



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR -KHENCHELA-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de biologie moléculaire et cellulaire

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention de diplôme de mestre biochimie appliquée

FILIERE : science biologique

OPTION : biochimie appliquée

Thème

Etude du contenu polyphénolique de la plante *thymus vulgaris L.* et évaluation de leur activité antioxydante

Présenté par : Chibani kanza et Saidi Sabrina

Soutenu le : / / 2021

Devant le jury :

Président : MAAMAR Hichem

M.C.B. université de Khenchela

Examinatrice : ARAB Yasmine

M.A.A. université de Khenchela

Encadreur : MAYOUF Nozha

M.C.B. Université De Khenchela

Année Universitaire 2020/2021

Dédicasse

Je commence par rendre grâce à dieu et sa bonté, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade.

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions je dédie ce travail :

Aux personnes les plus chères au monde :

Mon père Mouhamed El-arbi et Ma mère Saliha, qui sont La lumière de mes yeux, Pour votre amour, votre affection Votre soutien constant, Et sans qui je ne serais pas arrivée jusqu'ici.

Recevez ici ma profonde gratitude pour vos innombrables sacrifices..

À ma moitié ma sœur Dina A ma petite ange Anfel

A mon seul frère mon héros Yassin

A mon exemple dans la vie ma tante SABAH

Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour toi, Ni la gratitude et ma reconnaissance envers les inoubliables et Immenses sacrifices que tu as déployés pour mes études. Tu n'as pas cessé de me soutenir et m'encourager Durant toutes les années de mes études, tu as toujours Eté présentes à mes côtés pour me consoler quand il fallait, Jamais je ne l'oublierais.

À mon fiancé

Qui m'a beaucoup encouragée tout au long de ce travail. Merci d'avoir montré beaucoup de patience avec moi durant les moments les plus stressants

A mes chères amies :

Yassmina, Meriem pour la grande affection Et l'amour et pour tous les moments qu'on a partagé. Je vous souhaite une florissante santé, un prospère avenir Et une vie couronnée de succès

À Mon encadreur Mayouf Nozha

Pour son dévouement exemplaire et ses conseils constructifs, pour leur modestie, leur Générosité et leur encouragement

À mes amis (e) de la Promo

Manel et Amira merci à tous je viens d passer des beaux souvenirs avec vous À toute la famille Saidi.

SABRINA



Dédicasse

Tout d'abord, je remercie le bon Dieu pour sa volonté et sa patience.

Au cours de ces longues années d'études, j'ai même réussi à en arriver là.

Je dédie cet humble travail :

A mon fils bien-aimé et cher, qui n'est pas né : Muhammad Sajid.

Aux personnes les plus chères au monde : mon père Boudjemaa et ma mère Khamisa La lumière de mes yeux, pour ton amour, ton affection, ton soutien constant, et sans personne Je n'irais pas si loin. Recevez ici ma plus profonde gratitude pour vos sacrifices sans fin.

A ma sœur bien-aimée et à ma vie : chahrazed

A mes chers frères : Eid, Hawass, Nabil, Karim, Riad, et surtout Fouzi

A mes amies Salma, Abir, Houda et Amina. Pour votre amitié sincère et les bons moments que vous avez passés ensemble tout au long de mes études et en à l'étranger.

À Mayouf nozha. Pour sa sincérité exemplaire et ses conseils constructifs, pour sa décence, sa générosité et son engagement.

A ma compagne Sabrina.

J'ai partagé avec elle les joies et les difficultés de continuer notre travail. A toute ma famille et mes amis Enfin, à tous ceux qui savent donner sans prendre, aider sans contrepartie et sans égoïsme.

KANZA



الملخص

الزعتر البري هو نبات يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في الجزائر، ويعرف باسم: الزعتر البري، ويبدو أنه فعال في علاج الأمراض المختلفة، في سياق اكتشاف مضادات أكسدة جديدة من مصادر طبيعية اهتمنا في هذا العمل في بتقييم محتوى المركبات الفينولية والخصائص المضادة للأكسدة للمستخلص المائي لنبات الزعتر البري. أظهرت تحديد كميات الفلافونويد والبوليفينول أن نبات الزعتر البري غني جدا بالبوليفينول $118,7 \pm 0,16$ (مغ/ غ) والفلافونويد $42,01 \pm 0,004$ (مغ/ غ) على التوالي. حيث يظهر اختبار التقييم الكمي لقوة محاصرة DPPH أن EA يكون أكثر نشاطا مع تركيز التثبيط الذي يعادل 50 (مع / غ) من التركيز (IC_{50}). تظهر نتائجنا أن الجزء العلوي من الزعتر البري يحتوي على مركبات نشطة بيولوجيا تتمتع بنشاط قوي مضاد للأكسدة. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أنه يمكن استخدام هذه النباتات لعلاج الأمراض الالتهابية التي تتطلب إزالة الجذور الحرة،

الكلمات المفتاحية: الزعتر البري، البوليفينول، الفلافونويد، نشاط مضاد للأكسدة.

Résumé

Thymus vulgaris L est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle en Algérie, connue sous le nom : zaatar, elle semble efficace dans le traitement de diverses maladies. Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous avons intéressé dans ce travail à l'évaluation des teneurs en composés phénoliques et les propriétés antioxydants de l'extrait aqueux de la plante *Thymus vulgaris L*. Détermination des quantités des polyphénols et flavonoïdes a montré que les EA de la plante *Thymus Vulgaris L* est très riche en polyphénols ($118,75 \pm 0,1$ 6mgEAG/g) et flavonoïdes respectivement ($42,01 \pm 0,004$ mgER/g). L'évaluation quantitative du pouvoir piègeur du DPPH montre que EA est plus actifs avec un IC₅₀ mg/mL. Nos résultats montrent que la partie aérienne de *Thymus vulgaris L* contient des composés bioactifs doués une forte activité antioxydante. Les résultats obtenus suggèrent que ces plantes peuvent être utilisées pour traiter les maladies inflammatoires qui nécessitent le piégeage des radicaux libres.

Mots clés : *Thymus vulgaris L*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydants.

