



N° d'Ordre : 63/2020

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale

Laboratoire : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

AOUAM IMANE

Phytochimie et activités biologiques des huiles essentielles et des extraits non volatils du Thym marocain

Soutenue le 25 /11/2020 devant le jury composé de :

Pr. Benyahya Mohammed	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	Président
Pr. Filali-Zegzouti Younes	Faculté des Sciences, Meknès	Rapporteur
Pr. Ainane Tarik	Ecole Supérieure de Technologie, Khénifra	Rapporteur
Pr. Gourch Abdelkader	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	Rapporteur
Pr. Meliani Abdeslam	Faculté des Sciences et Techniques, Fès	Examineur
Pr. Taleb Mustapha	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	Examineur
Pr. Abdellaoui Abdelfattah	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès	Directeur de thèse

Dédicace

A ma chère mère, affable, honorable, aimable: vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Votre prière et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Vous avez fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. En ce jour, j'espère réaliser l'un de vos rêves, et j'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation. Que dieu vous garde et procure santé, bonheur, et longue vie.

A ma chère grand-mère, à celle que j'aime le plus au monde, A celle qui m'a tout donné sans compter. Vous m'avez été pour moi tout au long de mes études le plus grand symbole d'amour, de dévouement qui n'ont ni cessé ni diminué. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, je vous dédie ce travail et que dieu vous garde et procure santé et longue vie.

A mes chers frères Adnane, Med amine et yassine, mes anges gardiens vous m'avez toujours soutenu dans les moments difficiles. Votre affection n'a d'égale que votre gentillesse. Avec mon grand amour, je vous dédie ce travail en vous souhaitant beaucoup de bonheur et un avenir plein de succès.

A mon cher époux Badre, mon fidèle accompagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Votre encouragement, soutien et amour me sont très chers. Merci pour le bonheur que vous m'apporter.

A mes adorables filles yasmina et Nouha, qui me font oublier tous mes soucis par leurs beaux sourires et leurs belles surprises sucrées. Que dieu vous garde et procure santé, bonheur, et un avenir plein de succès et que vous demeuriez le flambeau illuminant ma vie.

A tous les membres de ma famille, petits et grands, Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mes amis (es) et ceux qui me sont chers Yassine, Fatima et amal, en témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Remerciement

Je remercie Dieu de m'avoir donné le courage et la patience à réaliser ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur **Abdellaoui Abdelfattah**, Directeur de ma thèse d'avoir accepté de diriger ce travail. J'ai eu le plus grand plaisir à travailler sous votre direction. Vous m'avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. Vos encouragements inlassables, votre amabilité et votre gentillesse méritent toute admiration. C'est grâce à vos suggestions, remarques et critiques que ce travail a pu être effectué et sans vous ce travail ne pourra avoir lieu. Merci de m'avoir accordé votre confiance durant toutes ses années. Veuillez trouver ici cher professeur toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

Je remercie également le Professeur **Benyahya mohammed**, de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.

Avec gratitude et sincérité, je voudrais remercier Monsieur le Professeur **Filali Zegzouti younes**, Professeur **Ainane Tarik** et Professeur **Gourch Abdelkader** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous prierais de trouver ici l'expression de ma très haute considération.

Mes vifs remerciements s'adressent également aux examinateurs de cette thèse Monsieur le professeur **Meliani Abdeslam** et Monsieur le Professeur **Taleb mustapha** pour avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner ces travaux de recherche. Toute gratitude chers Professeurs.

Messieurs les membres de jurys je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant avec spontanéité de juger mon modeste travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme **Bouchra Oumokhtar**, professeur chercheur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, qui nous a aimablement fourni des souches de bactéries nosocomiales contractées dans les services de réanimation au CHU de Fès.

Je remercie très sincèrement mon collègue **Yassine El Atki**, ton soutien moral, ton bonne humeur et ton aide précieuse ont rendu ce travail plus facile et agréable. Je te souhaite une bonne continuation.

Je remercie vivement mes collègues **Fatima El kamari** et **Amal Taroq**, je vous remercie pour votre esprit d'équipe, votre humour et divertissement. Je vous souhaite une bonne continuation.

En fin, pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, veuillez trouver l'expression de mes sentiments et de ma reconnaissance.

Résumé

Les plantes médicinales représentent une des sources de médicaments pour environ 80 % des populations africaines. La présente étude, s'intéresse à la valorisation de trois plantes aromatiques et médicinales *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus L.* qui peuvent être susceptibles d'être exploitées dans les domaines médicaux et industriels.

Les huiles essentielles du *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L.*, ont été extraites par hydrodistillation et analysées par CPG-SM. Les résultats de la composition chimique de l'huile essentielle du *T. riatarum* a révélé que les composés majoritaires sont le thymol, le borneol et l' α -phellandrene. Concernant les composés dominants dans l'huile essentielle du *T. blecherianus*, on note le carvacrol, le bornyl acetate et borneol. Les principaux constituants des huiles essentielles du *T. citriodorus L.* sont terpinyl formate, geraniol, isogeraniol, cubenol, citronellyl tiglate, thymol, pulegone et le caryophyllene oxide. Les huiles essentielles des trois plantes étudiées possèdent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des souches bactériennes étudiées (*E. coli*, *K. Pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. koseri* et *Acinetobacter*) connues comme responsables des infections nosocomiales au Centre Hospitalier Universitaire de Fès Maroc. Elles sont dotées aussi de propriétés antioxydantes intéressantes.

Le criblage phytochimique des extraits non volatils des trois plantes étudiées montrent la présence des tanins, flavonoïdes, polyphénols, terpènes et stérols. Le dosage des polyphénols, flavonoïdes pour les extraits des feuilles du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L.* montre que ces derniers sont riches en composés phénoliques. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits réalisés par trois méthodes : la capacité de piégeage du radical libre (DPPH), le pouvoir chélateur du fer (FRAP) et la capacité antioxydante totale (CAT) montrent que les extraits des plantes étudiées sont doués d'un pouvoir antioxydant très important. Ce pouvoir varie selon le type du solvant utilisé, et selon la plante étudiée.

L'activité hépatoprotectrice est menée *in vivo* sur des rats *Wistar albinos*. Les extraits aqueux ont révélé une hépatoprotection significative objectivée par une réduction notable des marqueurs biochimiques enzymatiques notamment les transaminases (ASAT et ALAT), la phosphatase alcaline (PAL) et la bilirubine totale. L'extrait aqueux du *T. riatarum* est plus puissant que les deux autres extraits.

Mots clés : *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus*, *Thymus citriodorus L.*, huile essentielle, activité antibactérienne, activité antioxydante, activité hépatoprotectrice.

Abstract

Medicinal plants represent one of natural source of drugs for nearly 80 % of African populations. The present study is interested in the valorization of three aromatic and medicinal plants *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* and *Thymus citriodorus L.* which can be likely to be exploited in the medical and industrial fields.

The essential oils of *T. riatarum*, *T. blecherianus* and *T. citriodorus L.*, were extracted by hydrodistillation and analyzed by CPG-SM. The results of the chemical composition of the essential oil of *T. riatarum* revealed that the major compounds are thymol, borneol and α -phellandrene. The dominant compounds in the essential oil of *T. blecherianus* are carvacrol, bornyl acetate and borneol. The main constituents of essential oils of *T. citriodorus L.* are terpinyl formate, geraniol, isogeraniol, cubenol, citronellyl tiglate, thymol, polégone and caryophyllene oxide. The essential oils of the three plants studied have remarkable antibacterial activity against resistant bacterial strains studied (*E. coli*, *K. Pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. koseri* and *Acinetobacter*) responsible for nosocomial infections at the University Center Hospital of Fes Morocco, and are also interesting antioxidant properties.

The phytochemical screening of the non-volatile extracts of the three plants studied shows the presence of tannins, flavonoids, polyphenols, terpenes and sterols. The extracts of *T. riatarum*, *blecherianus* and *citriodorus L.* revealed the richness in phenolic compounds. The evaluation of the antioxidant activity *in vitro* of the extracts produced by three methods: the scavenging capacity of the free radical (DPPH), the chelating power of iron (FRAP) and the total antioxidant capacity (CAT) show that the extracts of the plants studied have a very important antioxidant power. This power depends to the type of solvent or the plant studied.

Hepatoprotective activity is carried out *in vivo* in albino Wistar rats. The aqueous extracts revealed a significant hepatoprotection by a notable reduction of the enzymatic biochemical markers in particular the transaminases (ASAT and ALAT), the alkaline phosphatase (PAL) and the total bilirubin. The aqueous extract of *T. riatarum* is more potent than the other two extracts.

Key words: *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus*, *Thymus citriodorus L.*, essential oil, antibacterial activity, antioxidant activity, hepatoprotective activity.

Liste des publications

1. **Imane Aouam**, Yassine El Atki, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Bouchra Oumokhtar, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Thymus citriodorus* L. growing wild in Morocco: Preventive Approach against Nosocomial Infections. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2018; 51(1): 72-75.
2. **Imane Aouam**, Yassine El Atki, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Various Extracts of *Thymus Riatarum* from Morocco. *Journal of pharmaceutical sciences and research* 2018 ; 10 (11) :2689-2692.
3. **Imane Aouam**, Yassine El Atki, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical Composition, Antimicrobial, and Antioxidant Activities Of Two Moroccan *Thymus* Essential Oils. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 2019; 12(1): 447-451
4. **Imane Aouam**, Yassine El Atki, Mustapha Taleb, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of *Thymus riatarum*. *Materials Today: Proceedings* 2019; 579-586.
5. Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Kaotar Nayme, Mohammed Timinouni, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2019 ; 10(2) : 63-7.
6. Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Badiia Lyoussi, Bouchra Oumokhtar, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. *Arabian Journal of Chemistry* 2019.
7. Yassine El atki, **Imane Aouam**, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activity of two wild *Teucrium* species from Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2019; 10(6): 2723-2729.
8. Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Badiia Lyoussi, Mustapha Taleb, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. *Materials Today : Proceedings* 2019 : 777-783.

9. Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Fatima El kamari, Amal Taroq, Abdelkader Gouch, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection bacteria. *Journal of pharmaceutical sciences and research* 2019; 11(2): 306-309.
10. Fatima El Kamari, Amal Taroq, Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. *Cymbopogon Nardus L.* Essential Oil: Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2018 ; 50(1) : 14-17.
11. Fatima El Kamari, Amal Taroq, Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical composition of essential oils from *Vitex agnus-castus l.* growing in Morocco and its *in vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2018; 11(10): 365-368.
12. Fatima El Kamari, Amal Taroq, Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenols content, flavonoid concentration and antioxidant activities of leaves extracts of *Vitex agnus-castus l.* Growing wild in Morocco. *International journal of pharmaceutical sciences and research.* 2019 ; 10(4) : 1670-1676.
13. Amal Taroq, Fatima El Kamari, Bouchra Oumokhtar, **Imane Aouam**, Yassine El Atki, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical Screening of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* and Antibacterial Activity against Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2018 ; 48(1) : 58-61.
14. Amal Taroq, Fatima El Kamari, Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activities and total phenolic and flavonoid content variations of leaf extracts of *Laurus nobilis L.* from Morocco. *Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research.* 2018 ; 11(12) :540-543.
15. Amal Taroq, Fatima El Kamari, Yassine El Atki, **Imane Aouam**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical screening, polyphenols content and a novel source of antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *International journal of pharmaceutical sciences and research* 2019 ; 10(8) : 3770-3776.

Liste des communications orales

- 1. I. Aouam**, Y. El Atki, F. El kamari, A. Taroq, B. Lyoussi, A. Abdellaoui « Etude de la composition chimique et effet antibactérienn de l'huile essentielle de la plante *Salvia Officinalis* » 5^{ème} Edition Internationale des Journées Jeunes Chercheurs De Chimie Thérapeutique 2016: Place de la phytothérapie et la chimie médicinale dans le processus de DRUG DISCOVERY, Faculté polydisciplinaire de Taza; 28 et 29 novembre, 2016.
- 2. I. Aouam**, Y. El Atki, A. Taroq, F. El kamari, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, « Etude phytochimique, activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle du *Thymus blecherianus* sur quelques entérobactéries pathogènes », Première journée scientifiques dédiée aux doctorants sous le thème : Biotechnologie, Ecologie et Valorisation des Phyto-ressources à la Faculté des sciences Dhar El Mahraz, 25 Décembre 2017.
- 3. I. Aouam**, Y. El Atki, A. Taroq, F. El kamari, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, « Total phenoic and flavonoid contents and antioxidant capacities of *Thymus riatarum* from Morroco », 1^{er} Congrès arabe des plantes médicinales et aromatiques à Faculté des sciences et techniques Fès; les18 et 19 octobre 2017.
- 4. I. Aouam**, Y. El Atki, A. Taroq, F. El kamari, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, « Antioxidant capacities and total phenolic contents of *Thymus riatarum* from Morroco », International Conference on Materials & Environmental Science à Hotel Melia, Essaidia; 26- 28 Avril, 2018.
- 5. I. Aouam**, Y. El Atki, A. Taroq, F. El kamari, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, « Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from *Thymus blecherianus* from Morroco », The second Arab Conference of Medicinal and Aromatic Plants; Ain Sokhna, Egypte; les 26 et 27 Novembre 2018.

Liste des communications affichées

- 1. I. Aouam;** Y. El Atki; F. Kamari; A.Taroq; B. Lyoussi ; A. Abdellaoui « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux plantes (*foeniculum vulgare* et *salvia officinalis*)», Journées Scientifiques « Outils d'Innovation pour la Valorisation des Systèmes Hétérocycliques et des Plantes Médicinales et Aromatiques » à la Faculté des sciences Dhar El Mahraz - Fès les 5-6 juin 2015.
- 2. I. Aouam;** Y. El Atki; F. Kamari; A.Taroq; B. Lyoussi ; A. Abdellaoui « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Thymus Citriodorus* de la région de Taza », Journées d'études sur les Ressources Naturelle dans la Province de Taza, 16-17 et 18 Novembre 2015- Taza.
- 3. I. Aouam;** Y. El Atki; F. Kamari; A.Taroq; B. Lyoussi ; A. Abdellaoui « Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Thymus Blecherianus* de la région de Taza », Journées d'études sur les Ressources Naturelle dans la Province de Taza, 16-17 et 18 Novembre 2015- Taza.
- 4. I. Aouam;** Y. El Atki; A.Taroq ; F. Kamari; B. Lyoussi ; A. Abdellaoui « Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de quelques plantes de la région de Taza », Deuxième forum des doctorants à la faculté de médecine et de pharmacie, 03 novembre 2016.
- 5. I. Aouam;** Y. El Atki; A.Taroq; F. Kamari; B. Lyoussi ; A. Abdellaoui « Activité antibactérienne et phytochimie des huiles essentielles de la Saugue », Premier congrès international : Maladies chroniques et qualité de vie organisé par le pôle Santé, Recherche Biomédicale, Biomolécules et Qualité De Vie 2016 à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, le 15 et 16 Décembre.
- 6. I. Aouam;** Y. El Atki; A.Taroq; F. Kamari; B. Lyoussi ; A. Abdellaoui « Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus Officinalis* », 1^{ère} édition du Symposium International sous le thème : les effets bénéfiques de l'huile d'Argan sur la santé humaine; Faculté des sciences et techniques d'Errachidia; 5 et 6 mai 2017.
- 7. I. Aouam,** Y. El Atki, H. Zejli, A. Lfitat, H. Hamdi, A. Gouch, B. Lyoussi, A. Abdellaoui ; Total phenolic content and antioxidant activity of some extract of *Thymus ciriodorus L.* collected from Berkin, North-est region of Morocco. 10^{ème} édition de la Rencontre Nationale d'Electrochimie, les 18 et 19 Avril 2019; Centre de conference Alakhawayn, Ifrane.

Liste des figures

Figure 1: Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	9
Figure 2: Montage d'hydrodistillation (Clevenger).....	9
Figure 3: Squelette de base des flavonoïdes	13
Figure 4: Structure des différentes classes des flavonoïdes	13
Figure 5: Structure des tanins condensés et leur monomère.....	14
Figure 6: Structure des tanins hydrolysables et les acides associés	14
Figure 7: Structure de base de Coumarine	15
Figure 8: Schéma présentatif du stress oxydant.....	22
Figure 9: Schéma présentatif de la neutralisation des radicaux libres par un antioxydant	23
Figure 10: Structure d'un lobule hépatique.....	26
Figure 11: Thymus	33
Figure 12: Distribution géographique du Thym dans le monde.	35
Figure 13: Disques imprégnés d'antibiotique pour réalisation d'antibiogramme.....	40
Figure 14: Montage expérimental d'hydrodistillation.	41
Figure 15: Montage expérimental de l'appareil Soxhlet.....	43
Figure 16: Rotavapeur (Laboratoire LPPSE, FSDM).....	43
Figure 17: Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (Cité d'innovation Fès).....	44
Figure 18: Principe de la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme).	48
Figure 19: Neutralisation du DPPH par un antioxydant (RH).	49
Figure 20: Chromatogramme de CG/MS de l'huile essentielle de <i>Thymus riatarum</i>	56
Figure 21: Chromatogramme de CG/MS de l'huile essentielle de <i>Thymus blecherianus</i>	58
Figure 22: Chromatogramme de CG/MS de l'huile essentielle de <i>Thymus citriodorus</i>	59
Figure 23: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles étudiées comparé avec BHT.	68
Figure 24: Absorbance en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles étudiées comparé avec la Quercétine.....	70
Figure 25: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	76
Figure 26: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus</i> , <i>citriodorus</i> et <i>riatarum</i>	77
Figure 27: Courbe d'étalonnage de Rutin pour le dosage des Flavonoïdes.	78
Figure 28: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus</i> , <i>citriodorus</i> et <i>riatarum</i>	79
Figure 29: Courbe étalon de la Quercétine.	80
Figure 30: Teneur en flavones et flavonols dans les différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus</i> , <i>citriodorus</i> et <i>riatarum</i>	80
Figure 31: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du <i>Thymus riatarum</i> préparés par la technique du Soxhlet comparés au BHT.	81
Figure 32: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du <i>Thymus blecherianus</i> préparés par la technique du Soxhlet comparés au BHT	82
Figure 33: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du <i>Thymus citriodorus</i> L. préparés par la technique du Soxhlet comparés au BHT	82

Figure 34: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits du <i>T.riatarum</i> préparés par Soxhlet comparés à celui de la quercétine	84
Figure 35: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits du <i>T.blecherianus</i> préparés par Soxhlet comparés à celui de la quercétine	85
Figure 36: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits du <i>T.citriodorus L.</i> préparés par Soxhlet comparés à celui de la quercétine.	85
Figure 37: Courbe d'étalonnage de la vitamine C	87
Figure 38: Capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus, citriodorus et riatarum</i>	88
Figure 39: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus, citriodorus et riatarum</i>	90
Figure 40: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus, citriodorus et riatarum</i>	91
Figure 41: Teneur en flavones et flavonols dans les différents extraits des trois espèces de thym : <i>blecherianus, citriodorus et riatarum</i>	92
Figure 42: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du <i>Thymus riatarum</i> préparés par macération comparés au BHT.	93
Figure 43: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du <i>Thymus blecherianus</i> préparés par macération comparés au BHT.....	94
Figure 44: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du <i>Thymus citriodorus L</i> préparés par macération comparés au BHT.....	94
Figure 45: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits des extraits du <i>T.riatarum</i> préparés par macération comparés à la quercétine.	96
Figure 46: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits des extraits du <i>T.blecherianus</i> préparés par macération comparés à la quercétine.	96
Figure 47: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits des extraits du <i>T.citriodorus</i> préparés par macération comparés à la quercétine.	97
Figure 48: Capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits en mg Eq Vit C /g Ms..	98
Figure 49: Effet des extraits des trois espèces de thym sur le poids corporel des rats.	107
Figure 50: Effet du prétraitement des extraits des plantes étudiées sur le poids relatif du foie des rats...108	108
Figure 51: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de l'ASAT des rats traités avec CCl ₄ ... 109	109
Figure 52: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de l'ALAT des rats traités avec CCl ₄ . 110	110
Figure 53: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de PAL des rats traités avec CCl ₄111	111
Figure 54: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de bilirubine totale des rats traités avec CCl ₄	112

