

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

Titre

**EVALUATION *IN-VITRO* DE L'ACTIVITE
ANTIOXYDANTE DES DIFFERENTS EXTRAITS DE
*THYMUS VULGARIS L.***

Présenté par : Btissam CHAIR

Encadré par :

- Dr. Chaimae RAIS
- Pr. Bouchamma EL-OUAZNA

Soutenu le : 12/6/2019

Devant le jury composé de :

- Dr. Chaimae RAIS
- Pr. Bouchamma EL-OUAZNA
- Pr. Karima Mikou

Année universitaire

2018/2019

Je dédie ce travail

A

Mes très chers parents

Qui ont toujours été là pour moi tout au long de mes études et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mon cher frère et ma chère sœur

Pour leurs patiences et leurs soutiens qu'ils n'ont cessés d'apporter au cours de ma formation.

A ma famille

Que ce travail soit l'aboutissement de votre soutien et de votre encouragement.

A mes amis et amies

Ahlam altif, fatima zohra chafik, rabab chteba, hajar ouardi, hamza alaoui,

Que notre amitié dure pour toujours.

A tous ce qui m'aiment sincèrement

Je vous dédie ce modeste travail.

Remerciements

Je remercie Dieu, le tout puissant de ma avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

Tout d'abord je tiens à remercier vivement **Mr Abdelkhalek FAR-HAT**, Directeur de l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques, qui m'a donné l'opportunité d'effectuer mon stage de fin d'étude.

J'adresse également mes sincères remerciements à mon encadrante **Dr Chaimae Rais**, Responsable du Laboratoire de Botanique au sein de l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques pour ses conseils précieux qui m'ont permis de réaliser mon sujet de fin d'étude dans les bonnes conditions.

J'exprime ma profonde gratitude et immense respect à mon encadrante **El-Ouazna Bouchamma** professeur à la faculté des sciences et techniques de Fès, de sa disponibilité, de m'avoir encadrée durant ma période de stage et de son soutien.

Mes remerciements s'adressent également à la doctorante **Chaimae Slimani**, pour son accueil, le partage de son expertise au quotidien, et son temps accordé.

Je tiens aussi à remercier professeur **Mikou Karima** qui a accepté de sacrifier une Partie de son temps pour juger ce travail.

Je tiens à remercier toute personne ayant contribué d'une façon ou d'une autre à la réalisation de mon travail.



Présentation sur ANPMA :

L'INPMA (Institut National des Plantes Aromatiques et Médicinales) est un des établissements universitaires, de recherche appliquée, d'appui technique et d'information, spécialisé dans les PMA. Dont les missions s'inscrivent dans le cadre de la charte et la loi 0100. (Décret de création du 4 juin 2002, Bulletin officiel du 27 juin 2002). Il s'inscrit dans le cadre : -Des recommandations de la Charte Nationale de l'Education et de la Formation ; -Des missions fixées à l'INPMA (décret du 4 juin 2002) ; -Des dispositions législatives et réglementaires ; -Des mesures et objectifs envisagés pour la mise en place de la réforme ; -De l'ouverture de l'Université sur l'environnement socio - économique. Pour organiser la filière des Plantes Médicinales et Aromatiques, le Gouvernement de Sa Majesté avait décidé de transformer l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques en « Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques ».

Et pour cause, l'Institut présentait de nombreuses défaillances, notamment en termes de faiblesse des moyens financiers et des ressources humaines, en plus de l'inadéquation de son organisation en tant qu'établissement universitaire. L'Agence, considérée comme une réponse à ces défaillances, aura pour rôle de fournir l'information technique, de recherche et d'innovation et aider les décideurs à organiser la filière. C'est ainsi que la loi n° 111-12 relative à l'Agence Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques, promulguée par le Dahir n° 1-15-04 du 29 rabii II 1436 (19 février 2015), a été publiée au Bulletin Officiel N° 6338 le 26 Février 2015.

Résumé

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité antioxydante de différents extraits de *Thymus vulgaris*, par deux méthodes d'extraction.

Trois extraits ont été préparés, méthanolique, éthanolique et aqueux. Ainsi, la valeur maximale du rendement a été enregistrée au niveau de l'extrait éthanolique par sonication avec un pourcentage de 16.4%.

Le dosage de polyphénols, des flavonoïdes montre que l'extrait méthanolique (EM) par macération est le plus riche en polyphénols (138.5 mg/g) et en flavonoïdes (31,46 mg/g) par rapport aux autres extraits.

Le pouvoir antioxydant des extraits a été évalué *in vitro* par les tests du DPPH et la phosphomolybdate (la capacité antioxydante totale). Les résultats obtenus, révèlent que l'EM par macération présente une meilleure activité antioxydante par rapport aux autres extraits étudiés.

Mots clés : *Thymus vulgaris* ; Extraits ; Polyphénols ; Flavonoïdes ; Activité antioxydante.

Liste des figures

Figure 1 :	Espèce <i>Thymus vulgaris</i>	3
Figure 2 :	Technique de la macération à froid.....	5
Figure 3 :	Technique de l'hydrosistillation.....	6
Figure 4 :	Structure du noyau phénol.....	7
Figure 5 :	Structure chimique du radical libre DPPH.....	9
Figure 6 :	Réaction de test DPPH.....	9
Figure 7 :	Schéma sur la réaction de test FRAP.....	10
Figure 8 :	La plante <i>Thymus vulgaris</i> L. (a) : matière sèche, (b) : poudre fine.....	11
Figure 9 :	Extraction par Macération.....	12
Figure10:	Elimination des solvants par rotavapor.....	12
Figure11:	Extraction par Sonication.....	12
Figure12:	Rendement des différents extraits de <i>Thymus vulgaris</i>	15
Figure13:	Teneur en polyphénols des différents extraits de <i>Thymus vulgaris</i> (EA, EE, EM).....	16
Figure14:	Teneur en flavonoïdes des différents extraits de <i>Thymus vulgaris</i> (EA, EE, EM).....	16
Figure15:	Capacité antioxydant totale des différents extraits de <i>Thymus vulgaris</i> (EA, EE, EM).....	17
Figure16:	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'antioxydant de référence et des différents extraits testés par la technique de macération.....	18
Figure17:	Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'antioxydant de référence et des différents extraits testés par la technique de sonication.....	18