Abstract

Thymus vulgaris L is a plant widely used in traditional medicine in Algeria, known under the name: zaatar, it seems effective in the treatment of various diseases. In the context of the discovery of new antioxidants from natural sources, we were interested in this work in the evaluation of the content of phenolic compounds and the antioxidant properties of the aqueous extract of the plant *Thymus vulgaris L*. Determination of the mounts of polyphenols and flavonoids showed that the EA of the *Thymus Vulgaris L* plant is very rich in polyphenols (118.75 ± 0.16 mgEAG / g) and flavonoids respectively (42.01 ± 0.004 mgER / g). Quantitative evaluation of the scavenging power of DPPH shows that EA is more active with an IC₅₀ = 0.004 mg / mL. Our results show that the aerial part of *Thymus vulgaris L* contains bioactive compounds endowed with strong antioxidant activity. The results obtained suggest that these plants can be used to treat inflammatory diseases, which require the scavenging of free radicals.

Key words: *Thymus vulgaris L*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity.

Table de matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Antioxydants	2
1.1. Stress oxydatif.....	2
1.2. Espèces réactives de l’oxygène	2
1.3. Types des radicaux libres.....	3
1.4. Rôles des ROS.....	5
1.5. Cible des ROS et conséquences	6
1.6. Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques	7
1.6.1. Antioxydants enzymatiques	7
1.6. 2. Antioxydants non enzymatiques	9
1.6.2.1. Vitamines.....	10
1.6.2.2. Polyphénols	10
1.6.2.3. Acides phénoliques	10
1.6.2.4. Tannins	10
1.6.2.5. Flavonoïdes	11
2. <i>Thymus vulgaris</i> L.	12
2.1. Description et classification botanique.....	12
2.2. Utilisations traditionnelles de <i>Thymus vulgaris</i>	13
2.3. Composition chimique	14
3. Activités biologiques	15
3.1. Activité antioxydants	15
3.2. Activité anti- inflammatoire	15

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels	17
1.1. Réactifs.....	17
1.2. Matériel végétal	17
2. Méthodes	17
2.1. Dosage des polyphénols	17
2.2. dosage des Flavonoïdes	18
2.3. Evaluation des activités antioxydante	19
2.3.1 Test de l'effet scavenger du radical DPPH	20
2.3.2. Test du piégeage du radical hydroxyle	21

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rendements des extraction	22
2. dosages des polyphénols et flavonoïdes	22
3. Evaluation de l'activité antioxydants in vitro.....	24
4.1. l'effet scavenger du radical DPPH.....	24
4.2. piégeage du radical hydroxyle	26

CONCLUSION

Références Bibliographiques	26
--	----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	3
Tableau 2. Les espèces réactives de l'azote (ERA).....	4
Tableau 3. Classification botanique de <i>Thymus vulgaris L</i>	16
Tableau 4. Teneurs en polyphénols totaux (mgEAG/g), flavonoïdes (mg ER/g) de l'extrait aqueux de la plante <i>T. Vulgaris L</i>	25

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants.....	2
Figure 2. Les origines des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	5
Figure 3. L'activité de balayage radical de <i>SOD</i> , <i>CAT</i> et <i>GPx</i>	9
Figure 4. Structure générale du noyau des flavonoïdes	11
Figure 5. photographie du <i>thymus</i> (<i>site web numéro 1</i>)	12
Figure 6. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).....	21
Figure 7. Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais).....	21
Figure 8. Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux de <i>thymus vulgaris</i> et quercétine vis-à-vis du radical DPPH. *** $p < 0.001$	27
Figure 9. Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux de <i>thymus vulgaris</i> et vitamine C vis-à-vis du radical hydroxyle. ** $p < 0.01$	28

Liste des abréviations

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

CAT : catalase

Cu²⁺ : ion de cuivre

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

ERA/RNS : espèce réactive de l'azote

ERO/ROS : Espèces réactives de l'oxygène

FeSO₄ : sulfate de fer

GPX : glutathion peroxydase

IC₅₀ : Concentration d'inhibition correspondant à 50 % de la concentration.

LDL: low-density lipoprotein

MoO₄⁻²: phosphomolybdique

PI3K: PI3-kinase

SD : Standard Déviation

SOD : super oxyde dismutase

WO₄⁻² : phosphotungstique

Introduction

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

Les plantes médicinales contiennent des composants qui réduisent la formation des radicaux libres et éliminent le stress oxydatif qui conduit à plusieurs maladies. Dans les systèmes vivants, une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces réactifs est possible. Les défenses antioxydantes, dont une partie est dépendante de l'alimentation, peuvent être insuffisantes pour empêcher les dégâts cellulaires que peuvent causer les radicaux libres de l'oxygène.

Ce travail s'inscrit donc dans cette problématique générale qui consiste à quantifier les teneurs en poly phénols et flavonoïdes de la plante *Thymus vulgaris L.* Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'effet des flavonoïdes sur le stress oxydatif

Nous avons fixé comme objectifs les points suivants :

- ✓ Analyse photochimiques de l'extrait aqueux de *thymus vulgaris L.*
- ✓ Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *thymus vulgaris L.*

Le présent manuscrit est organisé en trois parties :

- La première partie est consacrée à la recherche bibliographique, sur les antioxydants.
- La deuxième partie décrit le mode opératoire et les différentes techniques utilisées.
- La troisième partie présente les résultats obtenus, avec la discussion.

Enfin, la dernière partie comporte une conclusion et la présentation de quelques perspectives qui peuvent être développées ultérieurement.

1. Antioxydants

1.1. Stress Oxydatif

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti- oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Cette situation peut être due à une diminution des défenses antioxydants ou à une augmentation de production des radicaux libres (Orban, 2010).

