

Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante de *Thymus Ciliatus* ssp. *Coloratus*

Fatima KHOLKHAL^{1*}, Hamadi Abderrahmane LAZOUNI¹, Mourad BENDAHO²,
Ikram BOUBLEZA², Sari Daoudi CHABANE² et Tarik CHAOUCH¹

¹Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Université de Tlemcen, Algérie

²Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement (LAMAABE),
Université de Tlemcen, Algérie

* Correspondance, courriel : temakholkhal@yahoo.fr

Résumé

Thymus ciliatus ssp. *Coloratus*, plante aromatique, spontanée et répandue en régions méditerranéennes et dans le nord de l'Algérie est très utilisée par les populations locales pour ses vertus médicinales. Les tests phytochimiques appliqués au *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* ont montré la présence de quelques familles de composés chimiques et notamment les flavonoïdes. L'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait de flavonoïdes a été évaluée par la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxidant power) et par le test de DPPH. La première méthode a montré que la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne a une capacité à réduire le fer plus marquée que celles de l'acide ascorbique et le BHA et que celle des racines, est nettement inférieure. Quant aux fractions butanoliques des flavonoïdes de la partie aérienne et des racines, elles ont une capacité à réduire le fer largement inférieure à celles de l'acide ascorbique et le BHA. L'activité antioxydante, obtenue par la seconde méthode et relative à la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne de la plante est plus importante ($IC_{50}=0,85$ mg/mL) que celles obtenues à partir d'antioxydants utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique en l'occurrence l'acide ascorbique ($IC_{50} = 1,12$ mg/mL) et le BHA ($IC_{50}=1,61$ mg/mL).

Mots-clés : *Thymus coloratus*, activité antioxydant, flavonoïde, FRAP, DPPH.

Abstract

Phytochemical study and evaluation of the antioxidant activity of *thymus ciliatus* ssp. *Coloratus*

Thymus ciliatus ssp. *coloratus*, aromatic plant, spontaneous and widespread in the Mediterranean and in northern Algeria is widely used by local people for its medicinal properties. Phytochemical tests applied for *Thymus ciliatus* ssp. *coloratus* showed the presence of several families of chemical compounds including flavonoids. The *in vitro* antioxidant activity of flavonoids extract was evaluated by the iron reduction technique "FRAP" (ferric reducing antioxidant power) and DPPH test. The first method showed that the ethyl acetate fraction of the aerial part has an ability to reduce the iron greater than ascorbic acid and BHA and the roots, is significantly lower. As for butanol fractions of flavonoids from the aerial part and roots, they have an ability

to reduce iron significantly lower than those of ascorbic acid and BHA. The antioxidant activity obtained by the second method and on the ethyl acetate fraction of flavonoïds from the aerial part of the plant is more important ($I.C_{50} = 0.85 \text{ mg / mL}$) than those obtained from 'antioxydants used in food and pharmaceutical industries namely ascorbic acid ($I.C_{50} = 1.12 \text{ mg / mL}$) and BHA ($I.C_{50} = 1.61 \text{ mg / mL}$).

Keywords : *Thymus coloratus*, antioxidant activity, flavonoïd, FRAP, DPPH.

1. Introduction

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Ces propriétés dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques [1]. La présente étude s'intéresse à l'une des espèces de la famille des Lamiacées : *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* connu sous le nom de thym en français. Cette plante aromatique endémique se trouve à l'état spontané sous forme d'un sous-arbrisseau très ramifié à la base et très feuillu présentant un polymorphisme remarquable [2] et pouvant atteindre 40 centimètres de hauteur. Elle est constituée de petites feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base. Ces dernières sont peu dilatées et opposées, sans stipules, courtement pétiolées, oblongues, glabres, mais généralement ciliées à la base et un peu enroulées sur les bords colorées [3].