Liste des abréviations

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EA : Extrait aqueux

EE : Extrait éthanolique

EM : Extrait méthanolique

FRAP : Ferric Reducing-Antioxidant Power

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

PAM : Plante aromatique et médicinale

TAC : Capacité antioxydante totale

TRAP : Total Radical-trapping Antioxidant Parameter

Sommaire

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Plantes aromatiques et médicinales	2
II. Généralités sur la plante <i>Thymus vulgaris</i>	2
1. Description botanique	2
2. Systématique.....	3
3. Distribution géographique.....	3
4. Période de récolte	4
5. Composition chimique.....	4
III. Méthodes d'extraction.....	5
1. Macération.....	5
2. Infusion.....	5
3. Décoction.....	6
4. Extraction par soxhlet.....	6
5. Hydrodistillation.....	6
IV. Composé phénolique.....	7
1. Acides-phénols simples.....	7
2. Flavones.....	8
3. Tanins.....	8
4. Anthocyanes.....	8
V. Activité Antioxydante.....	8
1. Méthodes d'étude d'activité des antioxydants.....	9
1.1. Test au DPPH.....	9
1.2. Activité antioxydante totale.....	9
1.3. Test de la réduction du fer FRAP.....	10
1.4. Test ORAC.....	10
1.5. Méthode de TRAP.....	10
MATERIEL ET METHODES	
I. Matériel végétal.....	11
II. Préparation des extraits	11
1. Extraction par macération.....	11
2. Extraction par ultrason.....	12
3. Rendement des extraits.....	12
III. Dosage des métabolites secondaires.....	13
1. Dosage des polyphénols.....	13
2. Dosage des flavonoïdes	13
IV. Activité antioxydante.....	13
1. Test au DPPH.....	13
2. Capacité antipxydante totale.....	14
RESULTATS ET DISCUSSION	
I. Rendements des extraits de <i>Thymus vulgaris</i>	15
II. Dosage des métabolites secondaires.....	15
1. Teneur en polyphénols.....	15

2. Teneur en flavonoïdes.....	16
III. Activité antioxydante.....	17
1. Capacité antioxydante totale.....	17
2. Test de DPPH	17
CONCLUSION	19
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	20

INTRODUCTION

Le Maroc, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse (El-Hilaly et *al.*, 2003). Parmi ces espèces végétales, 10% seulement sont des plantes aromatiques et médicinales, c'est-à-dire des plantes qui synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essences aromatiques par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs (Pibiri, 2006).

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. Ainsi, une recherche de nouvelles drogues s'est imposée. Il y a eu donc, un réveil vers un intérêt progressif pour l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement. En effet, les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable (Tine-Djebbar, 1753).

L'utilisation des plantes aromatiques et médicinales 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.

Le présent travail vise à étudier l'activité antioxydante des extraits bruts de la plante aromatique, *Thymus vulgaris*, qui appartient à la famille des Lamiacées. Cette dernière, est parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante. La sélection de cette plante s'est fondée sur les critères suivants : elle est parmi les plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle. Ses huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Elle représente récemment, un sujet de recherche scientifique intéressant.

Notre travail est ainsi initié par une étude bibliographique sur la plante étudiée, *Thymus vulgaris*. Par la suite, nous avons exposé les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de la présente étude. Dans une dernière partie, nous avons présenté les résultats obtenus avec leurs discussions.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Plantes aromatiques et médicinales

Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) sont des plantes utilisées en cuisine et en phytothérapie pour les arômes qu'elles dégagent et leurs huiles essentielles que l'on peut extraire. Ces plantes aromatiques se trouvent dans la nature à l'état sauvage, sont utilisées depuis au moins 7000 ans par les hommes et sont à la base de la phytothérapie.

Plusieurs utilisations peuvent être attribuées aux plantes aromatiques et médicinales. Ainsi, les PAM sont utilisées en alimentation dans les boissons, les colorants. Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation est pour une bonne part, responsable des plaisirs de la table. Aussi, les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires, qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve dans les plantes de nouvelles molécules actives, ou des matières premières pour la semi-synthèse.

II. Généralités sur la plante *Thymus vulgaris*

1. Description botanique

Thymus vulgaris (figure 1), 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 roulé en dessous à nervures latérales distinctes, au pétiole extrêmement court et blanchâtre 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.



Figure 1 : Espèce *Thymus vulgaris*

2. Systématique

Règne : Plantes

Sous règne : Plantes vasculaires

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Ordre : Labiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris*

3. Distribution géographique

Le thym est originaire des pays du bassin méditerranéen sur les rives nord et ouest (où il est souvent cultivé dans les jardins) et des territoires limitrophes sous influence climatique méditerranéenne, ainsi qu'en Afrique du Nord. Assez nomade, il est subsontané dans des régions subtropicales, chaudes ou tempérées, et plus spécialement en Europe et en Amérique du Nord. Certaines espèces sont plus adaptées aux climats plus rudes que d'autres, comme l'espèce *Thymus polytrichus* (serpolet à pilosité variable) très présente dans les Alpes du Sud dans les zones pâturées très rases et sur sols rocailloux.

La capacité de cette plante à résister à de très fortes chaleurs provient aussi de son huile essentielle qui, produite la nuit, s'évapore le jour : c'est par cette action que la chaleur sera consommée. Ce principe fut découvert en 1960 (Lambinon J. et al). Le thym craint légèrement les acariens et les maladies qui amèneraient ses racines à se dégrader. Par contre son huile essentielle aux vertus désinfectante protège sa partie aérienne.