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques liées à la volatilité de quelques constituants odorants	7
Tableau 2: Classification botanique du <i>Thymus</i>	34
Tableau 3: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus riatarum</i>	57
Tableau 4: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus blecherianus</i>	58
Tableau 5: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus citriodorus</i>	60
Tableau 6: Activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées et des antibiotiques exprimés en diamètre d'inhibition.....	61
Tableau 7: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles en (mg/ml).....	62
Tableau 8: Activités antioxydantes des huiles essentielles en comparaison avec les standards.	69
Tableau 9: Rendements des différents extraits obtenus à partir de <i>T. riatarum</i> , <i>T.blecherianus</i> et <i>T.citriodorus</i>	74
Tableau 10: Résultats du criblage phytochimique des différents extraits étudiés.....	75
Tableau 11: Les valeurs des IC ₅₀ des différents extraits en comparaison avec le BHT	83
Tableau 12: Les valeurs des EC ₅₀ pour les différents extraits en comparaison avec la Quercétine.....	86
Tableau 13: Capacité antioxydante totale des différents extraits en mgEqVitC/gMs.....	87
Tableau 14: Coefficients de corrélation de Pearson entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par différents tests	88
Tableau 15: Rendements des différents extraits obtenus à partir de <i>T. riatarum</i> , <i>T.blecherianus</i> et <i>T.citriodorus</i>	89
Tableau 16: Les valeurs des IC ₅₀ des différents extraits en comparaison avec le BHT	95
Tableau 17: Les valeurs des EC ₅₀ des différents extraits en comparaison avec la Quercétine	97
Tableau 18: Capacité antioxydante totale des différents extraits en mgEqVitC/gMs.....	98
Tableau 19: Coefficients de corrélation de Pearson entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par différents tests	99

Liste des abréviations

HE	: Huile essentielle.
CPG /MS	: chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.
ERO	: Espèces réactives d'oxygène
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
WHO	: World health organisation.
CAT	: Capacité Antioxydante Totale.
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
FRAP	: Ferric reducing power activity
CMI	: concentration minimale inhibitrice.
IC ₅₀	: Inhibitory concentration 50%.
BHT	: Hydroxytoluène butylé
AG	: Acide Gallique
PAM	: Les plantes médicinales et aromatiques
BHT	: Butylhydroxytoluène
BHA	: Butylhydroxyanisole
<i>T.ri</i>	: <i>Thymus riatarum</i>
<i>T.bl</i>	: <i>Thymus blecherianus</i>
<i>T.ci</i>	: <i>Thymus citriodorus L</i>
IN	: Infections nosocomiales
ALAT	: Alanine-aminotransférase
ASAT	: Aspartate-aminotransférase
PAL	: Phosphatase alcaline

Sommaire

Dédicace.....	
Remerciement	
Résumé.....	
Abstract.....	
Liste des publications.....	
Liste des communications orales	
Liste des communications affichés	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction générale	2
Partie I : Synthèse Bibliographique	5
Chapitre I : Plantes aromatiques et médicinales	6
I. Définition	6
II. Importance des plantes aromatiques et médicinales	6
II.1 L'action des plantes médicinales	6
II.2 La phytothérapie	6
III. Composition.....	7
III.1 Composés volatils : Les huiles essentielles.....	7
III.1.1 Définition	7
III.1.2 Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	7
III.1.3 Facteurs influençant la composition d'une HE	8
III.1.4 Méthodes d'extractions des huiles essentielles	8
III.1.4.1 Entraînement à la vapeur d'eau.....	9
III.1.4.2 L'hydrodistillation	9
III.1.4.3 L'expression à froid	10
III.1.5 Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles	10
III.1.5.1 Effet antioxydant.....	10
III.1.5.2 Activité antimicrobienne.....	10
III.1.5.3 Activité anti-inflammatoire.....	11
III.1.5.4 Effet antispasmodique.....	11
III.1.5.5 Effet sur le système nerveux	11
III.1.5.6 Effet insecticide.....	11

III.1.5.7	Effet antiviral	11
III.1.5.8	Effet Antiseptique	12
III.1.6	Toxicité des huiles essentielles	12
III.2	Composés organiques non volatils.....	12
III.2.1	Les composés phénoliques.....	12
III.2.1.1	.Les flavonoïdes	12
III.2.1.2	Les tanins	13
III.2.1.2.1	Les tanins condensés (pro-anthocyanidines).....	14
III.2.1.2.2	Tanins hydrolysables	14
III.2.1.3	Coumarines	15
III.2.1.4	Les terpènes.....	15
III.2.1.5	Les saponines	15
III.2.1.6	Les glucosides.....	15
III.2.1.7	Les vitamines	16
III.2.1.8	Les minéraux.....	16
CHAPITRE II	: Infection nosocomiale.....	17
I.	Définition générale et prévalence	17
II.	Facteurs entrant en jeu dans l'apparition des infections nosocomiales.....	18
II.1	Agents microbiens	18
II.2	Vulnérabilité du patient.....	18
II.3	Facteurs environnementaux	19
III.	Mesure de prévention des infections nosocomiales	19
III.1	Mesures institutionnelles.....	19
III.2	Mesures épidémiologiques.....	19
III.3	Mesures concernant la formation.....	19
III.4	Mesures concernant l'architecture, les locaux, les circuits et les matériaux	20
III.5	Mesures d'hygiène de base.....	20
III.6	Mesure d'hygiène du patient.....	20
III.7	Mesures d'hygiène des soins	20
III.8	Mesures concernant les dispositifs médicaux	20
IV.	Résistance bactérienne	20
Chapitre III	: Stress oxydatif.....	22
I.	Définition	22
II.	Radical libre	22
III.	Les effets protecteurs des antioxydants	23

IV. Rôles physiologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	23
V. Oxydation des macromolécules	24
V.1 Peroxydation des lipides	24
V.2 Oxydation des protéines.....	24
V.3 Oxydation des glucides	24
V.4 Oxydation de l'ADN.....	25
VI. Antioxydants	25
VI.1 Les antioxydants primaires	25
VI.2 Les antioxydants secondaires.....	25
CHAPITRE IV : Effet hépatoprotecteur et hépatotoxicité	26
I. Anatomie et rôle du foie.....	26
I.1 Anatomie du foie.....	26
I.2 Rôle du foie.....	27
II. Relation entre stress oxydant et maladies hépatiques	27
III. L'hépatotoxicité	28
III.1 Hépatotoxines	28
III.1.1 Le tétrachlorure de carbone (CCl ₄)	28
III.2 Mécanismes de l'hépatotoxicité.....	29
III.3 Marqueurs de la fonction hépatique.....	29
III.3.1 Transaminases	29
III.3.1.1 Alanine-aminotransférase (ALAT)	29
III.3.1.2 Aspartate-aminotransférase (ASAT).....	30
III.3.2 Phosphatases alcalines (PAL)	30
III.3.3 Bilirubine totale.....	30
IV. L'effet Hépatoprotecteur des plantes	30
CHAPITRE V : Présentation des plantes étudiées.....	32
I. Historique.....	32
II. Généralités du thym	32
III. Description morphologique.....	33
IV. Classification.....	34
V. Répartition géographique.....	34
VI. Exigence écologique	35
VII. Utilisation du thym	35
Partie II : Matériel et Méthodes	37
I. Matériel.....	38

I.1	Matériel végétal	38
I.2	Animaux.....	38
I.3	Souches bactériennes	38
I.4	Antibiotiques.....	40
II.	Méthodes.....	40
II.1	Extraction des huiles essentielles.....	40
II.1.1	Détermination du rendement.....	41
II.2	Extraction par les solvants organiques.....	42
II.2.1	Extraction par macération	42
II.2.2	Par Soxhlet.....	42
II.3	Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	44
II.4	Méthodes d'activités biologiques.....	45
II.4.1	Criblage phytochimique	45
II.4.2	Evaluation de l'activité antibactérienne	46
II.4.2.1	Méthode de diffusion sur disque ou méthode des aromatoigrammes	47
II.4.2.2	Méthode de microdilution.....	48
II.5	Evaluation de l'activité antioxydante.....	48
II.5.1	Piégeage du radical libre DPPH.....	49
II.5.2	Test de la réduction du Fer (FRAP)	50
II.5.3	Capacité antioxydante totale (CAT).....	50
II.5.4	Dosage de polyphénols totaux	51
II.5.5	Dosage de flavonoïdes totaux	51
II.5.6	Dosage de flavones et flavonols.....	51
II.6	Activité hépatoprotectrice des extraits aqueux des trois plantes étudiées.....	52
II.7	Analyses statistiques	53
Partie III :Résultats et discussions		54
Chapitre I: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus riatarum</i> , <i>Thymus blecherianus</i> et <i>Thymus citriodorus L.</i> et leurs activités antibactériennes		
I.	Introduction.....	55
II.	Résultats.....	56
II.1	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus riatarum</i>	56
II.1.1	Rendement	56
II.1.2	Composition chimique	56
II.2	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus blecherianus</i>	57
II.2.1	Rendement	57
II.2.2	Composition chimique	57

II.3	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus citriodorus L.</i>	59
II.3.1	Rendement	59
II.3.2	Composition chimique	59
II.4	Activité antibactérienne des huiles essentielles	61
III.	Discussion	62
III.1	Rendement des huiles essentielles de <i>Thymus riatarum, blecherianus et citriodorus L.</i>	62
III.2	Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus riatarum, blecherianus et citriodorus L.</i>	63
III.3	Activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées	64
IV.	Conclusion	66
Chapitre II : Activité antioxydante des huiles essentielles du <i>Thymus riatarum, Thymus blecherianus et Thymus citriodorus L.</i>		67
I.	Introduction.....	67
II.	Résultats.....	68
II.1	Le piégeage du radical libre DPPH•	68
II.2	Pouvoir réducteur (FRAP)	69
II.3	Capacité antioxydante totale (CAT)	70
III.	Discussion.....	71
IV.	Conclusion	72
Chapitre III : Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>T. riatarum, T. blecherianus et T. citriodorus L.</i> par deux techniques : Soxhlet et macéré.....		73
I.	Introduction.....	73
II.	Résultats.....	74
II.1	Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits <i>T. riatarum, T.blecherianus et T.citriodorus</i> par la technique de Soxhlet	74
II.1.1	Rendement des extraits	74
II.1.2	Résultats du criblage phytochimique	74
II.1.3	Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	76
II.1.4	Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	78
II.1.4.1	Dosage des flavonoïdes totaux.....	78
II.1.4.2	Dosage des flavones et flavonols	79
II.1.5	Activité antioxydante des extraits	81
II.1.5.1	Piégeage du radical libre (DPPH)	81
II.1.5.2	Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	84
II.1.5.3	Capacité antioxydante totale (CAT).....	86
II.1.6	Corrélations.....	88

