

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE D'UNE LABIEE : *Thymus hirtus*

Reçu le 15/10/2008 – Accepté le 20/05/2009

Résumé

Dans le cadre de notre étude des plantes médicinales, nous avons réalisé une étude phytochimique et biologique de la plante *Thymus hirtus*.

L'étude consiste à évaluer l'activité antibactérienne du contenu flavonique extrait à partir des feuilles et affronté par divers solvants organiques (Ether diéthylique, Acétate diéthyle et n- butanol) sur le développement de différentes souches bactériennes (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Proteus vulgaris*).

Nos résultats indiquent que le contenu flavonique des phases acétate et n- butanol présente une meilleure activité antibactérienne comparativement à celui de la phase ether diéthylique. Par ailleurs, l'analyse par chromatographie (CCM) des trois extraits de la plante a montré leur richesse en composés flavoniques, suggérant ainsi la présence d'une corrélation entre l'activité antibactérienne et le contenu flavonique de la plante.

Mots clés : *Thymus hirtus*, Flavonoïdes, Extraction, CCM, Activité Antibactérienne.

Abstract

Within the framework of our research of medicinal plants, a phytochemical and biological study of *Thymus hirtus* has been achieved. The study consist of evaluating the antibacterial activity of the flavonic content extracted from leaves and treated by many organic solvents (diethylic ether, ethyl acetate and n- butanol) on the development of different bacterial colonies (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Proteus vulgaris*).

The present results indicate that flavonic content of the two stages acetate and n- butanol shows a better antibacterial activity compared with the one of diethylic ether.

Moreover, the analysis of the three extracts of the plant via thin layer chromatography (TLC) has shown their richness of flavonic content suggesting the presence of a relationship between the antibacterial activity and the flavonic content of the plant.

Keys words : *Thymus hirtus*, flavonoids, extraction, Thin layer chromatography (TLC), antibacterial activity.

S. TREKI AMINA¹
R. MERGHEM¹
L. DEHIMAT²

¹Laboratoire de Biochimie Micromoléculaire. Département de Biochimie et Microbiologie. Facultés des Sciences. Université Mentouri Constantine. Algérie

²Laboratoire de Mycologie appliquée. Département de Biochimie et Microbiologie. Faculté des Sciences. Université Mentouri Constantine

ملخص

في إطار بحثنا الخاص بالنباتات الطبية، تمت دراسة فيتو كيميائية و بيولوجية لنبته *Thymus hirtus* اعتمدت الدراسة على تقييم النشاط ضد البكتيري للمحتوى الفلافوني المستخلص من الأوراق و المعالج بمختلف المذيبات العضوية (اثير ديثيليك - أسيتات ديثيل و البيتانول) على نمو السلالات البكتيرية المختلفة (*Bacillus amyloliquefaciens* ، *Staphylococcus sp*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas sp* ، *Proteus vulgaris*). تدلي النتائج المتحصل عليها بان المحتوى الفلافوني للمراحل أسيتات ديثيل و البيتانول ، تبين نشاط ضد بكتيري أفضل مقارنة بنظيره المتمثل في مرحلة اثير ديثيليك . إضافة إلى ذلك أدلى تحليل المستخلصات الثلاثة للنبته عن طريق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة بغناهم بالمركبات الفلافونية مما يؤكد وجود علاقة وطيدة بين النشاط ضد البكتيري و المحتوى الفلافوني للنبته. **الكلمات المفتاحية :** *Thymus hirtus* - الفلافونيدات - الاستخلاص - كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة - النشاط ضد البكتيري.

Parmi les plantes médicinales et condimentaires spontanées appartenant à la famille des labiées qui est très présente en Algérie, nous avons choisi comme support d'étude le Thym : *Thymus hirtus*. Il représente l'un des remèdes populaires les plus utiles dans les traitements des affections respiratoires (rhumes, grippe, angines) et des troubles gastriques (dyspepsies, crampes, flatuosités) [2,4].

On lui reconnaît des propriétés antiseptiques, antispasmodiques [6,9], digestives et antifongiques. Souvent cultivé comme plante aromatique, il est aussi exploité par la parfumerie et l'industrie pharmaceutique [3]. 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.

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales récentes sur l'homme et l'animal suggèrent que les composés flavoniques très abondants dans les plantes médicinales et alimentaires pourraient jouer un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires et des cancers, vu leurs pouvoir anti oxydants puissants et leurs capacité d'activer les mécanismes naturels de défense anti cancéreuse [8,11].