Le thym au Maroc se trouve essentiellement au Maroc saharien, Atlas saharien, Anti Atlas, Moyen Atlas, Haut Atlas et le Maroc atlantique moyen (Institut scientifique).

4. Période de récolte

Deux récoltes peuvent être entreprises, une en fin mai, début juin au commencement de la période de floraison, l'autre en septembre. Les branches doivent être coupées jusqu'à 5 cm du sol ; et si l'on coupe les branches à la fin de l'été, il faut éviter de couper plus bas que le tiers de la plante, car une coupe trop basse favoriserait l'apparition de jeunes pousses qui ne résisteraient pas aux premiers froids.

Il est conseillé de cueillir le thym dans des endroits éloignés des bords des chemins et des sentiers. Il ne faut pas arracher la plante mais plutôt lui couper les tiges au sécateur ou les casser du bout des doigts, tout en évitant de couper toutes les tiges et toutes les plantes, pour permettre la survie et la reproduction. Il suffit d'éclaircir la plante. Il est préférable de réaliser la cueillette après la rosée du petit matin et avant les heures les plus chaudes où la plante aura évacué le maximum d'humidité et n'aura pas évaporé son huile essentielle. On peut constater, que pour une récolte dans un champ, l'utilisation d'une fauche mécanique est avantageuse. Le temps consacré à la cueillette est ici amorti par du matériel adéquat. Il semblerait qu'il soit préférable de cueillir le thym, juste avant la période de floraison.

5. Composition chimique

De nombreuses études (Balladin et Headley, 1999 ; Amiot, 2005) 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 intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimique.

Tableau 1 : Teneur en polyphénols (en μg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse de *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

III. Méthodes d'extraction

L'extraction est un procédé de séparation en génie chimique et en chimie de laboratoire qui consiste à extraire une espèce chimique, c'est-à-dire prélever une ou plusieurs espèces chimiques d'un mélange solide ou liquide, sur la base de propriétés chimiques ou physiques.

Le moyen d'extraction utilisé n'est pas ou peu miscible avec les composants principaux du mélange initial, et le composé à extraire possède plus d'affinité avec le moyen d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange initial. L'opération d'extraction se déroule en deux parties :

- ✓ Première partie de transfert du composé à extraire entre le mélange initial et le moyen d'extraction.
- ✓ Deuxième partie de séparation du moyen d'extraction du mélange principal.

1. Macération

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles, ou bien pour qu'il absorbe ce liquide afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, pour le conserver ou pour qu'il s'y décompose (Figure 2). La macération peut se faire dans une solution alcoolique (macération alcoolique), de l'eau ou l'huile.

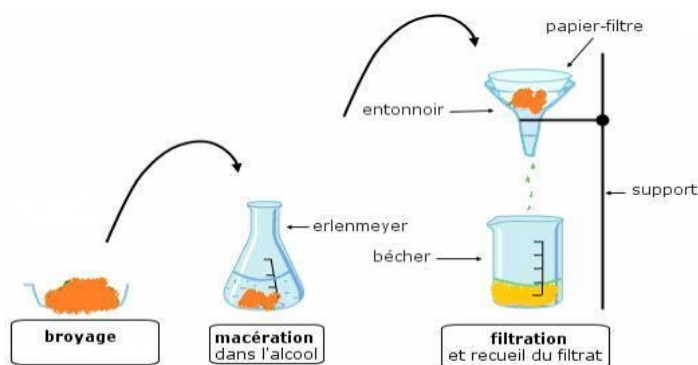


Figure 2: Technique de la macération à froid

2. Infusion

L'eau bouillante est versée sur les feuilles ou sur les fleurs finement hachées pour qu'elles libèrent l'arôme et leur principe actif. On laisse infuser une dizaine de minutes.

3. Décoction

La plante est mise dans l'eau froide et portée à ébullition. Cette méthode de transformation ne permet pas d'extraire autant de principe actifs que l'infusion, mais elle est adaptée aux racines et aux écorces pour lesquelles l'extraction est difficile.

4. Extraction par soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie du matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir à siphon et surmontée d'un réfrigérant. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en solutés à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec le solvant. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair, c'est-à-dire sans une proportion significative de solutés (Lagnika, 2005).

5. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à porter à ébullition un liquide dont les vapeurs vont entraîner des substances volatiles qui ne sont pourtant pas solubles dans ce liquide. On parle d'hydrodistillation lorsque le liquide entraîneur est l'eau. On utilise souvent cette technique pour extraire les huiles essentielles des fleurs, de la lavande, par exemple.

Ainsi, on récupère dans l'erlenmeyer, après le réfrigérant, un mélange d'eau et du liquide. Ces deux liquides, alors non miscibles, constituent le distillat.

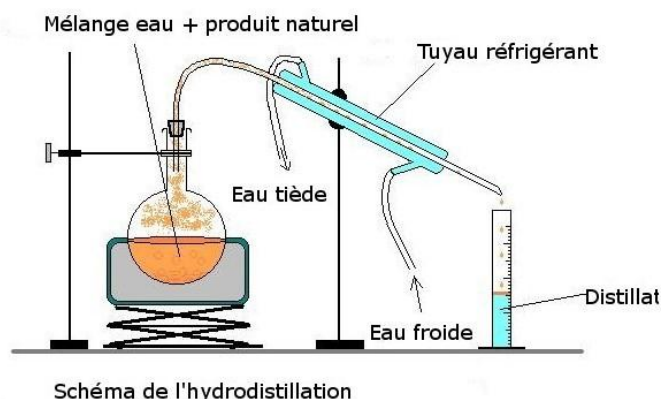


Figure 3 : Technique de l'hydrosistilation

IV. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par la présence d'au moins deux groupes phénoliques, associés en structures plus au moins complexe. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaires des plantes.

