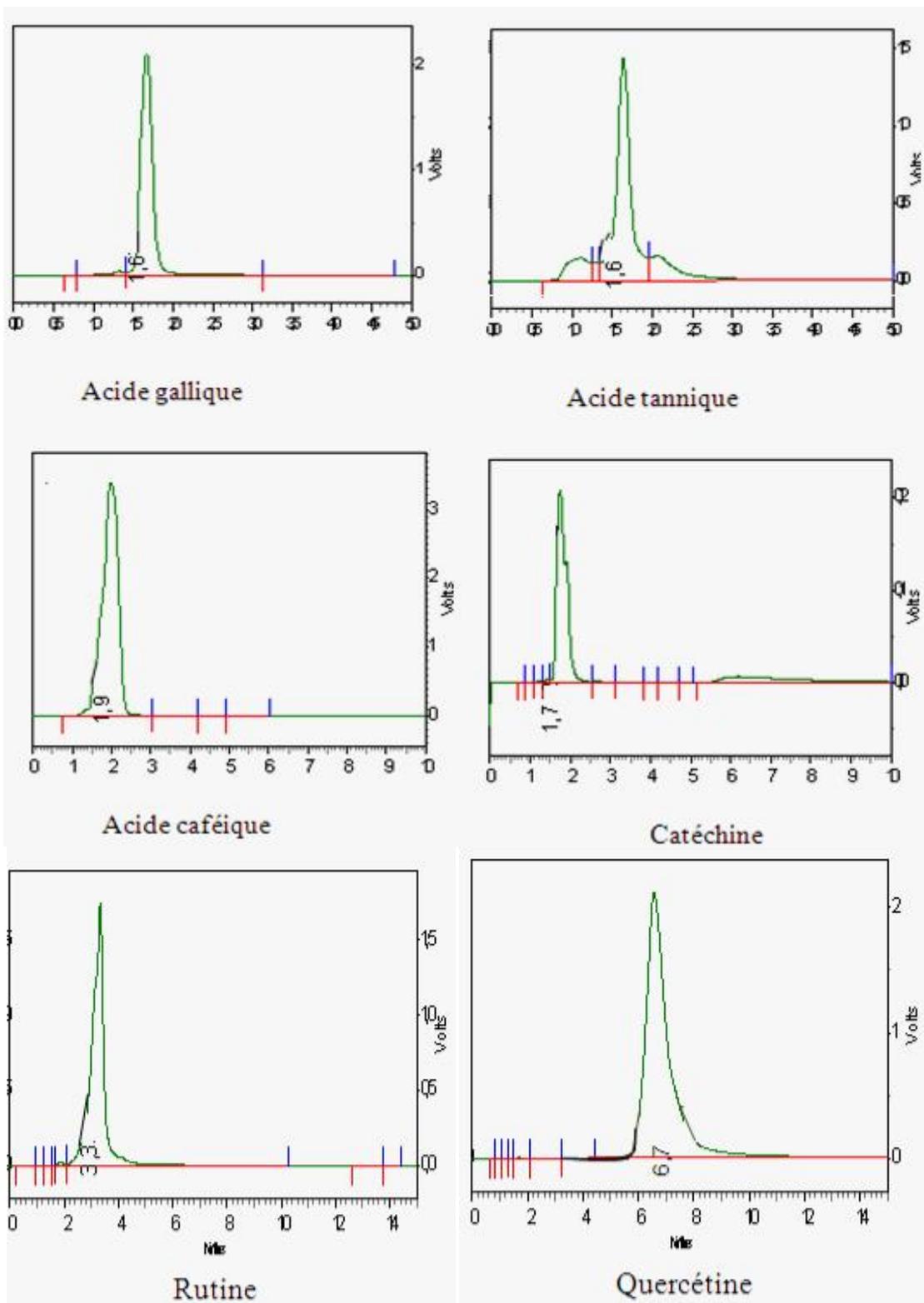


Fig. 44 : Chromatogrammes des différents standards utilisés dans l'HPLC.



Fig. 45 : Influence du solvant DMSO sur la croissance des microorganismes.



Fig. 46 : Pied à coulisse automatique utilisé dans les mesures des diamètres des zones d'inhibitions.