L'objet de ce travail est d'évaluer l'activité du contenu flavonique de *Thymus hirtus* sur le développement des bactéries (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Proteus vulgaris*).

MATERIELS ET METHODES

Matériels

La plante étudiée, *Thymus hirtus* communément appelée (Z'hitra) est une espèce commune cultivée dans les jardins du Tell. Elle appartient à la famille des labiées [2].

Les feuilles de la plante, en période de floraison, ont été cueillies durant le mois d'Avril dans la région de Ain Smara (Djebel chetaba) à 10 km de Constantine.

Les souches testées (tableau 1) proviennent du laboratoire de la clinique du rein (Constantine) et du laboratoire de microbiologie du département des sciences de la nature et de la vie Université Mentouri Constantine.

Méthodes

Extraction des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont extraits du matériel végétal, feuilles séchées et broyées par macération dans un mélange ethanol-eau (50/50 : v/v) [10].

Cette opération est renouvelée trois fois toutes les 24 heures. Après évaporation à sec sous pression réduite (ROTAVAP : BUCHI) des macérations hydro alcooliques, le résidu sec est repris dans de l'eau distillée bouillante qui solubilise quantitativement les flavonoïdes .

Tableau 1 : Souches bactériennes testées

Famille	Souches	Gram
Micrococcaceae	<i>Staphylococcus sp.</i>	+
Bacillaceae	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	+
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>	-
	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas sp.</i>	-

Une décantation à froid (12 heures) est réalisée, le contenu flavonique global est partitionné en phases par divers solvants organiques spécifiques : Phase éther diéthylique, phase acétate d'éthyle, phase n- butanol.

Après évaporation à sec des phases ether, acétate et n- butanol les extraits collectés sont soumis à deux traitements différents :

- Une partie de l'extrait est reprise avec du méthanol pour le diagnostic sur CC M analytique.
- L'autre partie du même extrait est lavée trois fois avec de l'eau distillée puis conservée à 4°C à l'obscurité pour les tests microbiologiques.

Chromatographie analytique sur couches minces (CCM)

Les extraits flavoniques de *Thymus hirtus* sont soumis à une chromatographie analytique sur couches minces de polyamide DC6 (Macherey Na gel, 516 Duren) Sur des plaques en verres (20x20 cm). Les systèmes solvants utilisés sont :

-phase ether diéthylique : Toluène : EP : MEC : MEOH (6/1/1/1) x 2.

-phase acétate d'Ethyle : Toluène : ETOH : MEOH (4/3/3).

- phase n- butanol : Toluène : ETOH : MEOH (4/3/3).

Les chromatogrammes obtenus sont visualisés sous lumière ultraviolette (lumière de wood, 366 nm) à l'obscurité .

Dosage flavonique

Le dosage flavonique est réalisé selon la méthode au bleu de Prusse [13], sur une aliquote de chaque phase : ether, acétate, et n- butanol. L'évaluation quantitative approximative des flavonoïdes (mg/g) est donnée par la formule :

$$T^{\circ/\infty} = \frac{D \times C \times V}{1000 \times P}$$

D : facteur de dilution

C : concentration qui est évaluée selon la courbe d'étalonnage figure 1

V : volume de l'extrait global

P : poids de la matière sèche

L'absorbance est mesurée à 725 nm puis soustraite de la valeur du blanc (H₂O + Réactif) dosé après le même temps.

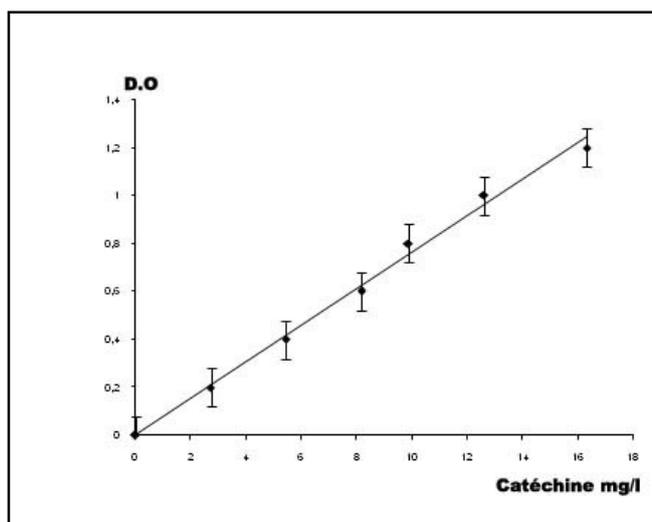


Figure 1 : Courbe d'étalonnage avec le bleu de Prusse

L'évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne est effectuée selon la méthode de diffusion en milieu gélosés [5].