II.1.6.1	Corrélation entre DPPH et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols.....	89
II.1.6.2	Corrélation entre FRAP et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols	89
II.1.6.3	Corrélation entre la CAT et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols	89
II.2	Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits <i>T. riatarum</i> , <i>T.blecherianus</i> et <i>T.citriodorus</i> par macération.....	89
II.2.1	Rendement des extraits	89
II.2.2	Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	90
II.2.3	Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	91
II.2.3.1	Dosage des flavonoïdes totaux.....	91
II.2.3.2	Dosage des flavones et flavonols	92
II.2.4	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	93
II.2.4.1	Piégeage du radical libre (DPPH)	93
II.2.4.2	Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	95
II.2.4.3	Capacité antioxydante totale (CAT).....	98
II.2.4.4	Corrélations.....	99
II.2.4.4.1	Corrélation entre DPPH et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols.....	99
II.2.4.4.2	Corrélation entre FRAP et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols.....	99
II.2.4.4.3	Corrélation entre la CAT et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols.....	100
III.	Discussion.....	100
III.1	Rendement des extraits	100
III.2	Criblage phytochimique.....	101
III.3	Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols	101
III.4	Activité antioxydante	102
III.4.1	piégeage du radical libre (DPPH)	102
III.4.2	Le pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	103
III.4.3	Capacité antioxydante totale (CAT).....	104
III.5	Corrélation	105
IV.	Conclusion	105
CHAPITRE IV : Activité hépatoprotectrice des extraits aqueux du <i>T. riatarum</i> , <i>blecherianus</i> et <i>citriodorus L.</i>		106
I.	Introduction.....	106

II.	Activité hépatoprotectrice des extraits aqueux du <i>T. riatarum</i> , <i>blecherianus</i> et <i>citriodorus</i> L.....	106
II.1	Effet des trois espèces de thym sur le poids corporel et le poids relatif du foie	107
II.2	Effet des trois espèces de thym sur les paramètres biochimiques	108
II.2.1	Effet sur les transaminases	108
II.2.2	Effet sur la phosphatase alcaline	111
II.2.3	Effet sur la bilirubine totale	112
III.	Discussion	113
III.1	Effet des extraits des plantes étudiées sur le poids corporel et le poids relatif du foie	113
III.2	Effet des extraits aqueux du <i>T. riatarum</i> , <i>blecherianus</i> et <i>citriodorus</i> sur les paramètres biochimiques	113
IV.	Conclusion	115
	Conclusion générale et perspectives	117
	Références Bibliographiques	119

Introduction générale

Introduction générale

Le Maroc est un pays à la géographie très variée entre l'océan Atlantique et la mer Méditerranée, il possède une combinaison des milieux froids et glacials des hauteurs enneigés de l'Atlas et des confins arides et chauds des hamadas désertiques du Sahara. Cette combinaison des facteurs de diversité peut prétendre d'offrir une diversité physiologique des formations végétales, diversité paysagère des sites, diversité écologique des habitats et diversité biologiques des biotopes. La flore très diversifiée (environ 4500 plantes) dont 800 sont connues en médecine traditionnelle (Benzyane et al., 2010). Parmi les 951 espèces appartenant à la flore endémique, 21% sont représentés par les plantes marocaines (Libiad et al., 2015). Le Maroc est considéré comme l'un des principaux pays producteurs d'huiles essentielles. Les huiles essentielles Marocaines sont très connues sur le marché international et plus particulièrement aux USA et en Europe.

Les produits naturels ont fait un retour en force ces dernières décennies. Plusieurs facteurs sont derrière ce retour tels que, le coût moins élevé que les médicaments synthétiques et la disponibilité surtout dans les régions éloignées. Aujourd'hui, bien que nous ayons vu le développement des médicaments synthétiques, de nombreux pays même les pays développés continuent à compter sur les remèdes traditionnels. Ainsi, les effets indésirables induits par les médicaments synthétiques inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. Ajouté à cela, les plantes médicinales sont des sources importantes de base de médicaments et près de 80% de la population mondiale utilise des médicaments à plantes comme remède pharmaceutique initiale (WHO, 2004). En plus de leur rôle environnemental, les plantes présentent une importante source de revenus pour les populations rurales dans les pays en voie de développement (El Meskaoui, 2013). En outre, les risques de toxicité dus à la méconnaissance des plantes et à l'absence d'un mode d'emploi approprié et d'une maîtrise d'une posologie définie, incitent à prendre conscience des dangers encourus lors de la médication par les plantes.

Par ailleurs, les plantes médicinales et aromatiques (PAM) sont également utilisées pour la lutte contre divers maladies et aussi dans le processus de stress oxydatif. Les radicaux libres sont impliqués dans l'étiologie de plusieurs maladies qui sont maintenant considérées comme l'un

des problèmes majeurs de santé publique. On note, l'asthme, les cancers, le diabète sucré, les désordres métaboliques et les maladies d'Alzheimer (Tiwari, 2005). Les radicaux libres sont des espèces chimiques fortement réactives et potentiellement préjudiciables. Lors d'un stress oxydatif, les radicaux libres non piégés induisent des dommages importants aux composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN. Ainsi, l'importance des antioxydants s'est focalisée sur la recherche et l'isolation des antioxydants naturels à partir des végétaux afin de remplacer les antioxydants synthétiques. Les plus utilisés dernièrement sont le butylhydroxytoluène (BHT), le butylhydroxyanisole (BHA), qui devaient apporter une solution au phénomène de stress oxydant ; mais ils ont été suspectés de posséder une certaine toxicité et qu'ils étaient responsables de dommages causés dans le foie et de carcinogénèse (Atmani et al., 2009).

La résistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques et les effets indésirables des médicaments synthétiques inquiétaient les chercheurs ces dernières années. C'est pour cette raison, que leurs centres d'intérêt s'installent sur la recherche et le développement de nouvelles armes naturelles, thérapeutiques efficaces et moins agressives pour l'organisme humain.

L'objectif principale de la présente étude se focalise sur la valorisation de trois espèces de thym : *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus* L par l'étude de leurs extraits volatils et non volatils et l'évaluation de leurs activités biologiques et pharmacologiques.

Le choix de ces différentes espèces est basé sur le fait que *T. riatarum* est une espèce endémique de la région de Riata située à quelque kilomètre de Taza et qui n'a jamais fait, à notre connaissance, l'objet d'une étude antérieure en terme d'extrait non volatil. La valorisation de cette plante a été accompagnée avec deux autres espèces de thym de la même région à titre de comparaison (*Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus* L).

Notre travail est subdivisé en trois parties. Il commence par une synthèse des connaissances bibliographiques, nous nous sommes intéressés à donner un aperçu systématique sur les plantes aromatiques et médicinales, les infections nosocomiales, le stress oxydant et l'effet hépatoprotecteur. La deuxième partie est consacrée aux matériel et méthodes. La troisième et dernière partie est réservée aux résultats et discussion, elle est présentée sous forme de quatre chapitres :

Premier chapitre est consacré à un screening phytochimique des huiles essentielles du *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L* et l'évaluation de leurs activités antibactériennes.

Deuxième chapitre est focalisé sur l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles du *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L*.

Troisième chapitre consiste au dosage des composés phénoliques et l'étude *in vitro* de l'effet antioxydant des extraits du *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L* obtenus par deux techniques différentes : Soxhlet et macéré.

Quatrième chapitre est réservé aux résultats de l'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux du *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L* sur un modèle animal; les rats *Wistar albinos*.

Partie I :

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Plantes aromatiques et médicinales

I. Définition

Toute plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques est considérée comme plante médicinale et aromatique. Cela signifie qu'une de ses parties (racine, feuille, bulbe, fleurs, graines ou fruits) peut être employée dans le but de prévenir, soulager ou guérir des maladies. (Schauenberg & Paris, 1977; Vercauteren, 2012). Ces plantes sont utilisées en cuisine, en phytothérapie, en médecine, en cosmétique et en parfumerie. (Bhar & Balouk, 2011).

Les plantes sont universellement reconnues comme une ressource essentielle pour la planète et un élément essentiel de la diversité biologique du monde. Elles oxygènent l'air et favorisent l'éveil et la concentration, de plus, les plantes peuvent améliorer la qualité de la vie et le milieu de travail.

II. Importance des plantes aromatiques et médicinales

II.1 L'action des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales présente une grande importance économique et culturelle, en fournissant des vêtements, de la nourriture, du carburant, des médicaments et des abris pour l'homme dans le monde entier. Les plantes jouent également un rôle majeur dans la stabilité des écosystèmes et le maintien de l'équilibre écologique de la terre (Djoghlaif & Webbe, 2009). Elles sont utilisées aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie grâce à leur contenance en principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Chevallier, 2001).

II.2 La phytothérapie

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs « *phytos* » qui signifie plante et « *therapeuo* » qui signifie soigner. C'est l'une des formes de traitement les plus anciennes qui continue à jouer un rôle important en Afrique et en Asie par l'usage des plantes médicinales (Sebai & Boudali, 2012). Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, il existe toujours les effets indésirables induits par les médicaments chimiques ce qui pousse les utilisateurs de se tourner vers des soins moins agressifs. C'est pour cela on voit que la

phytothérapie qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme (Chevallier, 2001).

III. Composition

III.1 Composés volatils : Les huiles essentielles

III.1.1 Définition

L'huile essentielle (HE) est un mélange complexe de molécules odorantes et volatiles contenues par les plantes aromatiques, elle se rencontre dans tout le règne végétal, cependant, elle est particulièrement abondante chez certaines familles: Rutaceae, Lamiaceae, Myrtaceae... (Talbaoui et al., 2012). La norme française AFNOR a défini l'huile essentielle comme tout « produit obtenu à partir d'une matière première végétal, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par la distillation sèche » (Pibiri, 2006; Afnor, 2000).