Cette vaste famille regroupe des composés non azotés présentant des cycles aromatiques, portant un ou plusieurs groupes hydroxyle, le plus souvent solubles dans l'eau.

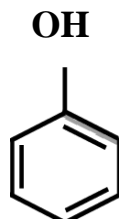


Figure 4 : Structure du noyau phénol (Stokey L. L. 1970).

En se basant sur la structure carbonée de base, on peut distinguer les principales classes de composés phénoliques.

1. Acides-phénols simples

Un acides-phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique.

- ✓ **Les acides hydroxy benzoïques** : dérivent par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1. Ces hydroxyles phénoliques OH peuvent ensuite être Méthyles.
- ✓ **Les dérivés de l'acide cinnamique** : les acides hydroxy cinnamiques ont une structure de base de type C6-C3. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes les hydroxyles phénolique OH de ces dérivés peuvent aussi être méthyles (-O-CH3).

2. Flavones

La flavone est la molécule de base des flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits, et représentent une source importante d'antioxydants dans l'alimentation humaine. Plus de 6000 ont été décrits chez les plantes. Ils partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C6-C3-C6, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa-ou pentagonal.

3. Tanins

Les tanins sont des substances végétales, les plus souvent hydrosolubles et qui possèdent la capacité de précipiter les protéines, alcaloïdes et polysaccharides à partir de leur solution aqueuse. Ce sont des biopolymères constitutifs de la paroi cellulaire végétale. Disposés dans les vacuoles et les parois cellulaires, ils représentent moins de 1% du poids sec des plantes, mais de 15 à 25 % dans les feuilles, et jusqu'à 40 % dans l'écorce, 50% dans certaines galles. Les deux catégories de tanins distinguées sont, les tanins hydrolysables (gallotannins et ellagitanins) et Les tanins condensés, ces deux types sont d'origines biosynthétiques différentes.

4. Anthocyanes

Pigments naturels des feuilles, des pétales, et des fruits, situés dans les vacuoles des cellules. Solubles dans l'eau, allant du rouge orangé au bleu pourpre dans le spectre visible. Ces composés existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique (aglycone) et d'oses et souvent de groupes acyles. L'aglycone qui les caractérise est un anthocyanidol de la classe des flavonoïdes.

V. Activité Antioxydante

Un antioxydant (AOX) est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols. Les antioxydants sont largement utilisés par l'industrie comme conservateurs pour les aliments, les cosmétiques, ou encore pour préserver le caoutchouc ou l'essence.

1. Méthodes d'étude d'activité des antioxydants

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple :

1.1 Test au DPPH

Le composé chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 5).

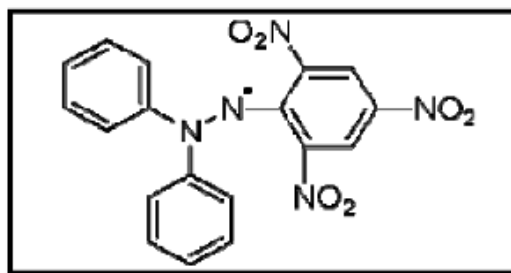


Figure 5: Structure chimique du radical libre DPPH

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par Spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2-Diphenyl 1-picrylhydrazine de couleur jaune (Figure 6).

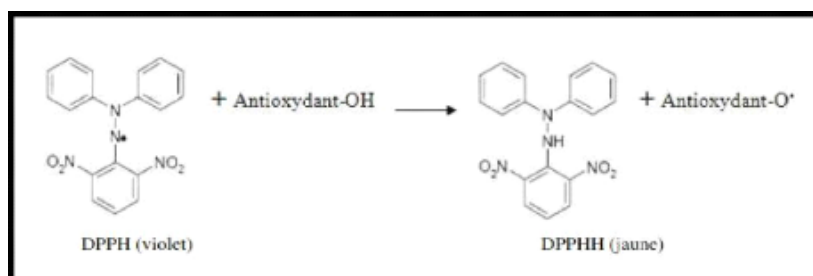


Figure 6 : Réaction de test DPPH

1.2 Capacité antioxydante totale (TAC)

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits des plantes est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide (PRIETO *et al.*, 1999).

1.3 Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par OYAIZ (1986) et BOUGANDOURA (2013). La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (OU *et al.*, 2001) selon la figure 7.

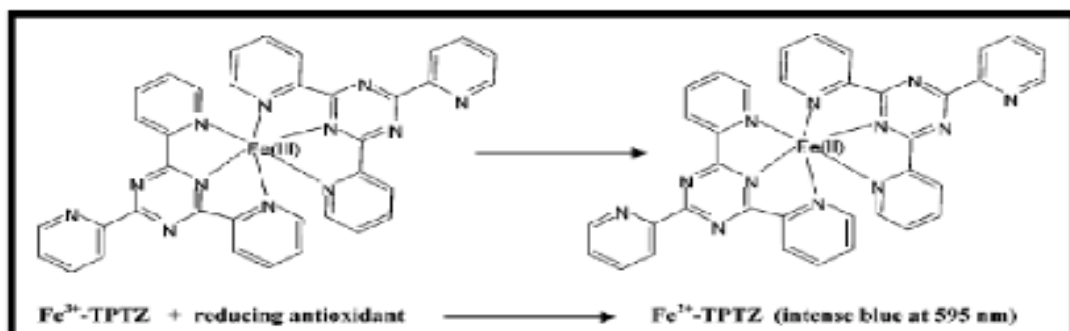


Figure 7 : Schéma sur la réaction de test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

1.4 Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La mesure ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) permet de déterminer si une source organique possède un effet antioxydant en le comparant à un analogue de la vitamine E (le trolox). Dans cet essai, l'AAPH (2.2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride) est utilisé comme source génératrice de radicaux peroxy. L'addition de fluorescéine comme sonde fluorescente permet de quantifier, à l'aide d'une analyse spectrophotométrique, en fonction du temps, la perte de fluorescence associée à la réaction avec les radicaux libres fournis par l'AAPH par un mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène. La présence d'antioxydants empêche ou ralentit la perte de fluorescence qui est calculée par l'aire sous la courbe en fonction du temps. Celle-ci peut être détectée à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 520 nm. Il s'agit donc d'une méthode permettant de mesurer la capacité antioxydante contre les radicaux peroxy (OU et *al.*, 2001).