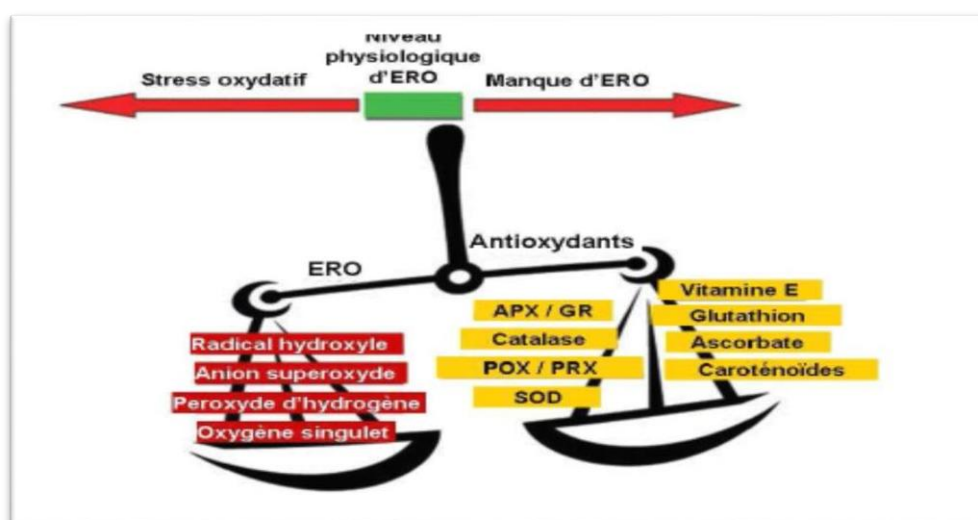


Figure 01 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants (Pourrut, 2008).

1.2. Espèces réactives de l'oxygène

Les ERO produites par les cellules ont très longtemps été vues comme des produits toxiques du métabolisme, pouvant dégrader les macromolécules lipidiques, protéiques ou l'acide nucléique désoxiribosique (DNA) de la cellule. Pour se protéger de ces effets délétères, les cellules possèdent d'ailleurs plusieurs enzymes antioxydants (Beaudeau *et al.*, 2006).

1.3.Types des radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, (atome ou molécule) contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans ses orbitales. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables, très réactives sont produites d'une manière continue, dans de nombreux phénomènes biologiques (**Tremellen, 2008**).

Tableau 1 : Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (*Rao et al., 2011*).

Espèces oxygénées réactives radicalaires	Espèces oxygénées réactives non-radicalaires
O_2^- : Anion radical superoxyde	O_2 : Oxygène singulet
HO_2^\cdot : Radical perhydroxyle	H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
HO^\cdot : Radical hydroxyle	$HOCl$: Acide hypochlorique-
RO_2^\cdot : Radical peroxyde	
RO^\cdot : Radical secondaire alkoxyde	

Tableau 2 : Les espèces réactives de l'azote (ERA) (**Rao et al., 2011**).

Espèces azotées réactives radicalaires	Espèces azotées réactives non-radicalaires
NO [•] : Monoxyde d'azote	NO ₂ : Dioxyde d'azote
	N ₂ O ₃ : Trioxyde d'azote
	NO ₃ ⁻ : Ion nitrate
	ONOO ⁻ : Peroxynitrite

A - Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés de l'oxygène où certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité et très réactionnels (**Tableau 02**). Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance dans le métabolisme aérobie (**Valko et al., 2007**).

B - Espèces réactives de l'azote (RNS)

Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène, les métabolites dérivés de l'azote sont nommés espèces réactives de l'azote (**Tableau 02**) ; il s'agit du monoxyde d'azote NO[•] et du peroxynitrite ONOO⁻ (**Rao, 2004**).

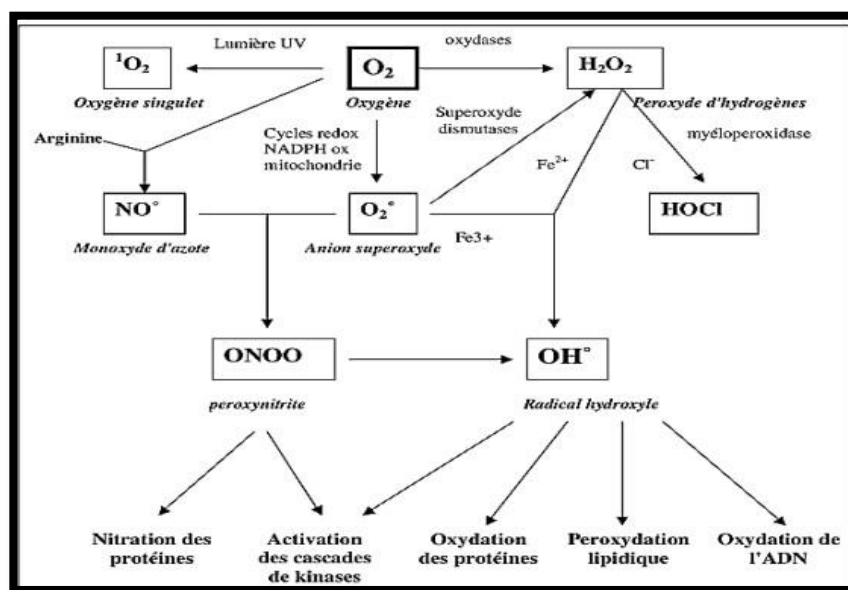


Figure 02 : Les origines des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

1.4. Rôles des ROS

La connaissance des mécanismes moléculaires empruntés par les ERO dans la signalisation cellulaire a subi une expansion considérable au cours de ces dernières années, et a contribué à mieux appréhender leurs multiples fonctions. Les fortes concentrations en ERO sont impliquées de façon prépondérante dans les dommages oxydatifs infligés aux biomolécules, pouvant mener la cellule vers l'apoptose ou la nécrose. Toutefois, pour des concentrations faibles ou modérées, les ERO possèdent un rôle important au sein de la signalisation cellulaire (Trachootham *et al.*, 2009).

Cette dualité est étroitement liée aux variations de la concentration des ERO au sein de la cellule et à l'état des mécanismes de compensation visant à les éliminer. Ainsi les ERO sont capables d'entraîner soit une réponse cellulaire négative (arrêt de croissance ou mort cellulaire),

soit une réponse cellulaire positive (prolifération cellulaire).