III.1.2 Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

L'huile essentielle est un liquide homogène, bien que constitué d'un assemblage hétérogène sur le plan chimique par la diversité des structures présentes (Endrias, 2006). Rarement colorée, insoluble dans l'eau, volatile, totalement soluble dans les alcools et l'éther. Leur densité est, en général, inférieure à celle de l'eau (Bhar & Balouk, 2011). Seules 3 huiles essentielles de girofle, cannelle et saffras qui ont une densité supérieure à celle de l'eau. La plupart des HE ont un indice de réfraction élevé et dévient la lumière polarisée (Endrias, 2006).

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques liées à la volatilité de quelques constituants odorants (Denny, 1991)

Composé	Formules	Poids moléculaire (M _r)	Point d'ébullition à 760 mmHg (°C)	Tension de vapeur calculée à 373°K (mmHg)	Rapport d'entraînement 760 mmHg (mole d'he/mole de l'eau)
α pinène	C ₁₀ H ₁₆	136	155,0	141,0	1/4,4
β pinène	C ₁₀ H ₁₆	136	158,3	120,0	1/5,3
limonène	C ₁₀ H ₁₆	136	175,0	72,6	1/9,5
carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	227,5	9,6	1/78,2
Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	237,0	5,3	1/142,4
camphr	C ₁₀ H ₁₆ O	152	209,2	20,0	1/37,0

III.1.3 Facteurs influençant la composition d'une HE

La présence ou l'absence de certains constituants dans la plante dépend de l'un ou de la combinaison de trois facteurs (le patrimoine génétique, l'âge et l'environnement de la plante). En effet, les conditions environnementales qui sont appelés facteurs extrinsèques, tel que, la nature du sol, la température, l'altitude et l'humidité influencent sur la composition chimique et le rendement des huiles essentielles (Palá-Paúl et al., 2001).

L'influence des conditions de transport, mode de récolte, séchage et de stockage sur la composition chimique a été décrite (Yayi et al., 2004). Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (l'acidité, température) et de la durée d'extraction. D'autres facteurs tels que les traitements auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (dégradation chimique ou enzymatique, broyage, agitation) contribuent à la variation de la qualité et du rendement de l'huile essentielle (Rivera, 2006).

III.1.4 Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première : son état original et ses caractéristiques, sa nature proprement dite. Le rendement « HE/matière première végétale » peut être extrêmement variable selon les plantes (Desmares & Delerme, 2008).

Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation et une méthode d'expression à froid (Rivera, 2006).

III.1.4.1 Entraînement à la vapeur d'eau

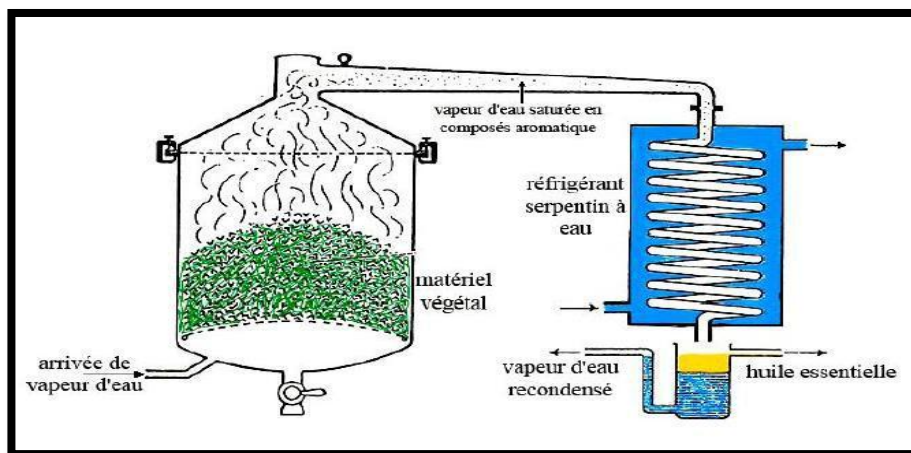


Figure 1: Principe de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Le principe de cette technique (Figure 1) consiste à soumettre le matériel végétal à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable, qui traverse les végétaux et emporte avec elle les molécules aromatiques. Le mélange de vapeurs se condense alors en traversant une surface froide pour être récupérée en phase liquide où l'huile essentielle est séparée de l'eau par décantation (Smadja, 2009 ; El Haib, 2011).

III.1.4.2 L'hydrodistillation



Figure 2: Montage d'hydrodistillation (Clevenger)

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un ballon rempli d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient. Cette méthode est simple et ne nécessite pas un appareillage coûteux (Bruneton, 1993).

III.1.4.3 L'expression à froid

Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (Citrus spp.) par des procédés mécaniques à température ambiante. L'expression à froid consiste à soumettre la substance végétale à une forte pression à l'aide d'une presse hydraulique (Desmares et al., 2008). Les composés volatils ne subissent aucune modification (Chaintreau et al., 2003).

III.1.5 Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

III.1.5.1 Effet antioxydant

Les antioxydants sont des agents protecteurs des cellules. Ils permettent aux cellules de lutter contre le stress oxydatif provoqué par les rayonnements, ou les agents chimiques. Il existe deux types d'antioxydants, Ceux qui sont naturellement synthétisés par les cellules, ils sont dits endogènes et le deuxième type regroupe les antioxydants exogènes apportés par l'alimentation. Il s'agit notamment des vitamines C et E (Nadji, 2010). Beaucoup de recherches ont montré que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (Amzad et al., 2008). Ce qui confirme que l'utilisation traditionnelle de l'huile essentielle et des extraits des plantes médicinales dans l'industrie alimentaire est reliée non seulement à l'odeur et à l'arôme plaisant, mais aussi à des possibilités préservatives des substances présentes dans les feuilles de ces plantes (Caillet & Lacroix, 2007).

III.1.5.2 Activité antimicrobienne

C'est l'activité la mieux étudiée par les scientifiques, les huiles essentielles sont connues par une activité antimicrobienne très efficace. La plupart des travaux antérieurs ont montré que certaines plantes aromatiques et leurs huiles essentielles pourraient être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (Gachka et al., 2007; Rasooli et al., 2008) ainsi pour empêcher la croissance des microorganismes d'altération et pathogènes (Sacchetti et al., 2005; Piyo et al., 2009; Hadizadeh et al., 2009) et pourraient être

aussi employer dans les aliments pour prolonger la durée de conservation des aliments d'où l'amélioration de la sécurité alimentaire (Foda et al., 2010; Ghasemi et al., 2010).

III.1.5.3 Activité anti-inflammatoire

Les Huiles essentielles ont une place de choix dans le traitement de l'inflammation et peuvent agir de différentes manières. Les aldéhydes contenus dans ces substances naturelles qui sont responsables des défenses anti-inflammatoires naturelles de l'homme (Raymond, 2005).

III.1.5.4 Effet antispasmodique

Les huiles essentielles possédant des esters ou des éthers possèdent une action sur les spasmes des muscles lisses ou striés comme l'huile essentielle d'Hélichryse. De nombreuses HE sont réputées pour diminuer ou supprimer les spasmes tels que la mélisse, la verveine odorante...etc (Pascual et al.,2001).

III.1.5.5 Effet sur le système nerveux

Les huiles essentielles peuvent réguler le système nerveux central en exerçant un effet antispasmodique, sédatif, antalgique et inducteur du sommeil (Mayer, 2012; Dorosz et al., 2011).

III.1.5.6 Effet insecticide

Récemment, il y a un intérêt croissant pour l'utilisation probable des extraits de plantes comme solution de rechange aux insecticides synthétiques (Taleb-Toudert, 2015). Les huiles essentielles de certaines plantes comme *Lippia citriodora* ont une action répulsive, réduit la fécondité et influence défavorablement l'apparition de progéniture (Taleb-Toudert, 2015).

III.1.5.7 Effet antiviral

Les molécules aromatiques de certaines plantes sont douées de propriété antivirale grâce à la liposolubilité de ces HEs, ce qui leur permet de pénétrer dans l'enveloppe virale riche en lipides. Les HEs sont plus actives sur les virus enveloppés car ils sont plus fragiles que les virus nus. Ils sont donc particulièrement efficaces envers les virus herpes. L'activité virucide de l'huile essentielle de thym vis-à-vis du virus de l' Herpes a été récemment démontrée (Goetz & Ghedira, 2012).

III.1.5.8 Effet Antiseptique

Les propriétés antiseptiques et désinfectantes sont souvent retrouvées dans les huiles essentielles possédant des fonctions aldéhydes ou des terpènes comme l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata*.

III.1.6 Toxicité des huiles essentielles

Toute plante médicinale est susceptible de provoquer des effets secondaires. Malgré, que ces effets induits par les plantes soient généralement mineurs et rares. Mais tout en négligeant le mode d'emploi et la posologie adéquate, l'usage des plantes peut engendrer des effets néfastes et peut même être à l'origine d'intoxication telles que les réactions allergiques, les réactions cutanées type photosensibilisation, ou d'atteintes de différents organes tels que les reins, le foie, le cœur et le système nerveux central (Posadzki et al., 2013).

III.2 Composés organiques

Ce sont des molécules organiques complexes généralement répartis en trois grandes familles: Les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Lutge et al., 2002).

III.2.1 Les composés phénoliques

Il existe une très grande variété de phénols. Ces derniers sont présents chez toutes les plantes vasculaires plus précisément dans toutes les parties des végétaux supérieures (fruits, feuilles, racines, tiges). Les caumarines, les tanins et les flavonoïdes constituent les principales classes des composés phénoliques (Crozier et al., 2006; Beta et al., 2005).

III.2.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, ils sont des pigments responsables de la coloration des fruits, des fleurs et parfois des feuilles. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation, certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales (Sebai & Boudali, 2012; Chevallier, 2001). On distingue les flavonoïdes hétérosides qui sont hydrosolubles et solubles dans les alcools et les flavonoïdes solubles dans les solvants organiques généralement apolaires (Bruneton, 1999).