1.5 Méthode de TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)

Cette méthode est basée sur la protection fournie par les antioxydants sur la décroissance de la fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE) au cours d'une réaction de peroxydation contrôlée. La fluorescence de R-phycoérythrine est désactivée par ABAP (2,2' - azo-bis (2 - amidino- propane) de chlorhydrate en tant que générateur de radicaux. Ce stoppage de la réaction est mesuré en présence d'antioxydants. Le potentiel antioxydant est évalué en mesurant la décroissance de la décoloration selon GHISELLI et *al.* (1995) et NUR ALAM et *al.*, (2013).

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel végétale

Le matériel végétal utilisé pour la présente étude est constitué par la partie aérienne de la plante *Thymus vulgaris* L. provenant de la région de GHAFSAI-TAOUNAT. La plante est récoltée durant le mois de février 2019 (Figure 8).

Par la suite, nous avons nettoyé et séché la plante à 30°C pendant 72 heures dans l'étuve. Puis, elle a été broyée pour obtenir une poudre fine, cette dernière servant pour la préparation des extraits.

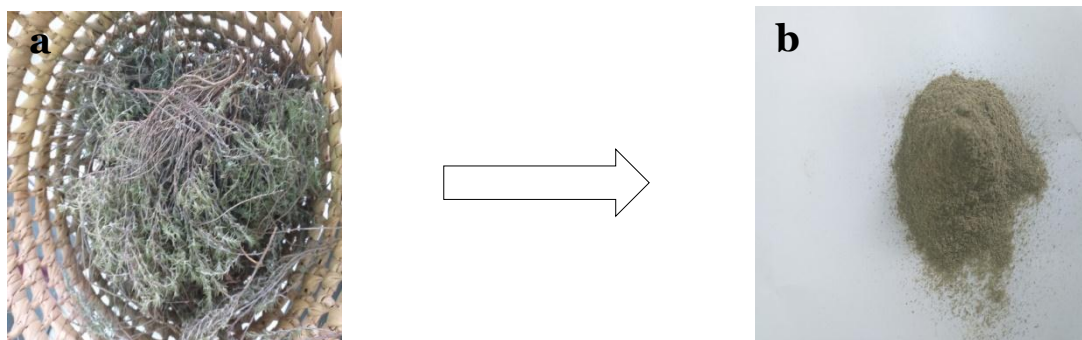


Figure 8 : Plante *Thymus vulgaris* L. (a) : matière sèche, (b) : poudre fine.

II. Préparation des extraits

Trois extraits ont été préparés : Extrait Ethanolique (EE), Extrait Méthanolique (EM), Extrait Aqueux (EA) en utilisant deux techniques d'extraction :

1. Extraction par Macération

L'extraction par macération consiste à placer 10g de la poudre végétale à l'extraction par les différents solvants (EA, EE, EM) avec un rapport 1/10 (P/V), sous agitation douce pendant 18 heures à température ambiante (Figure 9). Les trois extraits sont récupérés après filtration de mélange à l'aide d'un papier filtre, le solvant est éliminé de la filtration par évaporation sous pression réduite, dans un rotavapor à 40°C, puis conservés à 4°C (Figure 10).



Figure 9 : Extraction par Macération



Figure 10 : Elimination des solvants par rotavapor

2. Extraction par ultrasons

Cette technique consiste à placer le mélange (poudre végétal et solvant) avec le même rapport (1/10) au bain d'eau à l'aide d'un sonicateur pendant 20 min. La récupération et la conservation des extraits préparés ont été effectuées par la même méthode citée précédemment (technique de macération).

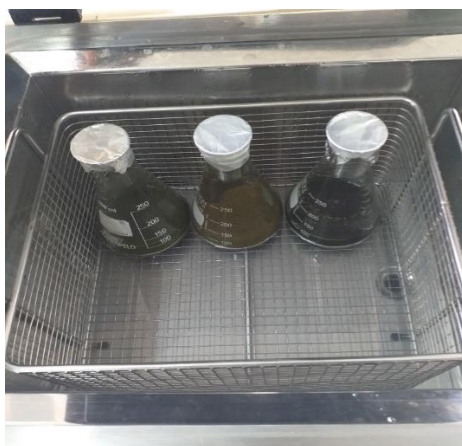


Figure11 : Extraction par Sonication

3. Rendement des extraits

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation (m) sur le poids de la matière végétale sèche (m_s) utilisé pour l'extraction, multipliée par 100 (Bekhechi, 2001).

$$\text{Rendement (\%)} = (m/m_s) * 100$$

III. Dosage des métabolites secondaire

1. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols a été effectué par la méthode de Folin Ciocalteu (wong et *al.*, 2006) qui consiste à mélanger 200 μ l de l'extrait végétal avec 1.5ml de réactif de Folin et 1.5ml de No_2Co_3 (5%). L'ensemble est agité au vortex, puis placé à l'obscurité pendant 2 heures. L'absorbance a été déterminée à 725 nm. La gamme d'étalonnage réalisée par des concentrations de l'acide gallique (0-200 μ g/ml), est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par mg d'extraits.