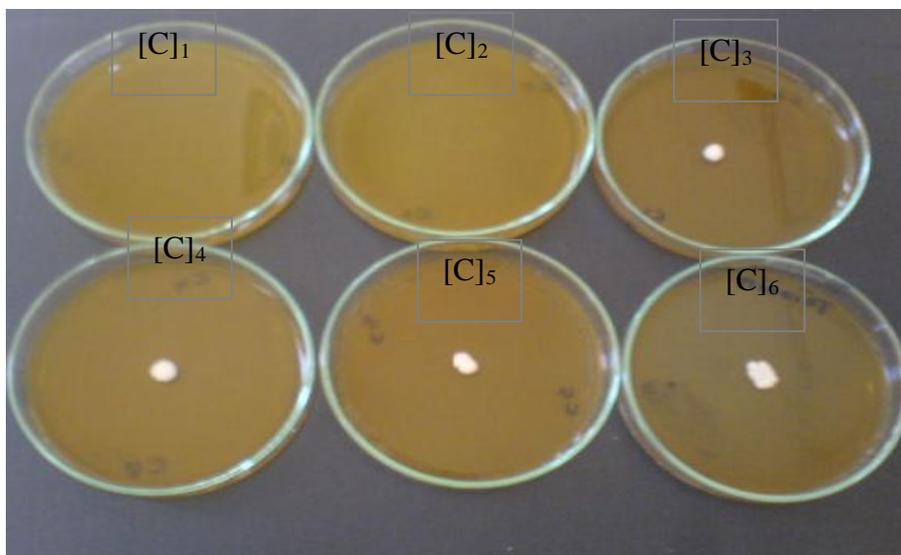


Fig. 47 : Photo montrant la CMI de l'EEP de *Thymus vulgaris* sur la souche *S. aureus*.

$[C]_1 = 0.0312 \%$; $[C]_2 = 0.0156 \%$; $[C]_3 = 0.0078 \%$; $[C]_4 = 0.0039 \%$; $[C]_5 = 0.0019 \%$;
 $[C]_6 = 0.0010 \%$.

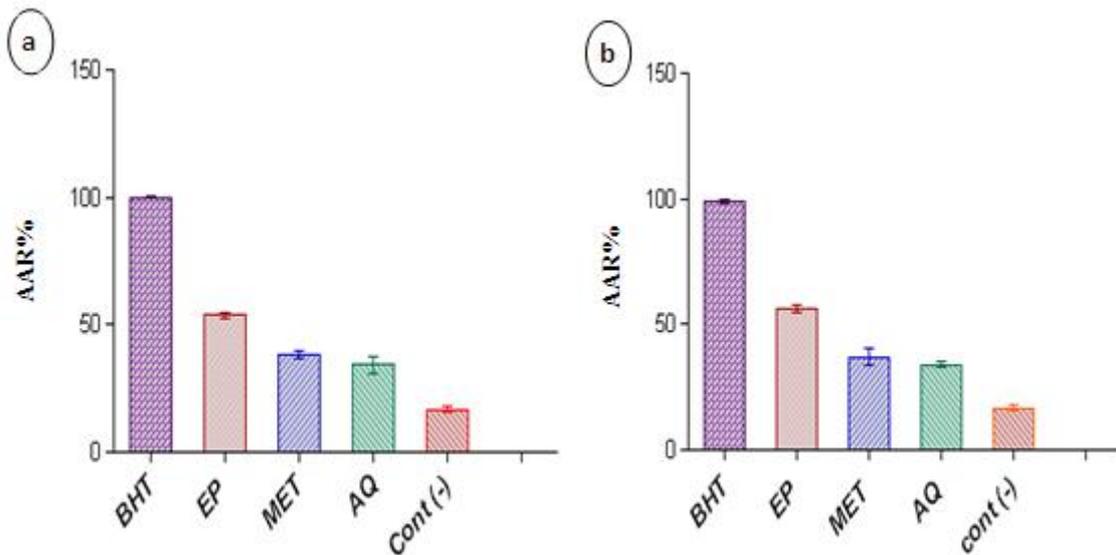


Fig. 48 : Activité d'inhibition de la décoloration de la β -carotène des extraits de *Thymus vulgaris* (a) et de *Laurus nobilis* (b).