Des disques de papier Wathman stériles (5 mm de diamètre) sont imprégnés de 0,5 ml de chaque dilution (1/2, 1/4, 1/8) de l'extrait flavonique. Ces mêmes disques sont appliqués sur la surface du milieu gélosé Mueller Hinton [5]. Après incubation 18 heures à 37°C, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque de l'extrait flavonique.

Traitement des données : Analyse statistique

Les données ont été exploitées selon l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés. Le logiciel utilisé pour ces analyses statistiques est STATITCF (version 4- copyright – 1987-1988).

RESULTATS ET DISCUSSION

Extraction : La Chromatographie analytique sur couches minces (CCM) nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques de nos extraits de la plante des différentes phases (Figure 2).

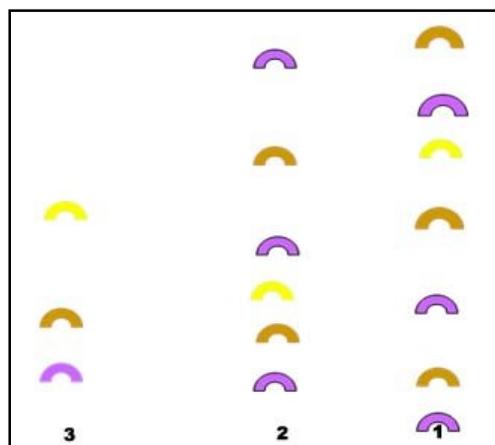


Figure2 : Chromatographie analytique sur couches minces des extraits flavoniques.

Un premier diagnostic nous révèle que la phase éther diéthylique d'une part, les phases acétate d'éthyle et n-butanol d'autre part, obtenues successivement n'ont pas la même composition.

Du point de vue flavonique, les phases éther et acétate apparaissent plus homogènes, plus pures et plus riches. Cependant, la phase n-butanol nous montre quelques composés spécifiques et entraîne beaucoup d'impuretés.

Dosage flavonique

Il ressort des différentes valeurs (tableau 2) que les phases éther et acétate contrairement à la phase n-butanol, sont plus riches en flavonoïdes.

Tableau 2 : Données quantitatives des flavonoïdes

Solvants	Poids de l'extrait sec (mg)	Flavonoïdes dosés (mg/g)
Ether diéthylique	64	1,05±0
Acétate d'éthyle	655	1,8 ±0,12
n-butanol	4857	0,49±0,04

L'évaluation de l'activité antibactérienne

D'une manière générale, le contenu flavonique des trois phases, éther, acétate et n-butanol présente une activité antibactérienne ce qui est en accord avec les résultats de Aumento Rubia et al [1]. Cependant, le contenu flavonique des phases acétate (AT) et n-butanol (BT) démontre une meilleure activité (tableaux 3 et 4) comparativement à celui de la phase éther.

Tableau 3 : Phase acétate d'éthyle

Souches	Concentration (mg/ml)			
	AT	AT1/2	AT1/4	AT1/8
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	16	19,5	17,5	11,25
<i>Staphylococcus sp</i>	15	11,5	10,25	9,25
<i>Escherichia coli</i>	10,5	11	11,5	7,25
<i>Pseudomonas sp</i>	15,5	14,5	10	11,25
<i>Proteus vulgaris</i>	13,5	09	11	10

Parmi les souches gram-positives *Bacillus amyloliquefaciens*, est la plus sensible AT4 = 17,5 mm, comparativement à *staphylococcus sp* au contenus des phases acétate et n-butanol de la plante *Thymus hirtus*. Par ailleurs, *Pseudomonas sp* présente une inhibition marquée par rapport à toutes les bactéries gram-négative vis-à-vis du contenu flavonique de la phase Acetate AT = 15,5 mm (Figure 3). Alors que l'extrait flavonique de la phase n-butanol est actif sur les trois souches gram-négatives.