1.4.2. ERO et mort cellulaire

Les effets délétères des ERO apparaissent quand leur concentration cellulaire est élevée. Les antioxydants sont alors submergés et ne peuvent pas compenser le stress oxydatif. Les mécanismes radicalaires des ERO sont largement impliqués dans ce processus dégénératif. Dans de telles situations, la protéine p53 sensible aux dommages causés à l'ADN, est capable de déclencher la mort cellulaire programmée pour éviter la transformation oncogénique. Le gène codant pour la protéine p53 est par ailleurs qualifié de gène suppresseur de tumeurs et dénommé

« gardien du génome » en raison de sa capacité à déclencher l'apoptose dans les situations critiques (Wolyniec *et al.*, 2009).

1.4.3. ERO et prolifération cellulaire

Les recherches concernant l'implication des ERO dans les pathologies humaines ont permis de dégager la perspective majeure suivante : un stress oxydatif modéré, pour lequel les concentrations en ERO augmentent légèrement sans dépasser les limites toxiques, potentialise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (Cairns *et al.*, 2012).

Ces activités s'exercent entre autre par la régulation de la phosphorylation des protéines et par l'activation de certains facteurs de transcription. Par exemple, en cas de stress oxydant modéré, les phosphatases subissent une oxydation de leurs résidus cystéine conduisant à une inactivation par modification conformationnelle.

1.5. Cible des ROS et conséquences

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions des molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, et des glucides), mais aussi lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides

(Harris, 2002).

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés. Ainsi, ces altérations augmentent le risque de plus de 30 processus de différentes maladies, Incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Mohammedi, 2013).

1.6. Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques

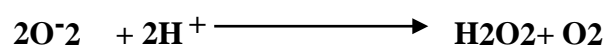
Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres, dans l'organisme et permettent de maintenir, au niveau de la cellule, des concentrations non cytotoxiques de ces espèces oxygénées réactives. Notre organisme réagit donc de façon constante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

Les défenses antioxydants reposent sur des systèmes enzymatiques : superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase et non enzymatiques comme les vitamines C et E, les polyphénols, ...etc. (Leverve, 2009).

1.6.1. Antioxydants enzymatiques

A- Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases ou SOD sont des enzymes ubiquitaires catalysant la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire (Kim *et al.*, 2007). selon la réaction suivante :



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapides la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant mais peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathions peroxydases.

B .Catalase

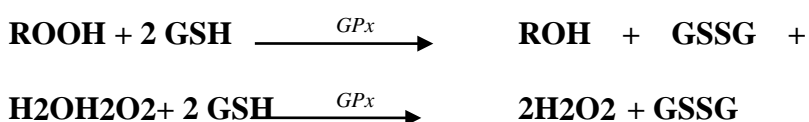
La catalase ou CAT est une protéine hémique qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (**Serrano et Klann, 2004**) selon la réaction suivante :



La catalase se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules. Cette compartimentation l'empêche d'être un accepteur pour l' H₂O₂ formé dans le cytosol et les mitochondries (**Januel, 2003**).

C .Système de glutathion

Les glutathion peroxydases présentes dans la plupart des tissus de mammifères, catalysent la réduction par le glutathion du peroxyde d'hydrogène et de divers hydroperoxydes lipidiques produits (**Schrader et al., 2006**). Les réactions mises en jeu sont les suivantes



1.6.2.1. Vitamines

1.6.2.1.1. vitamine E

Il est admis que les radicaux tocophérols sont régénérés par l'acide ascorbique et que sans cette synergie, les tocophérols sont inactifs (**Carr *et al.*, 2000**). Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol (α -TocH), connu comme inhibiteur de la propagation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂, et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (**Khalil, 2002**).

1.6.2.2. Polyphénols

Les polyphénols sont classés en deux groupes : les composés flavonoïdes et les composés non flavonoïdes. Les composés flavonoïdes sont regroupés en diverses familles : flavonol flavanols, flavones, isoflavones, flavanones et anthocyanes. Les non flavonoïdes sont divisés en acides phénols et dérivés, lignanes et stilbènes (**Stevensen *et al.*, 2007**).

1.6.2.3. Acides phénoliques

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (**Bruneton, 1993**).

1.6.2.4. Tannins

Sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé, ils constituent le 3^{ème} groupe important des composés phénoliques. Les tannins possèdent 2 sous-groupes ; tannins hydrolysables et tannins condensés. Les premiers sont esters acide gallique (gallol et ellagitanins). Les derniers sont des polymères de polyhydroxyflavan 3-ol monomères (aussi connu proanthocyanidine).

1.6.2.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure 6) (Zeghib, 2013).

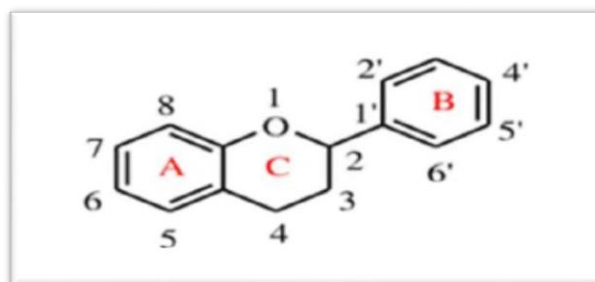


Figure 04 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (Zeghib, 2013).

2. *Thymus vulgaris* L

2.1. Description et classification botanique

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



Figure 05 : Photographie de *Thymus vulgaris* L (Site web N 1).

Tableau 03 : Classification botanique de *Thymus vulgaris* L (Yakhlef, 2009).

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

2.2. Utilisations traditionnelles de *Thymus vulgaris*

Le Thymus est l'une des plantes les plus utilisées comme épices et extraits à fort pouvoir antibactérien et anti-inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle. En médecine traditionnelle, cette espèce est très utilisée sous plusieurs formes : Les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, et le rhume, en tisane tonique, en décoction pour guérir les maux de tête, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques. Les feuilles de *Thym* sont riches en huile Essentielle dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie. Son huile est parmi les dix

premières huiles essentielles du monde. Elle est antiseptique et utilisée à ce titre pour soigner les infections pulmonaires comme l'asthme et la bronchite. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée, il est aussi vermifuge. De nos jours, *le Thymus* est passé d'une herbe traditionnelle à une phytothérapie rationnelle. C'est une source incroyable de fer, de calcium, de manganèse et de vitamine K qui améliore également le flux sanguin et stimule l'ensemble du système. Cette plante a été récemment recommandée comme substitut comme agent de prévention du cancer. **(Ghelichnia, 2016)**.