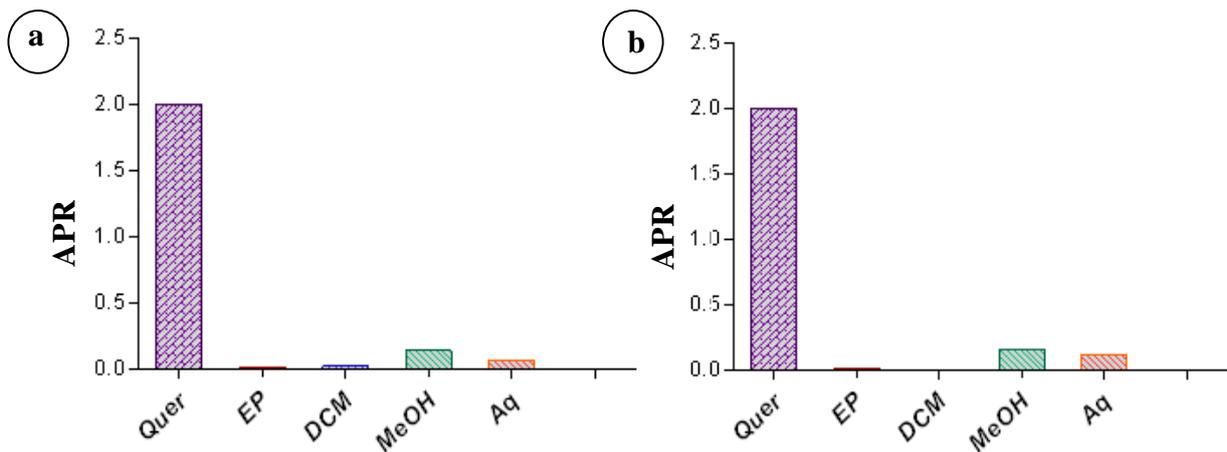


Fig. 49 : Activité anti-radicalaire (APR) des extraits bruts de *Thymus vulgaris* (a) et *Laurus nobilis* (b).

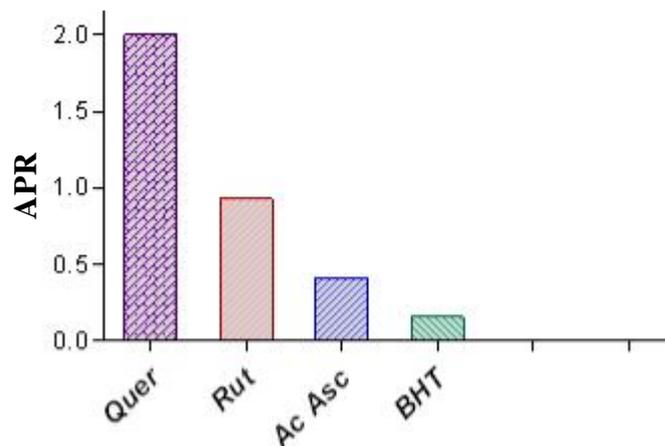


Fig. 50 : Activité anti-radicalaire (APR) des différents témoins.



RESUME

Notre travail a porté sur l'étude des extraits bruts de feuilles de deux plantes aromatiques *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) et *Laurus nobilis* (Lauraceae). L'analyse de ces extraits a révélée la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols totaux) susceptibles d'exprimer les activités recherchées et leurs teneurs ont été déterminées par des méthodes spectrophotométriques.

Les extraits ont été également soumis à un criblage pour leur activité antimicrobienne possible *in vitro*, contre sept souches de bactéries pathogène et une seule espèce de levure, en employant la méthode de diffusion à partir d'un disque solide. Tous les extraits ont réagi positivement au moins sur une des souches microbiennes testées. Les extraits d'une même plante ont montré des activités différentes et les CMI ont été déterminée à partir des extraits les plus actifs en milieu gélosé, l'extrait EP de *Thymus vulgaris* a témoigné d'une forte activité antimicrobienne même vis à vis de souches multirésistantes aux antibiotiques. Globalement l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* est plus importante que celle de *Laurus nobilis* avec un spectre antimicrobien plus large et à des doses plus faibles.