Tableau 4 : Phase n-butanol

Souches	Concentration (mg/ml)			
	BT	BT1/2	BT1/4	BT1/8
<i>Bacillus amyloalcafiens</i>	12,5	17,25	12,25	12,5
<i>Staphylococcus sp</i>	14	12	10,5	14
<i>Escherichia coli</i>	11,5	14	11,75	08
<i>Pseudomonas sp</i>	12	14,75	10,75	09
<i>Proteus vulgaris</i>	14	9,5	10,5	11

Il apparait également que les souches bactériennes étudiées sont plus sensibles au contenu flavonique de la phase n-butanol qui donne globalement des zones d'inhibition plus importantes (Figure 4). Ceci est probablement dû à sa forte teneur en molécules glycosylées. D'autres part l'activité anti bactérienne est dans l'ensemble influencée par le teneur en composés flavoniques [14].

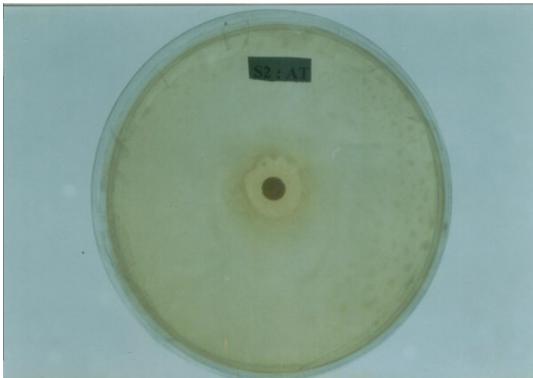


Figure 3 : Effet inhibiteur de l'extrait flavonique (Phase acétate) sur *Pseudomonas sp*

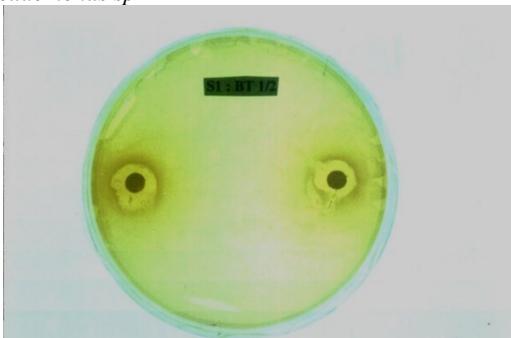


Figure 4 : Effet inhibiteur de l'extrait flavonique (Phase n-butanol) sur *E. coli*

Par ailleurs, l'interprétation de nos résultats par l'analyse en composantes principales (ACP) (figure 5)

démontre que le comportement des souches tests change en fonction des phases (graphique 1), c'est-à-dire que les souches se comportent différemment par rapport à l'effet inhibiteur du contenu flavonique des phases.

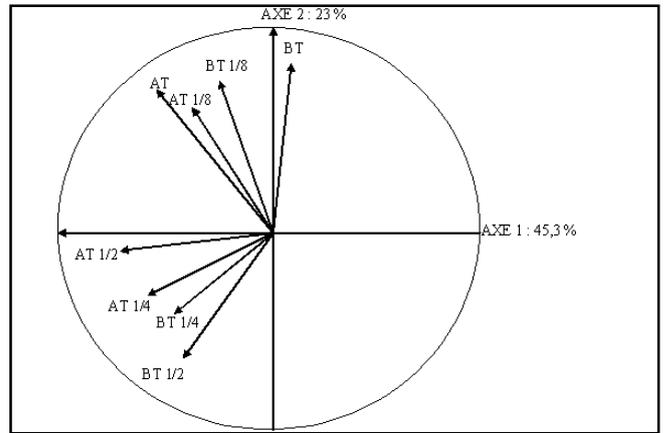


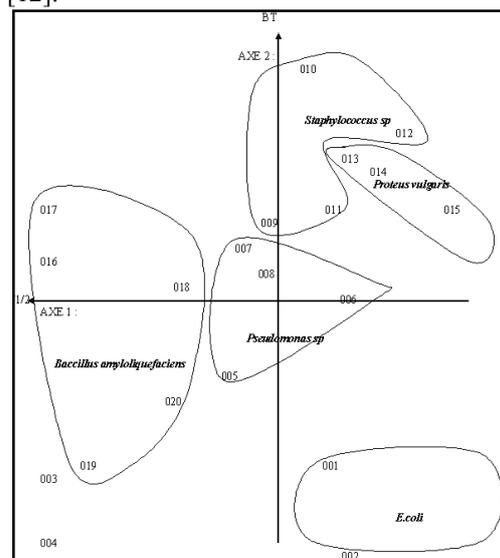
Figure 5 : Cercle des corrélations

L'analyse de variance (tableau 5) nous a permis de confirmer l'existence d'une interaction réelle entre les souches et les phases.