Les feuilles sont sessiles, elliptiques, lancéolées et très densément velues. Les nervures sont à peine visibles et le bord du limbe est fortement enroulé. La tige généralement tétrangulaire est très ramifiée et ligneuse en sa partie inférieure. Cette espèce pousse autour du bassin méditerranéen et dans le Nord de l'Algérie. Elle est rencontrée dans les pelouses, les rocailles et dans toutes les régions montagneuses [3]. Elle est utilisée par la population locale en médecine traditionnelle comme antifongique, antibactérien et agirait même comme antiviral. On lui reconnaît également des propriétés antiseptiques, antispasmodiques et digestives. Ces propriétés biologiques et pharmaceutiques du thym sont en grande partie dues à la présence de substances actives telles que les flavonoïdes qui représentent une des plus grandes classes des produits naturels synthétisés par la plante [4]. L'objet de ce travail est d'évaluer l'activité antioxydante du contenu flavonique de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus*.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

La plante a été cueillie à son âge mature au mois de Mai dans la région de « Béni-mester » qui situe dans la wilaya de Tlemcen. Cette dernière se trouve à l'ouest Algérien, entre 35°05' et 35°25' de latitude nord, et entre 0°15' et 2°15' de longitude. Celle-ci se limite au Nord par la mer méditerranéenne, au Nord-est par la wilaya d'Ain-Temouchent, à l'est par la wilaya de Naâma, et à l'ouest par le Maroc. La station d'étude « Béni-mester », se situe à 12km à l'ouest de Tlemcen. Elle a été ensuite séchée à l'abri de la lumière pendant quinze (15) jours à même le sol sur des sacs en jute.

2-2. Tests phytochimiques

Nous avons déterminé la composition chimique de la plante par une étude basée sur des tests de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que par des examens en lumière ultra violette.

2-3. Extraction des composés phénoliques

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques ont été effectuées sur les deux parties (racines et partie aérienne brute) de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* selon les méthodes suivantes :

2-3-1. Préparation des extraits bruts méthanoliques

L'extrait brut est obtenu après une macération méthanolique de 24 heures [5].

2-3-2. Extraction sélectives des flavonoïdes

Nous avons utilisé les solutions méthanoliques pour l'extraction des flavonoïdes, méthode décrite par [6] « fractions d'acétate d'éthyle et butanolique ».

2-4. Dosage des phénols totaux

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits bruts de la partie aérienne et des racines de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* est obtenue par spectrophotométrie selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu [7].

2-5. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits bruts méthanoliques est déterminée spectrophotométriquement selon la méthode décrite par [8].

2-6. Activité antioxydante

2-6-1. Réduction du Fer : FRAP (ferric reducing antioxidant power)

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par [9], basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} .

2-6-2. Piégeage du radical libre DPPH

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrasyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520nm [10]. Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH est celui décrit par [11].

3. Résultats et discussion

3-1. Tests phytochimiques

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. Les résultats obtenus sont regroupés dans le *Tableau 1*.

Tableau 1 : Familles de composés chimiques issues de la racine et de la partie aérienne

Espèce étudiée	<i>Thymus coloratus</i>	
	Partie aérienne	Racine
Familles chimiques recherchées		
Amidon	-	-
Saponosides	-	-
Tanins catéchiques	+++	+
Tanins galliques	-	-
Flavonoïdes	+++	+++
Composés réducteurs	+	-
Alcaloïdes	-	-
Coumarines	-	-
Anthocyanes	-	-
Stérols et stéroïdes	++	+
Hétérosides stéroïdiques	++	+
Hétérosides triterpéniques	-	-

(+): Présence faible

(+++): Présence forte

(++): Présence moyenne

(-): Absence

3-2. Dosage des polyphénols totaux

Les courbes d'étalonnage de l'acide gallique et de la catéchine pour les dosages respectifs des polyphénols et des flavonoïdes sont données par les **Figures 1 et 2**

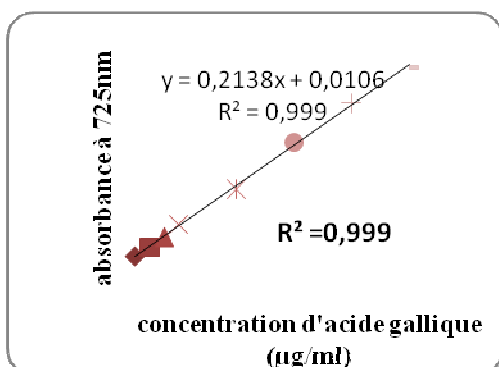


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

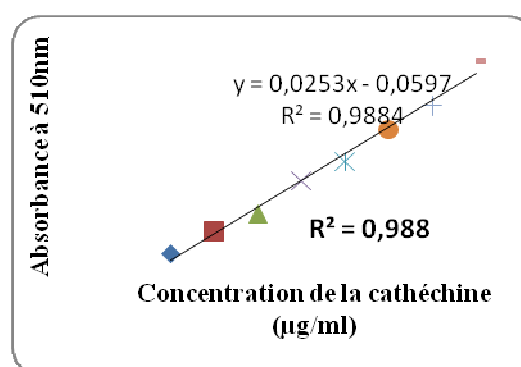


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Nous remarquons que la partie aérienne renferme des taux en polyphénols totaux et en flavonoïdes plus élevés que ceux déterminés dans les racines. En effet, on trouve 64,23 mg EAG/g de polyphénols (partie aérienne) contre 16,36 mg EAG/mg (racines) et, 298,2 mg EC/g de flavonoïdes (partie aérienne) contre 90,75 mg EC/g (racines).