2.3. Composition chimique

De nombreuses études ont révélé que la plante *Thymus vulgaris* est très riche en plusieurs constituants **(Amiot, 2005)**.

La teneur en huile essentielle de la plante variée 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 abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), p-cymène (9,1 - 18,5 %), La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol **(Hudaib et al., 2002 ; Bouhdid et al., 2006)**.

Le contenu phénolique total, flavonoïdes, catéchine, et anthocyanine dans l'infusion aqueuse préparée du *thymus vulgaris* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques **(Kulišić et al., 2006)**.

De nombreuses études ont confirmé que les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une bonne source d'acide rosmarinique **(Kulišič et al., 2006)**.

2.4. Activités biologiques

2.4.1. Activité antioxydante

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**).

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**).

2.4.2. Activité anti-inflammatoire :

L'huile de *thymus vulgaris* est une combinaison de monoterpènes. La plupart des composés de cette huile sont le thymol terpénoïde naturel et ses composés chimiques de phénol carvacrol, qui ont des antioxydants, antimicrobien, médicamenteux, antitussif, antispasmodique et effets antibactériens. Terpénoïdes, flavonoïdes aglycones, flavonoïdes des glycosides et des acides résiniques synthétiques ont également été trouvés dans le *thymus vulgaris* (**Prasanth, 2014**).

Matériels et méthodes

1. Matériel

1.1. Réactifs

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits : DPPH, méthanol, $AlCl_3$, l'eau distillée, $FeSO_4$, Salicylate de sodium, folin, Na_2CO_4 , ont été obtenus de Prolabo.

Les appareillages utilisés : l'étuve, le spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau, agitateur, plaque chauffante, frigidaire, vortex.

1.2. Matériel végétale

La plante de *thymus vulgaris* été récoltée au mois de Juin 2021, dans la région de bouhamma, Khenchela. L'identification botanique à été faite par Pr.LaouerH. (Université Ferhat Abbas Sétif-1, Algérie).

2. Méthodes

2.1. Préparation de l'extrait

L'extrait aqueux de la plante *Thymus vulgaris* ont été préparés selon (**Benzidaneet al., 2013**). on prend les parties aérienne de la plante usagée , nettoyées, broyées et tamisées, et après on ajoutées l'eau distillée bouillante, placées sur un agitateur électrique pendant 30 minutes, puis filtrées (trois filtrations),L'extrait est placé dans des assiettes en verre puis placé dans une étuve à une température de $71\text{ }^{\circ}\text{C}$.Après 1 jours l'extrait prend une couleur marron foncé et une forme cristallisable, puis on récupère l'extrait qui se présente sous forme de poudre

2.2. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques des différents extraits et on le garde dans un récipient en verre est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. En effet, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté à 200 μ l d'extrait ou standard (préparé dans le méthanol ou l'eau distillée) avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 μ g/ml) et est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait) (Figure 06).

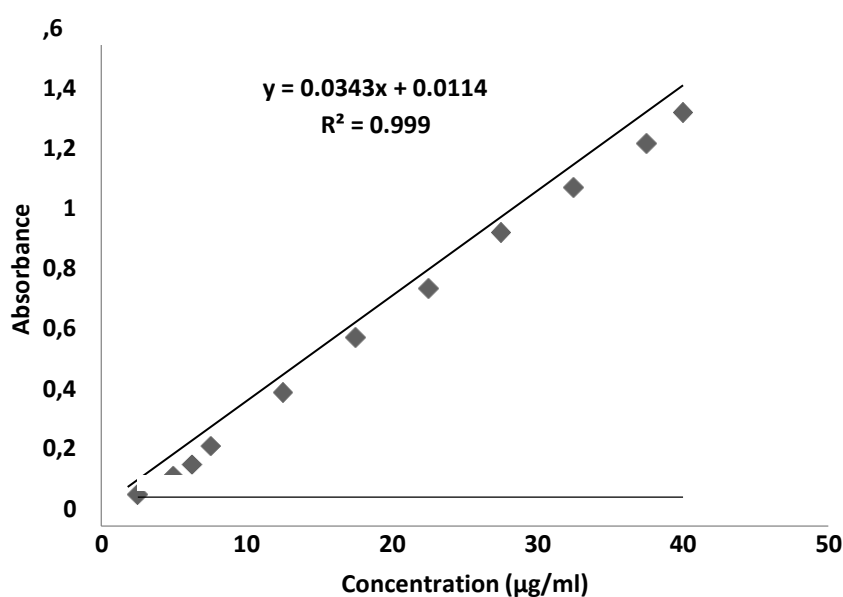


Figure06 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de trois essais).

2.3. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun *et al.*, 1996**) : est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits. La méthode consistait à ajouter 1 ml d'extrait ou standard à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La teneur en flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait) (**Figure 7**).

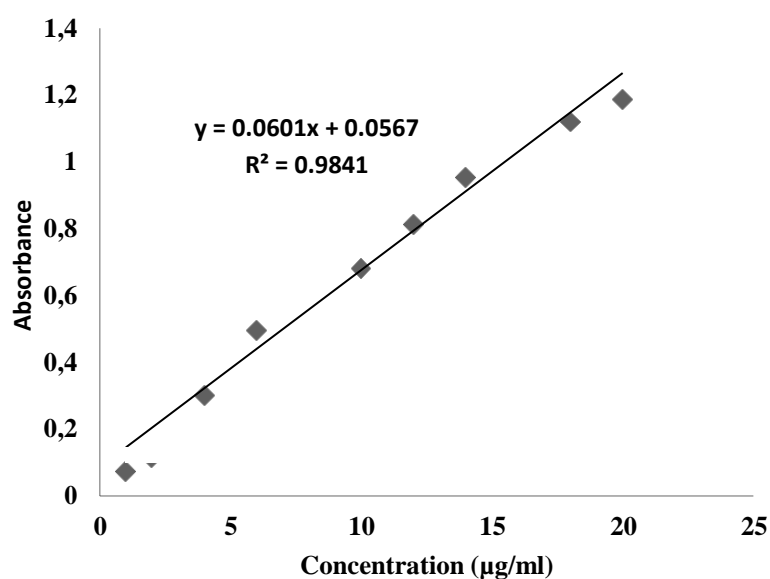


Figure 7 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de trois essais).