Tableau 5 : Interaction souches/ phases (Test ANOVA)

	ddl	Test F	F _t α = 5%	p
Facteur 1	1	0,26	4,17	0,6181
Facteur 2	4	8,40	2,69	0,0001
Interaction fx.f2	4	12,57	2,69	0,000

Cette activité anti bactérienne des extraits flavoniques est essentiellement liée à leur structure chimique. Les flavonoïdes en raison de leur richesse en groupes phénoliques sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques [12].



Graphique 1 : Corrélation souches-phases

Ces données théorique confirment nos résultats expérimentaux du fait que les phases acétate et n-butanol de

la plante contiennent des flavones et flavonols. A partir de ces derniers sont synthétisés chez la plante différents flavonoïdes tels la lutéoline, la chrysoériorol, la quercétine, et le kaempférol dont les propriétés sont multiples [15]. Cela confirme la relation étroite qui existe entre la structure des flavonoïdes et l'activité antibactérienne [5, 7].

CONCLUSION

A travers ce travail, nous avons développé une méthode simple et rapide qui permet d'estimer l'activité antibactérienne des composés phénoliques.

L'analyse phytochimique par chromatographie sur couches minces (CCM) nous a permis tout d'abord d'avoir des empreintes flavoniques et de constater que les différentes phases : ether, acétate et n- butanol, obtenues successivement de notre extrait de feuille de la plante, n'ont pas la même composition.

La plante *Thymus hirtus* démontre une importante activité antibactérienne variant en fonction du contenu flavonique de chaque phase et des souches tests.

Suite à ces résultats, il conviendrait de faire des études plus poussées en utilisant des techniques de pointes tels que (HPLC, RMN ...) pour l'identification des structures de nos composés, également de relier la structure flavonique à l'activité antibactérienne de notre plante.

REFERENCES

- [1]- Aumento Rubia M., Ayuso D. et Gonzalez M. J., Garcia., Jimenz M.D. Toro Sainz M.V. "Les flavonoïdes isolés d'*Erica Andevalensis cabezuderiberi*, Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'espèce", Plantes médicinales et phytothérapie n° 02, (1988), pp.113-118.
- [2]- Baba Aissa F., "Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb", Librairie moderne (ed.), Rouiba, (1999), pp.235-236, 277-278.
- [3]- Baba Aissa F., "Les plantes médicinales en Algérie", Coédition Bouchène et Ad. Diwan.", (1991).
- [4]- Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M et Tork M., Troitin F., "Plantes médicinales des régions tempérées" 2^{ème} édition Maloine., (1990), pp. 88.
- [5]- Bijondi D., Cianci P., Geraci C et Ruberto G., "Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants", Flavour and fragrance journal, Vol 8, (1993), pp 331-377.
- [6]- Iserin P., "Encyclopédie des plantes médicinales" Larousse-Bordas (ed.), (1997).
- [7]- Jiménez M et Garcia- Carmona F., "Myricetin, an antioxidant flavonol is a substrate of polyphenol oxidase. J.Sci. Food Agric, N°79", (1999), pp 1993-2000
- [8]- Johnson I., "Antioxydants et anticancéreux", biofuture N° 186, (1999) pp 14-15,17.
- [9]- Mahmoudi y. "La thérapeutique par les plantes communes en Algérie". Palais du livre. Blida. (1991). pp 99
- [10]- Merghem R., "Etude du Polymorphisme génétique à l'aide de marqueurs biochimique chez une plante d'intérêt économique *Thymus*", These de Magister, Institut de Biologie, (1985).
- [11]- Nicoli M.C., Anese M et Parpinel M., "Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables" J, Sci, food techn., N° 10 (1999), pp 94-100.
- [12]- Ozawa T., Lilley TH, et Haslam E., "Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit", Photochemistry, Vol.26.n° 11. (1987)., pp.2937-2942
- [13]- Price M.L. et Butler L.G., "Rapid visual and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, J Agric. Food chem., N°25. (1977)., pp 1268-1273.
- [14]- Rees S.B et Harborne J.B., "The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant.", Phytochem., N°24., (1985)., pp.2225-2231.
- [15]- Weidenborner M et Jha H.C., «Antifungal activity of flavonoids and their mixtures against different fungi occurring on grain". Pestic Sci N°38, (1994), pp 347-351.