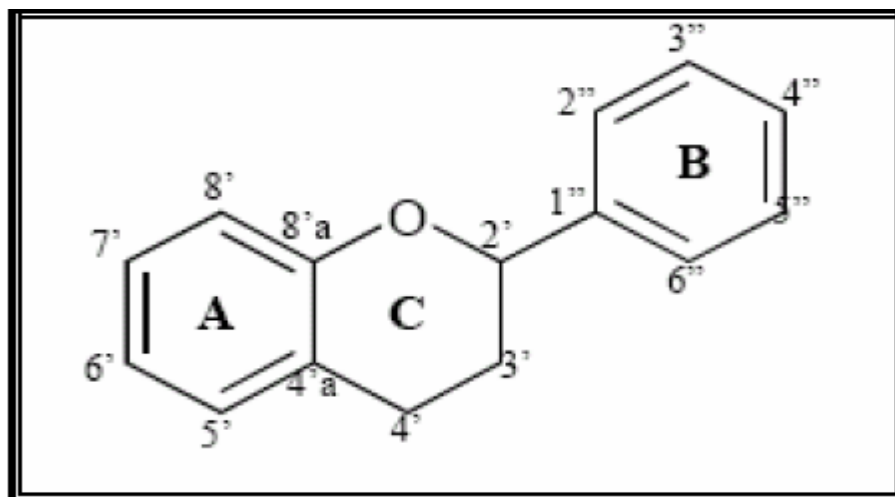


Figure 3: Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006)

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: Flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins.

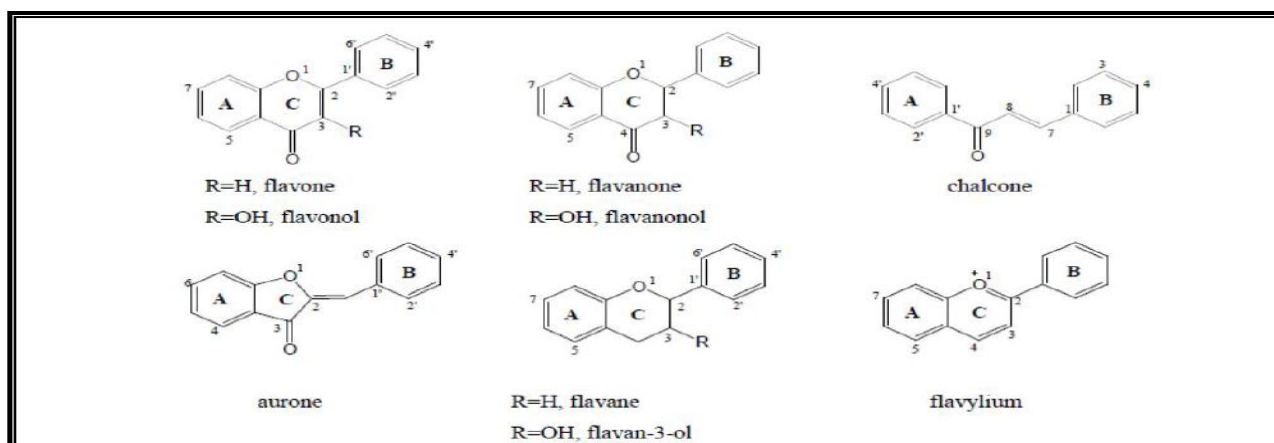


Figure 4: Structure des différentes classes des flavonoïdes (Martinez-Cayuela, 1995)

III.2.1.2 Les tanins

On trouve les tanins dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (café, datte, raisin, cacao...). Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les bétails ou les insectes. On distingue les tanins hydrolysables qui contiennent un sucre dans leur structure et les tanins condensés qui ne renferment pas de sucre dans leur structure (Bruneton, 1999).

III.2.1.2.1 Les tanins condensés (pro-anthocyanidines)

Largement présents dans le règne végétal et de structure complexe, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires notamment les fruits, les légumes, les boissons (Peronny, 2005). Ils ne possèdent pas de sucres dans leur molécule (Figure 5); ils ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tannases mais en présence d'acide forts ou d'agents d'oxydation.

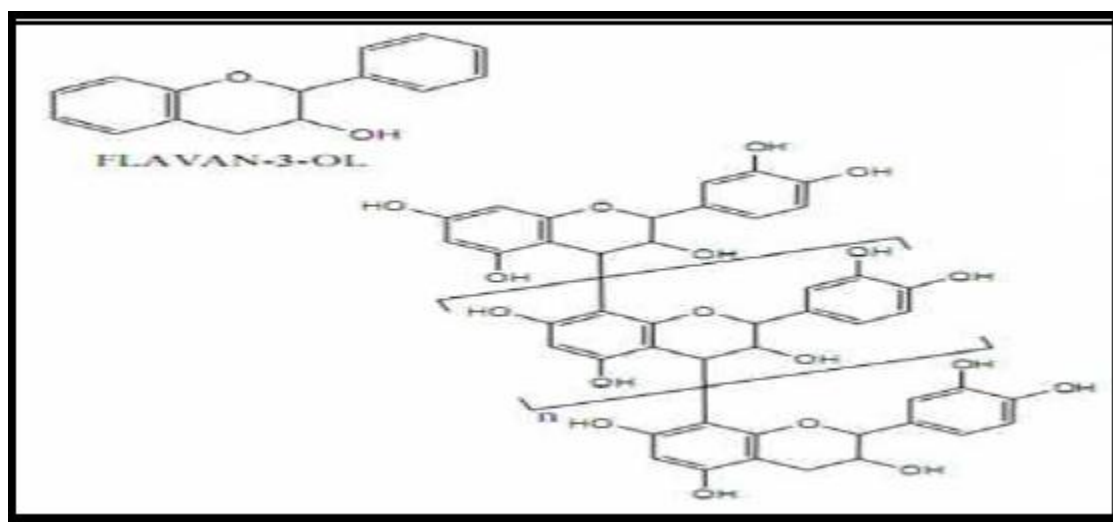


Figure 5: Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

III.2.1.2.2 Tanins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, ils sont caractérisés par la présence du sucre dans leur structure et ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique (Figure 6). Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique et une partie non phénolique (le plus souvent du glucose ou de l'acide quinique) (Macheix, 1996).

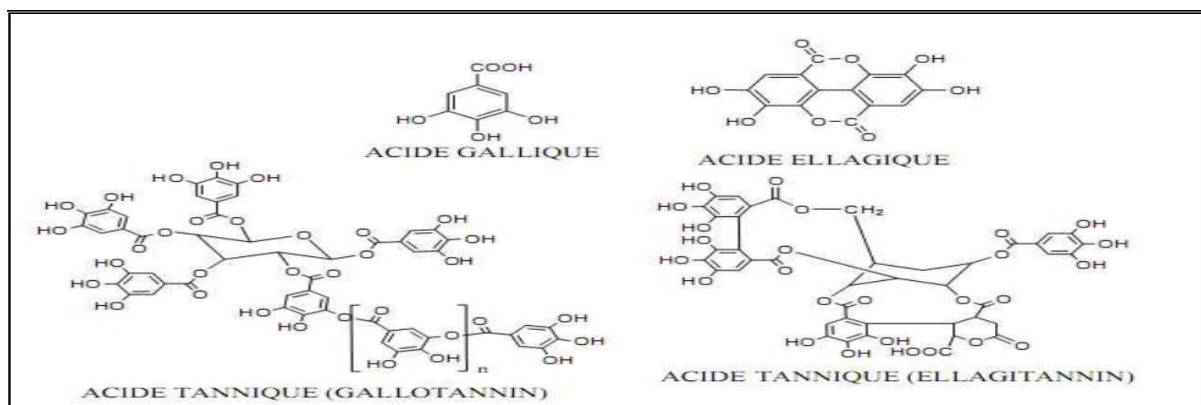


Figure 6: Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (Peronny, 2005)

III.2.1.3 Coumarines

Les coumarines sont des composés issus du métabolisme de la phénylalanine (Figure 7), ils sont caractérisés par une odeur de foin fauché. (Cowan, 1999). A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : les Légumineuses, Thymeleacées et Rutacées. Ils se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Deiana et al., 2003).

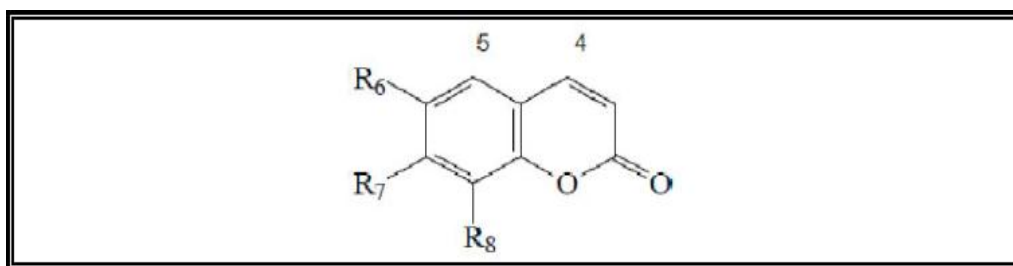


Figure 7: Structure de base de Coumarine

III.2.1.4 Les terpènes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ils ne sont pas formés à partir de l'isoprène C_5H_8 bien qu'ils aient pour formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire $(C_5H_8)_n$ (Bhat et al., 2005).

III.2.1.5 Les saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales (l'herbe à savon ; le réglisse ; le bouillon blanc ; le Modène). Elles doivent leur nom au fait qu'elles forment dans l'eau une solution moussante comme une eau de savon (Sebai & Boudali, 2012).

III.2.1.6 Les glucosides

Les glucosides sont des hétérosides dérivés du glucose. Ils produisent du glucose lorsqu'ils sont hydrolysés, décomposés par fermentation ou par l'action de certaines enzymes, thérapeutiquement actifs, souvent toxique. On peut classifier les glucosides en suivant le classement botanique des espèces dans lesquelles ils sont présents.

III.2.1.7 Les vitamines

De nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines, ce sont des substances qui agissent à faibles doses, on distingue les vitamines hydrosolubles et liposolubles. La carotte est riche en bêta-carotène (pro vitamine A) et le citronnier notamment contient des doses élevées de vitamine C (Chevallier, 2001).

III.2.1.8 Les minéraux

De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Ils sont nécessaires à diverses fonctions métaboliques, à la différence des enzymes, non catalyseurs. Les plantes, notamment celles issues de l'agriculture biologique, tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme.