3. Activité antioxydante in vitro

Les extraits sont testés pour évaluer leur capacité antioxydante, deux différents tests d'évaluation sont utilisés, à savoir le test du DPPH qui permet de déterminer l'effet scavenger, le système β -carotène/acide linoléique qui détermine le pouvoir réducteur.

3.1. Test de DPPH (effet scavenger)

L'activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux est déterminée en utilisant le DPPH comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Boumerfeg et ses collaborateurs (2009). Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphénylpicryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. En effet, la solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 μ l des solutions d'extraits ou standards (quercétine, rutine, BHT) sont ajoutés à 1250 μ l DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

Les concentrations des antioxydants standards (Quercétine, Rutine et BHT) sont comprises entre 0 à 400 μ g/mL. La concentration inhibitrice de 50% de l'activité du DPPH (IC50) exprimée en μ g/ml de l'extrait est calculée et comparée avec celle du BHT.

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC₅₀) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT.

3.2. Test de radical hydroxyle

L'activité de piégeage du radical hydroxyle a été testée par la méthode de (**Geng *et al.*, 2012**). En bref, le mélange réactionnel contient 3,0 mL. de FeSO₄ (1,5 mM), 0,7 mL. de peroxyde d'hydrogène (6 mM), 0,3 ml de salicylate de sodium (20 mM) et un volume de 100 µL d'extraits à différentes concentrations (0.08 - 60 mg/mL. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 60 min à 37°C. L'absorbance a été ensuite mesurée à 562 nm. La vitamine C a été utilisée comme antioxydant standard. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage inhibition (\%)} = (1 - A_1 / A_0) \times 100$$

A₀ : l'absorbance de l'échantillon, **A₁** : l'absorbance du contrôle

Résultats et discussion

1. Rendement

La méthode de décoction utilisée pour la préparation de l'extrait aqueux donne une poudre marron avec un rendement de (56.19%).

Le rendement d'EA du *thymus vulgaris L* qui a été trouvé dans notre travail était supérieurs au résultat de **Yakhlef (2009), et Kholkhal (2014)** ; qui ont travaillé sur plusieurs espèces de *Thymus* (*T. vulgaris L*, *T. atlanticus*, *T. satureioides*, *T. spathulifolius* *T. ciliatus* et *T. coloratus*) et qui ont trouvés des rendements variables pour les extraits aqueux. Cette différence de rendement peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte qui peut modifier les compositions de la plante ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentale. En outre, une grande variabilité à différents stades de maturation et pour différentes condition de culture, telle que la température et les précipitations, est connue pour affecter les teneurs en composés phénoliques (**Et abedlet et al., 2014**).

2. Dosages des polyphénols et flavonoïdes

Le dosage de polyphénol et flavonoïde dans l'extrait aqueux à été réalisé par la méthode du Folin-Ciocalteu et au trichlorure d'aluminium, respectivement. Le résultat obtenu est présenté dans **le tableau 4**.

Tableau 4 : Teneurs en polyphénols totaux (mgEAG/g), flavonoïdes (mg ER/g) de l'extrait aqueux de la plante *T. Vulgaris L.*

	Polyphénole	Flavonoïde
Extrait aqueux de <i>T. Vulgaris L.</i>	118,875 ± 0,16	42,01 ± 0,004

Le taux de phénols totaux est déterminé à partir de l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage d'acide gallique : $y = 0,0334x + 0,0114$ sachant que le coefficient de détermination est $R^2 = 0,999$ (**Figure 6**).

Le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes été réalisé par des méthodes colorimétrique : le Folin – Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium respectivement. Ces deux méthodes sont considérées comme les meilleures méthodes de détermination des poly phénols et des flavonoïdes des extraits des plantes (**Djeridane et al., 2010**), car elles sont simple et reproductibles .La majorité des effets pharmacologiques des plantes sont attribués à ces substances (gulcin et al ., 2010).

Les résultats montrent que l'extrait aqueux contient une teneur plus élevés en polyphénols et flavonoïdes. En effet, l'eau et les solvants sont capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (**Talbi et al., 2015**).

D'autre part selon Kulišić et ses collègues (2006), ils ont mesuré la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux dans l'extrait aqueux préparé à partir de la partie supérieure du thymus commun, par des techniques spectrophotométriques. La teneur en polyphénols de cet extrait est de 33,3 µg EAG/mg de l'extrait, et la comparaison de la teneur en polyphénols dans

notre étude avec celle de la même plante (*Thymus vulgaris L*) étudiée par Kulišić et ses collègues nous a permis de conclure que les polyphénols de notre extrait sont trois fois plus élevés.

De plus, cet extrait est plus pauvre en flavonoïdes que l'infusion aqueuse étudiée par Kulišić et ses collaborateurs de 25,0 g EAG/mg de l'extrait. Il est important de noter que l'utilisation de plantes d'origines géographiques et climatiques différentes ainsi que des méthodes d'extraction et de titrage différentes réduit la fiabilité de la comparaison entre les deux études.

3. Activités anti oxydantes in vitro.

3.1. Piégeage du radical DPPH[•]

Le résultat obtenu par ce test montre que l'extrait aqueux présente un effet antioxydant remarquable vis à vis du radical DPPH avec une valeur d'IC₅₀ 0,6mg/mL. Ce pouvoir antioxydant est fort, probablement dû aux composés phénoliques présents dans la partie aérienne de la plante *T. Vulgaris*, et qui est connus comme substance antioxydante ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Kelly et al., 2002**). D'après ces résultats, l'extrait qui représente une forte activité antioxydante est celui qui possède une teneur élevée en poly phenols , CE résultat est en accord avec ceux obtenu par Zeghad et Merghem. (2013) qui ont rapporté une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et l'effet scavenger des extraits de *thymus vulgarus* . Il a été prouvé que les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoides sont principalement responsables de l'effet scavenger des radicaux libre

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des

flavonoïdes et leur capacité antioxydante, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic *et al.*, 2003).