3-3. Etude de l'activité anti-oxydante

L'activité antioxydante *in vitro* de notre extrait a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxydant power) et le test de DPPH.

3-3-1. Réduction du fer : FRAP (ferric reducing antioxidant power) pour les flavonoïdes

(Fraction d'acétate d'éthyle et fraction butanolique)

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité antioxydante par la technique de réduction du fer « FRAP » sont enregistrés dans les **Figures 3 et 4**.

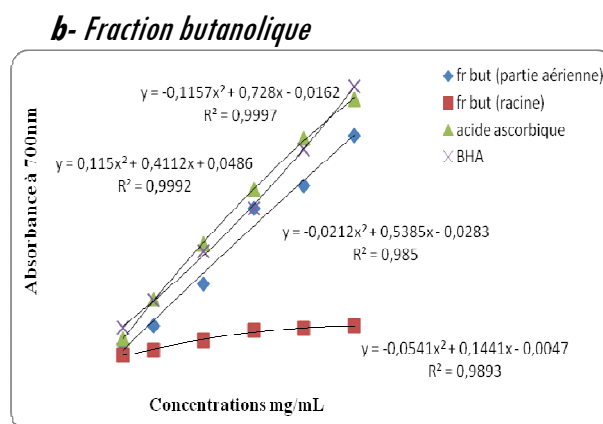
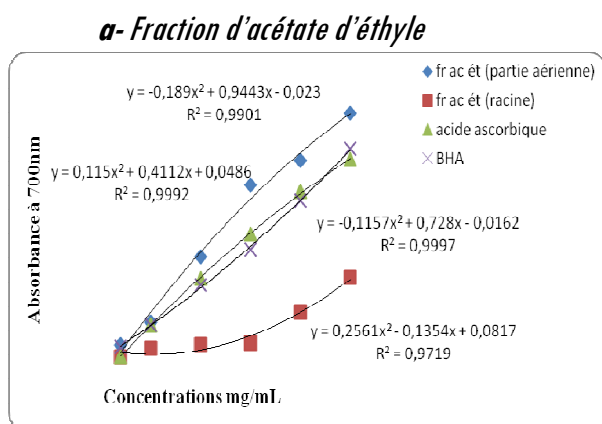


Figure 3 : Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction d'acétate d'éthyle), de BHA et de l'acide ascorbique

Figure 4 : Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction butanolique), de BHA et de de l'acide ascorbique

La fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne a montré une capacité à réduire le fer plus importante que celles de l'acide ascorbique et le BHA et, que celle des racines, est nettement inférieure. Quant aux fractions butanoliques des flavonoïdes de la partie aérienne et des racines, elles ont une capacité à réduire le fer largement inférieure à celles de l'acide ascorbique et le BHA.

3-3-2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1- picrylhydrazyl) :

Le radical DPPH est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical et la simplicité de l'analyse [10].

3-3-2-1. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les substances de référence

Les **Figures 5 et 6** représentent le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour les antioxydants standards l'acide ascorbique et le BHA.

A des fins comparatives, l'acide ascorbique et le BHA antioxydants standards, ont montré des activités antiradicalaires importantes avec des IC₅₀ respectivement de 1,12 mg/mL et 1,61 mg/mL.