CHAPITRE II : Infection nosocomiale

I. Définition générale et prévalence

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini les infections nosocomiales (IN), appelées aussi « infections hospitalières » comme des infections acquises pendant un séjour à un établissement de santé et qui n'étaient ni présentes ni en incubation au moment de l'admission du patient (Mayon-White et al., 1988). Lorsque la situation de l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire (OMS, 2002).

Jusqu'au milieu des années 1980, le risque infectieux nosocomial était sous-estimé. Ce risque a été longtemps négligé en Afrique sub-saharienne, même si la prévalence des infections nosocomiales est plus élevée que dans les pays développés. La prise de conscience de la réalité de ce phénomène, dans un contexte d'amélioration de la qualité des soins, a conduit à ériger la maîtrise du risque infectieux nosocomial en véritable priorité sanitaire (Pittet et al., 2008).

Les infections nosocomiales constituent l'une de dix principales causes de mortalité dans le monde. L'OMS estimait en 2009 que 1,4 millions de personnes étaient malades dans le monde à cause des infections contractées en milieu hospitalier. Ces infections touchent 5 à 10 % des patients (WHO, 2009). La prévalence des infections nosocomiales (IN) est de 10,5 % au Canada, 6,7 % en France, 6,2 % en Belgique et 4,5 % aux USA (Vrijens et al., 2009).

Dans certains pays en développement, le taux le plus élevé de prévalence de ces infections est estimé à 25,0 % (Vrijens et al., 2009). C'est le cas de l'Albanie en 2009 où la prévalence des IN était de 19,1% ; en Tunisie avec 17,8 % et au Brésil avec 14,0 % (WHO, 2009). Au Maroc, une étude réalisée en 2006 a montré un taux d'infections nosocomiales de 17,8 % (Dridi et al., 2006). La prévalence des IN est nettement plus élevée dans les pays en développement que dans les pays développés.

II. Facteurs entrant en jeu dans l'apparition des infections nosocomiales

II.1 Agents microbiens

Pendant le séjour dans un établissement hospitalier, le patient est exposé à divers agents microbiens. La probabilité qu'une exposition conduise à la maladie dépend en partie des caractéristiques du micro-organisme en cause, y compris sa virulence intrinsèque, sa résistance aux anti-infectieux, et de la quantité de matériel infectieux (inoculum).

Une grande variété de parasites, de virus, de bactéries et de champignons peuvent être à l'origine d'IN (Lemsanni, 2019; Maoulainine et al., 2014). Ces agents peuvent provenir de la propre flore du patient, ce qu'on appelle infection endogène ou d'une autre personne présente dans l'hôpital : infection croisée. Il peut aussi s'agir de germes présents sur un objet ou dans une substance récemment contaminée par une autre source humaine d'infection (infection environnementale).

II.2 Vulnérabilité du patient

Plusieurs facteurs personnels entrent en jeu dans l'acquisition de l'infection :

- L'âge ;
- L'état immunitaire ;
- Les maladies sous-jacentes et les interventions diagnostiques et thérapeutiques chez le nourrisson et la personne âgée ;
- Les patients atteints de maladies chroniques telles que l'insuffisance rénale, tumeurs malignes, diabète, ou syndrome d'immunodéficience acquise (sida), sont plus vulnérables aux infections opportunistes ;
- Certains traitements (antibiotiques qui déséquilibrent la flore des patients et sélectionnent les bactéries résistantes ; traitements immunosuppresseurs) ;
- Les lésions de la peau ou des muqueuses permettent aux micro-organismes d'échapper aux mécanismes naturels de défense ;
- La malnutrition constitue également un risque.

II.3 Facteurs environnementaux

Les hôpitaux constituent un environnement dans lequel se trouvent rassemblées des personnes chez lesquelles le risque d'infection est accru et des personnes infectées. Les patients atteints d'infections ou porteurs de micro-organismes pathogènes, lorsqu'ils sont hospitalisés, sont des sources potentielles d'infection pour les autres patients et pour le personnel. Ceux qui contractent une infection à l'hôpital constituent à leur tour une source d'infection. Les germes présents dans la flore microbienne peuvent contaminer des objets, des dispositifs médicaux et des substances qui entrent ensuite en contact avec des sites anatomiques vulnérables.

III. Mesure de prévention des infections nosocomiales

La prévention des infections nosocomiales est complexe car la plupart d'entre elles relève de plusieurs facteurs. Cela implique une maîtrise de tous les facteurs liés à la situation médicale des patients, la qualité des soins et la sécurité de l'environnement hospitalier pour assurer une vigilance renforcée (Hugo & Didier, 2005). Cette vigilance accrue autour de l'application de plusieurs pratiques simples et d'efficacité démontrée :

III.1 Mesures institutionnelles

- Politique et stratégie de lutte contre les IN ;
- Fonctionnement du CLIN et de l'équipe opérationnelle en hygiène hospitalière ;
- Evaluation et accréditation dans le domaine du risque infectieux (politique qualité - gestion du risque).

III.2 Mesures épidémiologiques

- Surveillance épidémiologique des IN ;
- Gestion et maîtrise d'un phénomène épidémique ou inhabituel ;
- Suivi d'indicateurs microbiologiques (bactéries multi-résistantes).

III.3 Mesures concernant la formation

- Formation initiale des personnels médicaux et paramédicaux ;
- Formation continue autour des thèmes :
 - bon usage des antibiotiques
 - accidents par exposition au sang (AES)

III.4 Mesures concernant l'architecture, les locaux, les circuits et les matériaux

- Architecture, organisation spatiale et fonctionnelle ;
- Entretien et désinfection quotidien des locaux Circuits des personnes, des eaux, et de l'air par des méthodes adéquates ;
- Maîtrise de l'élimination des déchets d'activité de soins.

III.5 Mesures d'hygiène de base

- Lavage des mains, tenue vestimentaire et le port des gants ;
- "Précautions générales standard" (vis- à vis des risques de transmission par le sang, les liquides biologiques ou tout autre produit d'origine humaine).

III.6 Mesure d'hygiène du patient

- limiter la durée d'hospitalisation et a un usage optimal des anti-infectieux (Lemsanni, 2016; OMS, 2002).

III.7 Mesures d'hygiène des soins

- Utilisation des antiseptiques ;
- Prévention des infections, site par site ;
- Prévention de la diffusion des bactéries multi résistantes aux antibiotiques.

III.8 Mesures concernant les dispositifs médicaux

- Utilisation de l'usage unique ;
- Pré-désinfection, nettoyage, désinfection ou stérilisation.

IV. Résistance bactérienne

La résistance bactérienne aux antibiotiques ou antibiorésistance c'est une caractéristique importante des infections nosocomiales, elle est considérée comme un problème majeur compliquant le traitement des infections bactériennes surtout par la dissémination des souches multi-résistantes (Ventola, 2015). Une souche est dite résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notablement plus élevée que la concentration atteignable *in vivo* (Granier & Jarlier, 1996).

Il existe deux types de résistances: la résistance naturelle qui survient lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique, et la résistance acquise qui survient lorsque seulement quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique deviennent résistantes.

Chapitre III : Stress oxydatif

I. Définition

On peut définir le stress oxydatif comme étant un déséquilibre entre la présence de radicaux libres et la capacité de l'organisme à neutraliser leur action par les systèmes antioxydants (Boyd et al., 2003). La production d'espèces réactives de l'oxygène est utile mais peut être néfaste pour l'organisme lors d'une production excessive et en l'absence de mécanismes de défense. Ce déséquilibre peut endommager quelques macromolécules telles que les acides nucléiques, protéines et lipides, conduisant à l'apparition des diverses maladies (Pisoschi & Pop, 2015; Smaga et al., 2015).

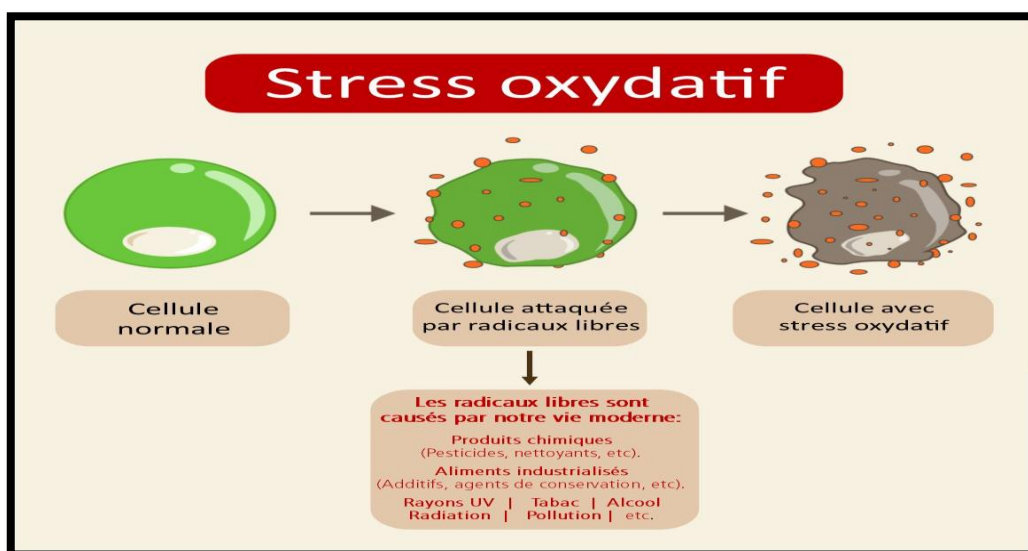


Figure 8: Schéma présentatif du stress oxydatif

II. Radical libre

Un radical libre ou espèce réactive de l'oxygène est un fragment obtenu par scission d'une molécule et qui possède un électron célibataire, non apparié, ce qui lui confère une grande réactivité chimique (Vansant, 2004). C'est donc une molécule instable, très réactive avec les molécules environnantes. Un radical libre tente de céder ou de gagner un électron et transmet ses propriétés à une autre molécule, d'où des réactions en chaîne (Goudable & Favier, 1997).

Dans l'organisme, et plus précisément au niveau des mitochondries, l'oxygène est à l'origine de la formation des espèces réactives de l'oxygène parmi lesquels se trouvent des radicaux libres. Des radicaux libres se forment lors de différents processus biologiques: stress, respiration, inflammation. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, la molécule de dioxygène gagne un électron et forme un superoxyde.