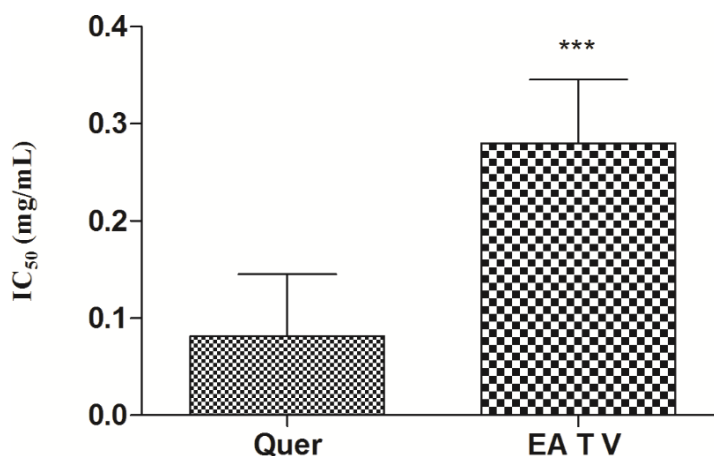


Figure 8 : Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux de *thymus vulgaris* et quercétine vis -à-vis du radical DPPH. *** $p < 0.001$.

3.2. Piégeage du radical hydroxyle

L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de la plante *T. Vulgaris vis-à-vis* du radical hydroxyle est évaluée en suivant la réduction de ce radical. Le résultat montre que cet extrait a une activité anti-radicalaire importante. La composition phytochimique de *T. vulgaris L* peut expliquer l'effet anti-radicalaire de l'extrait aqueux du fait de la présence de flavonoïdes. L'inhibition du radical hydroxyle par les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes et les tanins est fortement liée à la structure de ces composés. La présence des groupements hydroxyles libres dans la structure des composés phénoliques permettent le transfert d'un proton vers le radical hydroxyle (Terml et Smejkal, 2016).

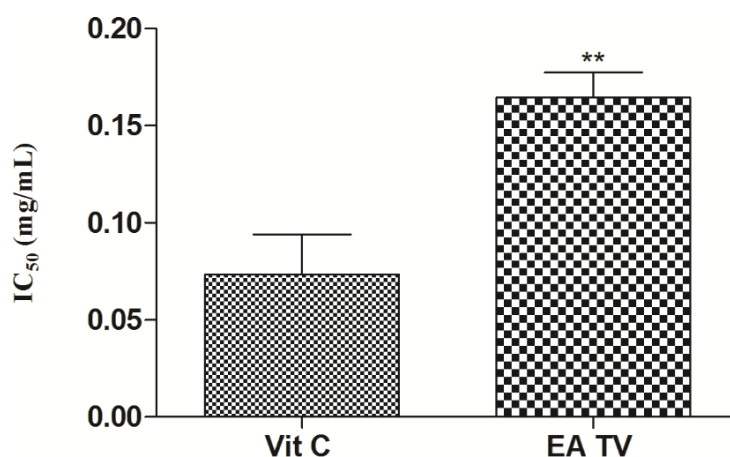


Figure 9 : Activité anti-radicalaire de l'extrait aqueux de *thymus vulgaris* et vitamine C vis-à-vis du radical hydroxyle. ** p < 0. 01.

Bhourri et ses collaborateurs (2010) notent que l'acide digallic, isolé de l'extrait aqueux des fruits de *Pistacia lentiscus*, a une activité potentielle vis-à-vis le radical hydroxyle pour. Ceci peut être expliqué par le fait que la molécule de l'acide digallic qui est un flavonoïde riche en groupements hydroxyles et les flavonoïdes stabilisent les espèces réactives de l'oxygène en réagissant avec le composé réactif du radical

Conclusion

Les plantes médicinales sont utilisées partout dans le monde pour traiter diverses maladies, y compris l'inflammation, les maladies cardiaques, le cancer... Un grand nombre de plantes médicinales contiennent des composés présentant des propriétés thérapeutiques très importantes. L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Pour permettre l'utilisation vaste des plantes médicinales dans la médecine moderne, la recherche et le développement de nouveau traitement important est demandée.

Dans le but de la valorisation de la flore algérienne, notre travail, on s'est intéressé aux effets antioxydants de la partie arienne de la plante *T. Vulgaris*. La détermination de rendement en extrait brut a montré une rentabilité importante chez cette espèce. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait a manifesté un bon rendement avec 56.19% respectivement.

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en poly phénols totaux par le réactif du Folin et en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium. Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait riche en poly phénols et flavonoïde.

Les techniques *in vitro* ont révélé que l'extrait aqueux présente un intérêt potentiel par leurs activités anti oxydantes.

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être approfondis par des études suivantes : L'isolement, caractérisation et l'identification des composés actifs par des méthodes spécifiques.

- Une étude de la toxicité des plantes étudiées est indispensable afin de déterminer si elles peuvent être utilisées pour la fabrication de médicaments.

Références Bibliographiques

A

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. (2007). Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74** (7) : 636-643

Akroum, S. (2011). Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.

Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo, D., Trinajstic, N. (2003). Structure-radicalscavenging activity relationships of flavonoids. *Croatia Chemical Acta*, **76**, 55-61.

Azzouzi S. (2016). Etude phytochimique et biologique de *Bituminariabituminosa (L.) C.H .Stirton* (fabaceae) et *Centaureadimorphaviv.* (asteraceae). Thèse de doctorat. Université des Frères Mentouri. Constantine.

B

Baeuerle P A, Rupec R A, Pahl, H L. (2015). Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathologie Biologie*. **44**(25) : 29-35.

Beaudeau JL, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Legrand A, Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **21**: 144 -150.