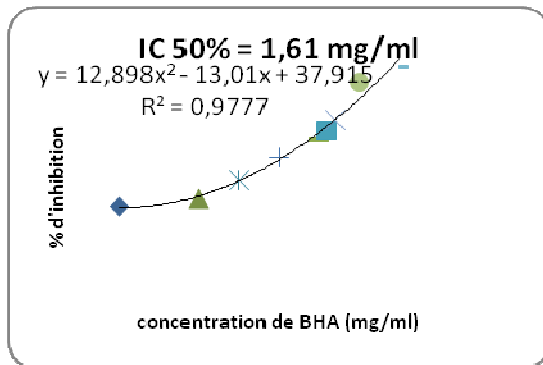


Figure 5 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHA

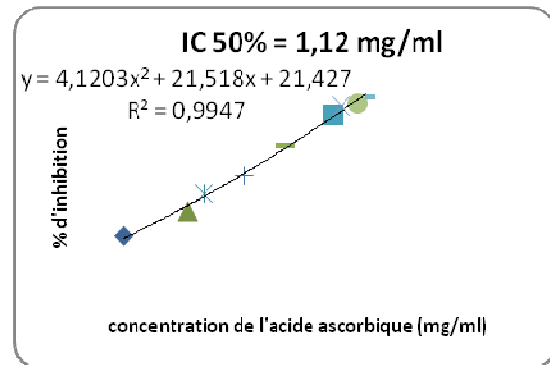


Figure 6 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

3-3-2-2. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les flavonoïdes (fraction d'acétate d'éthyle et fraction butanolique)

Les résultats obtenus lors du test de la mesure du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour les flavonoïdes : fraction d'acétate d'éthyle et fraction butanolique (partie aérienne et racine) sont représentés dans les **Figure 7 et 8**. Le pourcentage d'inhibition du radical libre semble augmenter avec l'élévation de la concentration.

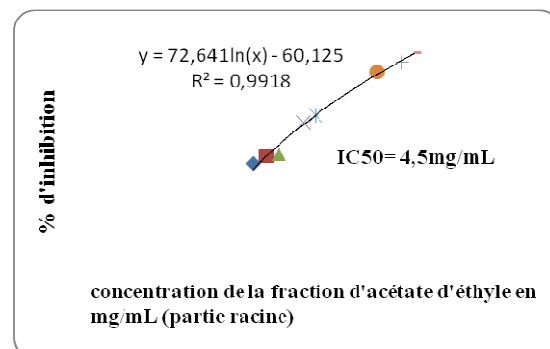
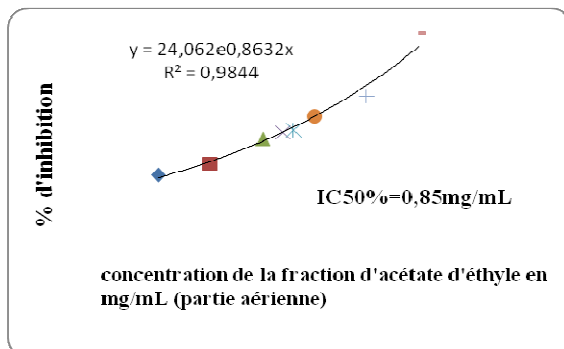


Figure 7 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle des deux parties étudiées de *Thymus ciliatus ssp coloratus*.

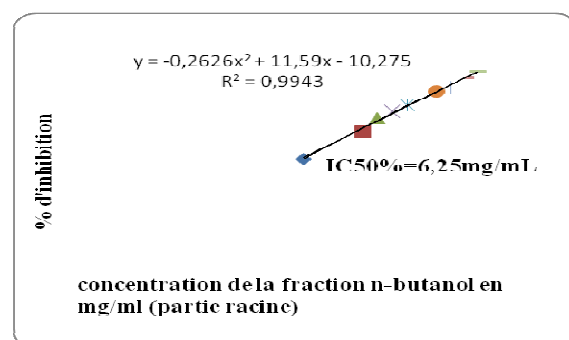
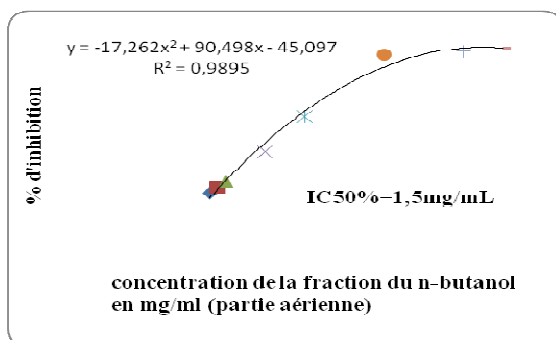


Figure 8 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées de *Thymus ciliatus ssp coloratus*.

- Pour la phase acétate d'éthyle, l'extrait des parties aériennes a révélé une activité de piégeage du DPPH plus élevée que celle obtenue pour les racines, et, plus importante que celle des antioxydants standards (acide ascorbique et le BHA). Son pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 94%, à une concentration de 1,5mg/mL contre 79% pour les racines à une concentration de 6,75 mg/mL.