2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de Trichlorure D'aluminium décrite par (Barros et *al.*, 2011). En effet, 1ml de l'extrait végétal a été mélangé avec 0.3ml de NaNo_2

(5%), après 5 min d'obscurité nous avons ajouté 0.3ml d'Al Cl₃ (10%), puis 2 ml de NaOH (1 M). Le volume total a été complété à 10ml de l'eau distillé. L'absorbance a été mesuré à 510 nm. La concentration du flavonoïde est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercitine (0-35 µg/ml) par mg d'extrait.

IV. Activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de *Thymus vulgaris*, nous avons utilisé deux techniques :

1. Test de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Cette méthode consiste à préparer une solution de DPPH de 0,004%, puis des dilutions de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, à partir d'une solution mère de 10 mg/ml. Après, nous avons prélevé 2 ml de la solution de DPPH mélangé avec 2 ml l'extrait dilué. Les tubes sont agités et incubés à l'obscurité durant 30 min. L'absorbance a été déterminé au spectrophotomètre à 517nm (Kartala et al, 2007).

L'activité anti-radicalaire est déterminée en pourcentage grâce à la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \frac{\text{Abs de témoin} - \text{Abs d'essai}}{\text{Abs de témoin}} \times 100$$

La réalisation de la cinétique de cette activité a permis de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC₅₀). La valeur d'IC₅₀ la plus faible correspond à une activité antioxydant plus importante. Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent BHT par ml.

2. Capacité antioxydante totale (CAT)

Cette méthode consiste à introduire dans un flacon 0,3 ml de chaque extrait avec 3 ml d'un réactif composé de H₂SO₄, NaH₂PO₄ et du molybdate d'ammonium. L'absorbance été mesurée à 695 nm (Prieto et al., 1999). Les résultats obtenus sont exprimés en µg équivalent vitamine C par ml.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Rendements des extraits de *Thymus vulgaris*.

Les résultats obtenus montrent que le rendement des extraits de *Thymus vulgaris* varie en fonction du solvant utilisé (figure 12). En effet, les valeurs du rendement allant de 7.6% à 15.9%, pour la technique de macération et de 14.2% à 16.4% pour la technique de sonication. L'analyse des résultats obtenus montre que l'EE par sonication présente le rendement le plus élevé. Par contre, le rendement le plus faible est enregistré au niveau de l'EA par macération. Des études menées par (Diallo et al. 2004) ont trouvé que l'EA de *Thymus vulgaris* (20.05 %) représente le rendement le plus élevé.

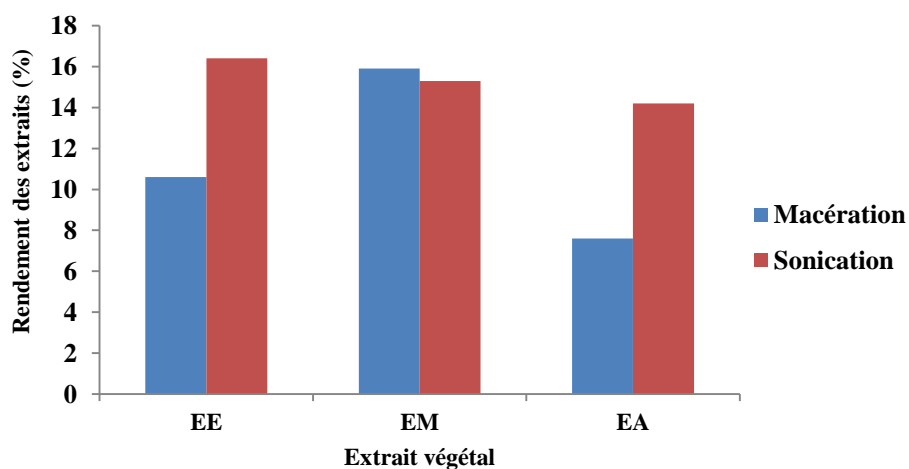


Figure12 : Rendement des différents extraits de *Thymus vulgaris*

II. Dosage des métabolites secondaires

1. Teneur en polyphénols

Les résultats de la teneur en polyphénols sont donnés par la figure 13. En effet, l'EM par macération possède la concentration la plus élevée en polyphénols par rapport aux autres extraits étudiés (138,5 mg/g). Par contre, l'EA par macération présente la teneur la plus faible avec une concentration de 29.25mg/g. L'analyse des résultats obtenus montre aussi que la macération est la meilleure technique d'extraction pour les extraits éthanolique et méthanolique. Tandis que la sonication semble être la meilleure technique d'extraction pour l'EA.

Nos résultats corroborent ceux de Naima et al, (2005) qui ont montré que le solvant le plus efficace pour extraire les polyphénols par la macération à partir de la plante *Thymus vulgaris* est le méthanol (138.5mg/g) suivi par l'éthanol (71.75mg/).

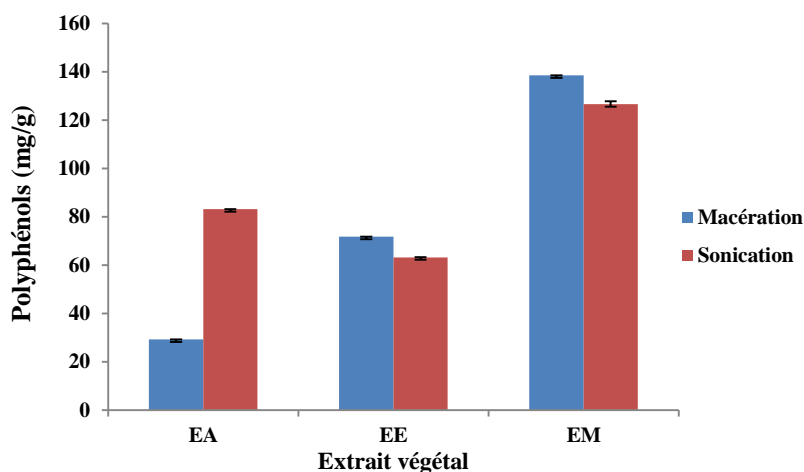


Figure 13 : Teneur en polyphénols des différents extraits de *Thymus vulgaris* (EA, EE, EM)

2. Teneur en flavonoïdes

Les résultats obtenus de la teneur en flavonoïdes en fonction de la nature d'extrait, sont présentés dans la figure 14. L'analyse des résultats montre que l'extraction par macération présente des teneurs plus élevées en flavonoïde pour l'EE et l'EM avec 18.22 mg/g, 31.46 mg/g respectivement. Nous avons pu remarquer aussi que l'EA par sonication, présente une teneur élevée en flavonoïde par rapport à la macération avec une concentration de 21.8 mg/g. L'analyse des résultats nous a permis de souligner que l'EM présente la teneur la plus importante par rapport aux autres extraits étudiés.