L'activité antioxydante *in vitro* a été étudiée avec deux méthodes différentes : technique de réduction du radical libre DPPH et le test de blanchissement de la β -carotène. Les résultats obtenus ont montré que les extraits peuvent agir en tant que piègeurs de radicaux et montré une activité inhibitrice de peroxydation des lipides. Deux extraits semblent être de bons piègeurs de radicaux, les extraits MeOH de *Laurus nobilis* et de *Thymus vulgaris*. Alors que, les extraits EP des deux plantes exprimant le pouvoir inhibiteur de peroxydation des lipides le plus important.

Mots clés: *Thymus vulgaris* ; *Laurus nobilis* ; Extraits bruts ; Activité antimicrobienne ; Pouvoir réducteur ; Activité Antioxydante.

SUMMARY

Our work focused on the study of the rough extracts of leaves of two aromatic plants *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) and *Laurus nobilis* (Lauraceae). The analysis of these extracts revealed the presence of some chemical groups (total polyphenols) likely to express the activities required and their contents were given by spectrophotometric methods.

The extracts were also subjected to a sifting for their possible antimicrobial activity *in vitro* against seven species of bacteria pathogenic and only a yeast species by employing the method of diffusion starting from a disc solid. All the extracts reacted positively at least on one of the microbial stocks tested. The extracts of same plants showed activities different. The CMI were determined starting from the most active extracts in gélose medium. Extract EP of *Thymus vulgaris* testified to a strong activity antimicrobial even with respect to stocks multiresistant with antibiotics. Broadly the antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* is more significant than that of *Laurus nobilis* with an antimicrobial spectrum broader and with weaker amounts.

The *in vitro* antioxidant activity was investigated with two different methods : DPPH radical scavenging assay and β -carotene bleaching test. The obtained results showed that the extracts can act as radical scavengers and displayed a lipid peroxidation inhibitory activity. Two extracts seem to be good trappers of radicals, the extracts MeOH of *Thymus vulgaris* and *Laurus nobilis*. Whereas, extract them EP from the two plants expressing the most significant capacity inhibiting of peroxidation of the lipids.

Key words : *Thymus vulgaris* ; *Laurus nobilis* ; rough extracts ; Antimicrobial activity ; Reducing power ; Antioxidants activity.

ملخص :

ارتكز هذا العمل على تحليل مستخلصات أوراق نبتتين عطريتين : *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) و *Laurus nobilis* (Lauraceae)؛ كشفت النتائج عن وجود بعض المركبات الكيميائية (الفينولات المتعددة).

المستخلصات خضعت أيضا للدراسة خارج العضوية للكشف عن نشاطها المضاد للميكروبات المحتملة ضد سبعة أنواع من البكتيريا المرضية ونوع واحد من الخميرة، وذلك باستعمال طريقة الانتشار من خلال قرص صلب. كل المستخلصات تفاعلت ايجابيا على الأقل مع نوع واحد من الميكروبات المختبرة، المستخلصات لنفس النبتة تظهر نشاطات مختلفة و التراكيز الأدنى للتثبيط (CMI) حددت من خلال المستخلصات الأكثر نشاطا في الوسط الجيلوزي، مستخلص اثر البترول لـ *Thymus vulgaris* اظهر نشاطا قويا مضادا للميكروبات حتى ازاء الأنواع المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية. عموما فان النشاط المتعلق بـ *Thymus vulgaris* هو الأكثر أهمية من النشاط المتعلق بـ *Laurus nobilis* مع طيف مضاد للميكروبات أوسع وبتراكيز اقل.

النشاط المضاد للأكسدة درس خارج العضوية بطريقتين مختلفتين: تقنية إرجاع الجذر الحر DPPH واختبار ابيضاض الـ β -carotène. النتائج المتحصل عليها أظهرت أن المستخلصات لها قدرة اقتناص الجذور الحرة و تظهر نشاطا مثبط لأكسدة الليبيدات. مستخلصان يظهران كمصائد جيدة للجذور، مستخلصا الميثانول لـ *Thymus vulgaris* و *Laurus nobilis*. في حين أن مستخلصا اثر البترول للنبتتين يظهران القدرة المثبطة لأكسدة الليبيدات الأكثر أهمية.

الكلمات المفتاحية : *Laurus nobilis* , *Thymus vulgaris* , المستخلصات الخام , النشاط المضاد للميكروبات , القدرة الارجاعية , النشاط المضاد للأكسدة.