- Pour les fractions butanoliques, le meilleur résultat obtenu est celui de la fraction butanolique des parties aériennes qui a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 73% à une concentration de 2,75mg/mL.

D'après les figures 7 et 8, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* paraît le plus actif par rapport à l'extrait butanolique. On constate également que l'activité de l'acétate d'éthyle est plus importante sur la réduction du DPPH à partir de la concentration de 1,5mg/mL suivie de l'extrait butanolique 2,75mg/mL. Ces résultats montrent que nos extraits possèdent une puissante activité à céder le proton pour neutraliser le radical DPPH ; et par suite l'extrait flavonique a présenté un très bon pouvoir antioxydant, résultat conforme à celui cité par la bibliographie (les flavonoïdes sont des capteurs puissants de radicaux) [12-14].

4. Conclusion

Les tests phytochimiques appliqués au *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* ont permis d'identifier quelques familles de composés chimiques et notamment les flavonoïdes. L'activité antioxydante *in vitro* du contenu flavonique extrait à partir des parties aériennes et des racines, affronté par deux solvants organique (Acétate d'éthyle et n-butanol) a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir la technique de réduction du fer « FRAP » (ferric reducing antioxydant power) et le test de DPPH. La première technique a montré que la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne a une capacité à réduire le fer plus marquée que celles de l'acide ascorbique et le BHA et, que celle des racines, est nettement inférieure. Quant aux fractions butanoliques des flavonoïdes de la partie aérienne et des racines, elles ont une capacité à réduire le fer largement inférieure à celles de l'acide ascorbique et le BHA. L'activité antioxydante de la fraction acétate d'éthyle des flavonoïdes de la partie aérienne de la plante obtenue par la deuxième méthode est plus importante ($I.C_{50}=0,85$ mg/mL) que celles obtenues à partir d'antioxydants utilisés dans les industries alimentaire et pharmaceutique en l'occurrence l'acide ascorbique ($I.C_{50} = 1,12$ mg/mL) et le BHA ($I.C_{50}=1,61$ mg/mL).

Références

- [1] - P. Maihebiau, La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. (1994) P.635.
- [2] - J.E. Delanch et al, Nouvelle flore de la Belgique, du GD de Luxembourg, du Nord de France et régions voisines.449 (1978) P. 460-462.
- [3] - P. Quezel and S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, (1963) P.788-789.
- [4] - I. Johnson, " Antioxydants et anticancéreux ", biofuture N° 186, (1999) P.14-15, 17.
- [5] - A. Matkowski and M. Piotrowska, Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, *Fitoterapia*, 77: (2006) P.346-353.

- [6] - F.Bekkara, M. Jay, M.R. Viricel and Rome S, Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation. *Journal Plant and Soil*, 203, (1998) P.27-36.
- [7] - S.P. Wong, L.P. Leong and Koh J.H.W, Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*; 99; (2006) P.775-783.
- [8] - D.O. Kim, O.K. Chun, Y. J. Kim, H.Y. Moon and C.Y. Lee, Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.*, 51(22), (2003) P.6509-6515.
- [9] - Y. Pan, K. Wang, S. Huang, H. Wang, X. Mu, C. He, X. Ji, J. Zhang and F. Huang, Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*, 106: (2008) P.1264-1270.
- [10] - B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, A. Goran and R. Igic, Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111: (2008) P. 925-929.
- [11] - N. Benhammou, F. Atik Bekkara and K.T. Panovska, Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* Desf. *Advances in Food Science (AFS)*, 29(23), (2007) P.155-161.
- [12] - L. Bartosikova, J. Necas, V. Suchy, R. Kubinova, D. Vesela, L. Benes, J. Uek, J. Salplachta, T. Florian, M. Frydrych, J. Klusakova, T. Bartosik, P. Frana and J. Dzurova, Antioxidative Effects of Morine in Ischemia-Reperfusion of Kidneys in the Laboratory Rat. *Acta Vet. Brno*.72, (2003) P.87-94.
- [13] - M. Lahouel and J-P. Fillastre, Rol of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema*.7 (3), (2004) P. 313-320.
- [14] - K.T. Panovsk, S. Kulevanova and M. Stepova, In vitro antioxydant activity of some *Teucrium species* (Lamiaceae). *Acta Pharm.* 55, 20. (2005)P. 7-214.