Kulišić et al. (2006) ont trouvé une concentration de 7,68 $\mu\text{g/g}$ en flavonoïde au niveau de l'extrait méthanolique de *thymus vulgaris*.

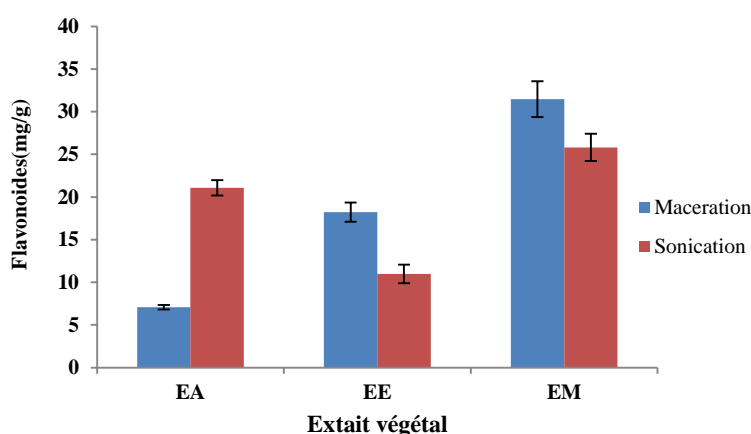


Figure 14 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de *Thymus vulgaris* (EA, EE, EM)

III. Activité antioxydante

1. Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des extraits étudiés exprimée en nombre d'équivalents d'acide ascorbique est présentée dans la figure 15. D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que les extraits par macération, présentent les teneurs les plus élevées par rapport aux extraits par sonication. Nous avons remarqué aussi que l'EM enregistre la concentration la plus élevée (24.92 mg/g). Par contre l'EE présente la concentration la plus faible (17,4 mg/g). Nous avons pu montrer aussi que l'EM ayant une forte capacité antioxydante, de notre plante étudiée, suivi par l'EA, et finalement l'EE.

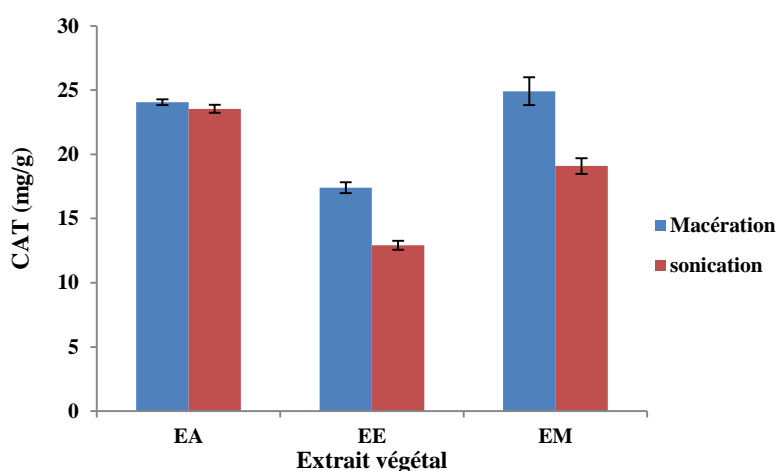


Figure15 : Capacité antioxydante totale des différents extraits de *Thymus vulgaris* (EA, EE, EM)

2. Test de DPPH

Les deux graphes illustrent les résultats du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de la différente concentration par deux techniques d'extraction (Figure16, 17). Les valeurs obtenues, nous ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle, avec la présence d'une phase stationnaire, qui signifie une réduction presque totale du DPPH. D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que le pourcentage d'inhibition du radical libre (DPPH) augmente, avec l'augmentation de la concentration, soit pour le standard BHT ou pour les différents extraits de la plante. Ces extraits possèdent ainsi, une activité anti-radicalaire dose dépendante. L'analyse de ces résultats, a révélé que l'EM présente une activité anti-radicalaire plus élevée avec 97.28 %, au niveau de la solution mère. Par contre la valeur minimale, est enregistrée au niveau de l'extrait aqueux (82.73%). La capacité

antioxydante des différents extraits étudiés a été déterminée à partir de l'IC50 (Tableau 2). D'après nos résultats, la valeur de l'IC50 la plus basse est enregistrée au niveau de l'extrait méthanolique par macération (0,03mg/ml). Par contre l'extrait aqueux par macération enregistre la concentration la plus élevée (2.78 mg/ml). Ceci, nous permet de souligner que l'extrait méthanolique, représente l'extrait le plus actif.

Plusieurs études ont montré l'existence d'une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante (Villano *et al.*, 2007). Nos résultats obtenus lors de la présente étude, confirment cette corrélation positive entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité réductrice de DPPH.