Bhourri W, Derbel S, Skandrani I, Jihad B, Bouhlel I, Mohamed B, Sghaier M , Kilani S, Anne M, Marie G. Dijoux-Franca, Ghedira K, Leila C G. (2010). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia Lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro*, **24**, 509–515.

Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Delattre J, In Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie pathologique : aspects moléculaires et cellulaires.* Médecine-sciences Flammarion Paris. 2015 ; **45**(28) : 59-81.

Bouchouka E. (2016). Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes sahariennes. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar .Annaba.

Bruneton J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc Lavoisier (ed.). Paris. P. 1243

C

Cairns R A, Harris I S, Mak T W. Regulation of cancer cell metabolism. Nat Rev Cancer. 2012 ; 11(8): 85-95. *L'actualité Chimique*, 108-115. compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.

Carr A C, Zhu B Z, Frei B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). Circ. Res. 7 (5):349-354.

D

Djeridane A, Yousef M, Brunel J M, Stocker P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. Foodchem toxicol? 48, 2599-2606.

Dai J, Mumper R J. (2010). plant phenolics : extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 15 : 7313-7352.

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Actualité chimique. Mécanismes biochimiques. 108-115.

Fadili K, Amalich S, Soro K, Drdianhona D, Bouachrine M, Mahjoubi M, El Hilali F, Touria Z. (2015). polyphenol content and antioxidant activity of two species from Moroccan high Atlas. *Rosmarinus officinalis* and *thymus satueioides* international journal of innovation and scientific research. 32.

G

Ghedira K, (2005). Les flavonoids: structure propriétés biologiques, rôle prophylactique et emploi en thérapeutique. Phytothérapie. 4 :162-169.

Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M, Aboul- Enein H Y (2010). Radical scavenging and Antioxidant activity of tannic acid. Arabid J chem. 3(1). 43-53.

H

Halliwell B, Gutteridge J M C. Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, SanDiego. 2014; 186 (45): 1-85.

Harris AL. (2002). Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Reviews Cancer*. Vol 2(1), pp. 38-47.

Hwang ES, Kim GH. (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*. **229**: 1–10

J

Januel C. (2003). Stress Oxydant Au Niveau Des Plaquettes Sanguines Humaines Dans Le Contexte Du Diabète : Etude de Glutathion Et De La Glutathion Péroxydase 4. Thèse Doctorale : Biochimie. Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. Université Lyon I/ INSA-Lyon. N°: 03-ISAL-0024. 41–50.

K

Kelly E H, Anthony R T, Dennis J B. (2002). Flavonoid Antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J NutrBiochem*, 13, 572–584

Khan N, Al-Daghri N M, Al-Ajlan AS, Alokail M S. (2014). The use of natural and derived sources of flavonoids and antioxidants in Saudi Arabia. *Integrative Food Nutrition and Metabolism*. 1 (2): 100-106.

Kim H J, Wood, E.R., Shin, C.G., Park, H. (1998). A new flavonolgalate ester from Acer and its inhibitory activity against HIV-1 integrase. *Journal of Natural Products* **61**: 145–148.

Kulišić T, Dragovic-Uzlac V, Milos M. (2006). Antioxydant Activity of Aqueous tea infusions Prepared from oregano. Thyme and wild thyme. *Food technol. Biotechnol.* 44(4) : 485-492.

L

Leverve X. (2009). Stress oxydant et antioxydants. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **44** (5): 219-224.

M

Merghem R. (2009). Eléments de biochimie végétale. Bahaeddine (ed.). Algérie. .172

Mohamadi Z. (2013). Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie : 36-67

N

Nimse S B, Pal D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms / *RSC Adv* 45

O

Orban J C. (2010). Oxygène, Stress Oxydant. Chapitre : Désordres Métaboliques Et Réanimation, P, 427-437

Ozben T. (2007). Oxidative Stress an Apoptosis: Impact on Cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Science* ; 96 (34) : 2181-96.

P

Pourrut (2008). Implication de stress oxydatif dans la toxicité de la plante modèle, vicia faba 51.

R

Roa S P. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation research*, 555(1-2):107-119.

Roa S P, Kalva S, Yerramilli A, Mamidi S. (2011). Free radicals and tissue damage. Role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, 1(4):2-7.

S

Schrader M., Fahima HD. (2006). Peroxisomes and oxidative stress *biochimica et biophysica acta*. 1763: 1755-1766.

Serrano F., Klann E. (2004). Reaction oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing research reviews*. 3 :431-443.

T

Talbi H., Boumaza A., EL-mostafa K., Talbi J., Hilali A. (2015). *Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanoliques et aqueux de la nigellasativa L. (evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of nigellasativa L).* *Mater environ Sci*, 6. 1111 – 1117.

Thérond P., Denis B., In Delattre J., Beaudoux J L., Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres p 34

Trachootham D., Alexandre J, Huang P (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach *Nat Rev Drug Discov*; 18(2):579- 91.

Tremellen K. (2008). Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human reproduction update*, 14(3):243-258.

V

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin MT., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39** (1): 44-84.

Valko M., Rhodes C., Moncol J., Izakovic M M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160** (1): 1-40.

W

Wang J., Yi J (2008). Cancer cell killing via ROS. To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & therapy*. 7 (12): 1875-84.

Wolyniec K H., Sue., Haupt, Ygal. P53 and cell death. In: encyclopedia of life science. John wilet and sons? Ltd : chichester. 2009 ; 94(16) :92-5.

Y

Yakhlef G. (2009). Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *thymus vulgaris L. Et laurusnobilis L.* thèse pour l'obtention de diplôme de magistère de l'université de Batna.

Z

Zelko I N., Marian T J., Folz R J. (2013). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free rad biom med: 33(3): 337-349.

Zeghad A. (2013). Etude phytochimique et activité antioxydante ; antiproliférative ; antibactérienne et antiviral d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques de genre thymus. 4 ; 32-36.

Zeghad N, Merghem R (2013). Antioxidant and antibacterial activities of thymus vulgaris L. medicinal and aromatic plants research journal, 11: 5-11.