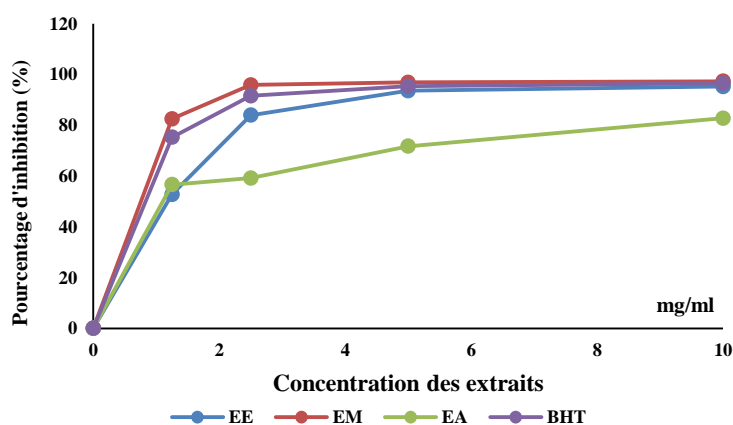


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'antioxydant de référence et des différents extraits testés par la technique de macération.

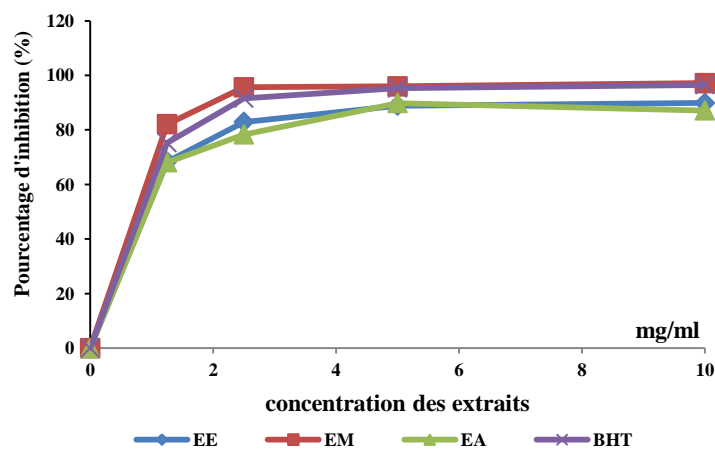


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'antioxydant de référence et des différents extraits testés par la technique de sonication

Tableau 2 : IC50 des différents extraits de *Thymus vulgaris* (EE, EM, EA) et de BHT.

Technique d'extraction	Extraits	IC50 (mg/ml)
	BHT	0,24
Macération	EM	0,03
	EE	1,94
	EA	2,78
Sonication	EM	0,12
	EE	1,19
	EA	1,53

Conclusion

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. L'étude des propriétés antioxydant des extraits de *Thymus vulgaris* nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

L'analyse quantitative de chacun des trois extraits obtenus de *Thymus vulgaris* a mis en évidence la présence des polyphénols et des flavonoïdes abondants dans l'extrait méthanolique, par la technique de la macération. Alors, pour l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux, la teneur reste faible pour la plupart des métabolites secondaires dosés.

En outre, l'espèce de *Thymus vulgaris* montre une activité antioxydante élevée dans l'extrait méthanolique par rapport ou autres extrait.

En fin, l'ensemble des résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir valoriser d'avantage l'espèce *Thymus vulgaris*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amiot J. (2005) *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.
- Balladin D.A; Headley, O. (1999). Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herbes. *Renewable Energy*. 17: 523-531.
- Barros, Custódia, Luísa Moura, L. Miguel Brito & Olívia Matos (2011) "Actividade antimicrobiana de extractos e óleos essenciais de coentro, oregão e poejo, e seu potencial para a protecção das culturas em horticultura biológica" 3º Colóquio Nacional de Horticultura e 1º Colóquio Nacional de Produção Animal Biológica, 22-24 Setembro. Braga
- BOUGANDOURA N., BENDIMERAD N., 2013. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*. (9): 15p.
- C. Bekhechi-benhabib. (2001). Analyse d'huile essentielle d'*Ammodendron verticillata* (Nûnkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K. and Maiza, A. 2004. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, 7: 1073- 1080.
- Fennane M. Flore pratique du Maroc Manuel de détermination des plantes vasculaires, volume 2, Angiospermae ; Institut scientifique, université Mohammed V, Agdal, Rabat . 2007: 53.
- Ghiselli et al., (1995); Badarinath et al., (2010) ; Niki, (1990); Tan & Lim, (2015) the TRAP assay the lag-phase induced by the sample is compared with that induced by Trolox.
- J. El-Hilaly, Hmammouchi. M, Lyoussi. B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco); *Journal of Ethnopharmacology*. 86,149–158.
- J. Lambinon, F. Verloove et Ivan Hoste – La sixième édition de la Nouvelle Flore de la Belgique et des Régions voisines
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, et al. (2007) Investigation of the antioxidant properties

of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem* 100: 584–589.

- Kulšić T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. (2006) Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (4) : 485-492
- L.Lagnika. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises.
- Majinda R.R.T., Abegaz B.M., Bezabih M. et autres (2001) Resent resultants from naturel productrescarch at the university of Botswana, *Pure. Appl. Chem.* 73 (7) : 1197-1208.
- NUR ALAM M., BRISTI N., RAFIQUZZAMAN M., 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. (21) :145-149.
- OU B., HAMPSCH-WOODILL M., PRIOR R L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (49): 4619-4626.
- Oyaiz M (1986).Introduction à la microbiologie ans les pays chauds.p80.
- Pibiri M.C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse no 3311, Ecole polytechnique fédérale de lausanne.
- PRIETO P., PINEDA M., AGUILAR M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* (269): 337-341.
- Stookey L. L. (1970). Ferrozine- A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry.* 42(7): 779-781.
- TINE-DJEBBAR Fouzia. Composition chimique et Activité biologique du Faux poivrier, *Schinus molle* L.1753 (Sapindales: Anacardiaceae)..
- Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, GarciaParilla MC (2007) Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230–235 12.
- Wong, T. T., et Chan, W.K. (2006). Internet-based marine maintenance information system. In M. Khosrow-Pour (Ed.), *Encyclopedia of e-commerce.e-government, and mobile commerce* (pp. 684-690).Hershey. PA : Iden Group Reference.