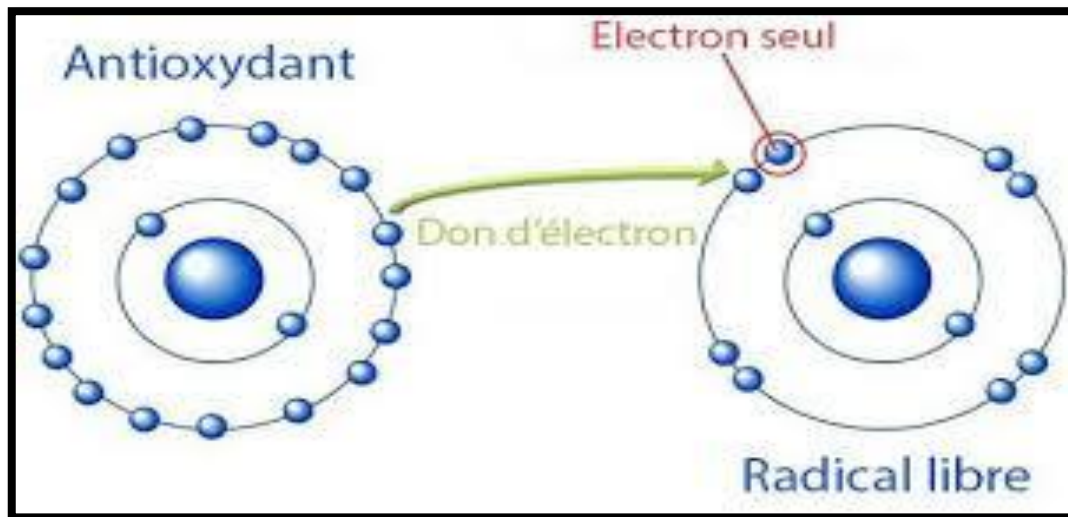


Figure 9: Schéma présentatif de la neutralisation des radicaux libres par un antioxydant

III. Les effets protecteurs des antioxydants

La fabrication des radicaux libres peut être augmentée face à certains facteurs comme la pollution, le tabac ou les rayons UV du soleil. Cet excès des espèces réactives de l'oxygène peut entraîner un vieillissement prématuré des cellules, ou bien certaines maladies comme les cancers, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires etc. En neutralisant les radicaux libres, les antioxydants interviennent pour empêcher la dégradation des cellules et protègent ainsi l'organisme.

IV. Rôles physiologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène présentent un paradoxe dans leurs fonctions biologiques. D'une part, ils préviennent les maladies en aidant le système immunitaire par la médiation de la signalisation cellulaire et en jouant un rôle essentiel dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent endommager des macromolécules importantes dans les cellules.

V. Oxydation des macromolécules

V.1 Peroxydation des lipides

Appelé encore lipoperoxydation est l'oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes. Au sein des cellules et des organismes la peroxydation lipidique est responsable de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation.

La réaction incontrôlée des ERO avec les lipides membranaires conduit à une génération innombrable de radicaux libres produits dans une réaction en chaîne, qui provoque la détérioration des membranes (Kardeh et al., 2014; Pisoschi & Pop, 2015).

V.2 Oxydation des protéines

Les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les espèces réactives d'oxygène. Cette réaction d'oxydation peut se réaliser de deux façons soit en cassant les liaisons peptidiques tout en modifiant ainsi la chaîne protéique ou en provoquant des modifications par addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Les principaux produits de l'oxydation des acides aminés constitutifs des protéines sont les carbonyles qui sont utilisés comme marqueurs du stress oxydant. Les protéines oxydées deviennent très hydrophobes, par extériorisation des zones hydrophobes centrales et la formation des amas ou par suppression de groupements amines ionisables (Goto & Radak, 2013).

La plupart des acides aminés sont sensibles à l'oxydation, en particulier, la méthionine et la cystéine sont facilement oxydables (Raedschelders et al., 2012). L'oxydation de la proline, l'arginine et la lysine provoque des marqueurs de dérivés carbonylés (Pisoschi & Pop, 2015). L'oxydation des protéines est impliquée dans l'étiologie de plusieurs maladies telles que les maladies neurodégénératives, la dystrophie musculaire, l'athérosclérose, et le vieillissement (Pisoschi & Pop, 2015; Favier, 2003; Moniczewski et al., 2015).

V.3 Oxydation des glucides

Les ERO ciblent le plus souvent le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation du glucose est directe et donne des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine pour aboutir à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG). Ces derniers en présence de métaux de transition favorisent la libération d'O₂· et peuvent causer la rétinopathie chez les personnes diabétiques (Halliwell & Gutteridge, 1995).

V.4 Oxydation de l'ADN

Les espèces réactives d'oxygène causent des dommages à l'ADN et aboutissent au vieillissement et à la mort cellulaire (Saito et al., 2015). Le radical hydroxyle peut causer des dommages oxydatifs qui peuvent aboutir une perturbation des processus de réplication, de transcription et de traduction (Cardey, 2009; Favier, 2003; Cardey, 2009). Une des altérations fréquentes de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG) qui est considéré comme un marqueur de carcinogénèse et de lésions nucléiques (Pisoschi & Pop, 2015; Sugamura & Keane, 2011).

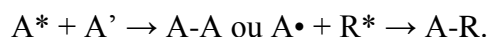
VI. Antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme un agent capable, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi inhiber ou retarde l'oxydation de ces substrats (Rahal et al., 2014). Ils sont présents sous deux formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, aussi bien que pour participer à leur élimination.

VI.1 Les antioxydants primaires

Les antioxydants primaires permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique avec la relation suivante: $AH + R\bullet \rightarrow A\bullet + RH$.

La molécule AH est antioxydante si le radical formé $A\bullet$ est plus stable. La stabilité du radical $A\bullet$ peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires :



VI.2 Les antioxydants secondaires

Ils assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydroperoxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin de séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique.

CHAPITRE IV : Effet hépatoprotecteur et hépatotoxicité

I. Anatomie et rôle du foie

I.1 Anatomie du foie

Le foie chez l'homme fait partie de l'appareil digestif et c'est l'organe abdominal le plus gros, pesant en moyenne 1.5 kg et constitue 2 % de la masse corporelle. Il est constitué de deux parties, le lobe droit (2/3 du volume) et le lobe gauche (1/3 du volume). Le lobule hépatique (figure 10) se présente sous forme d'un hexagonal. Chaque lobule est formé par plusieurs cellules: hépatocytes, cellules sinusoidales, cellules de Kupffer, et cellules stellaires (Malarkey et al., 2005).

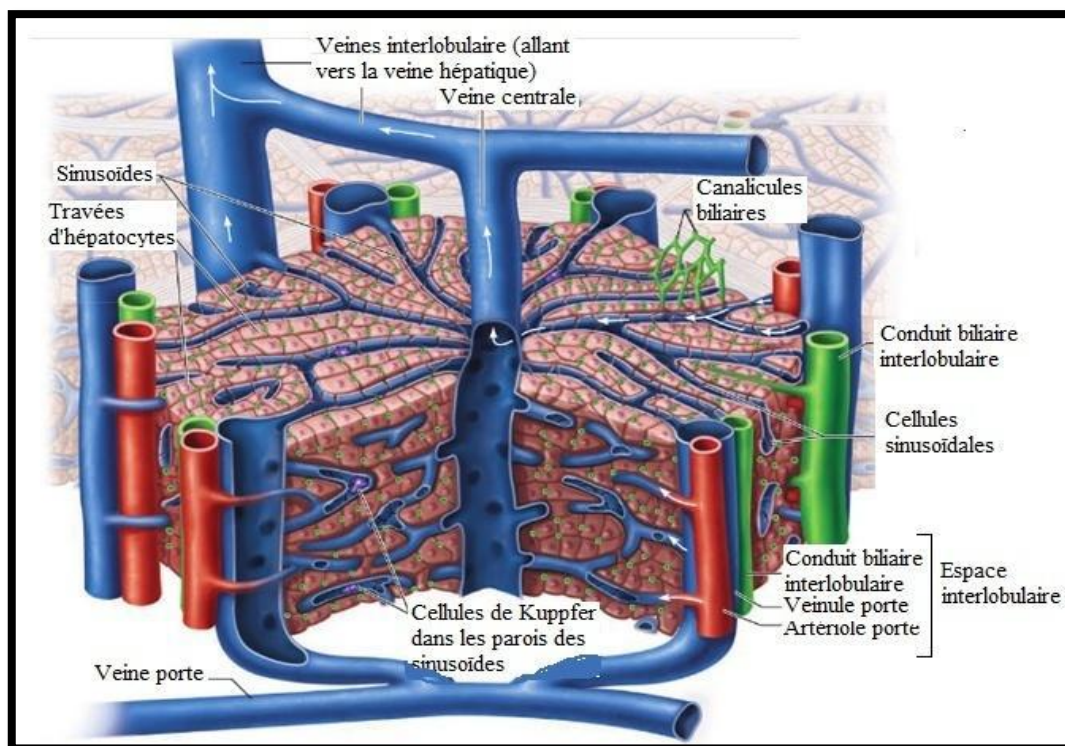


Figure 10: Structure d'un lobule hépatique.

Le foie est irrigué principalement par la veine porte et l'artère hépatique. Il est traversé par 1.4 l de sang pendant chaque minute. La veine porte est responsable de l'apport des nutriments de l'intestin tandis que l'artère hépatique est responsable de l'apport d'oxygène. Le retour veineux est assuré par les veines hépatiques. Ces derniers sont responsables de l'évacuation du sang qui se jettent ensuite dans la veine cave inférieure qui retourne au cœur (Dooley et al., 2011).

I.2 Rôle du foie

Le foie joue un rôle vital dans la régulation de divers processus physiologiques de l'organisme. Il est impliqué dans plusieurs fonctions vitales, notamment les fonctions suivantes, la sécrétion biliaire, le stockage des vitamines et le métabolisme des nutriments tels que les glucides, les carbohydrates, les protéines et les lipides et l'excrétion des déchets. Il a une grande capacité de désintoxiquer les xénobiotiques et de synthétiser des molécules utiles (Shanmugasundaram & Venkataraman, 2006). Le foie participe à toutes les voies biochimiques de la croissance, du métabolisme, du système immunitaire, et de la reproduction (Ward & Daly, 1999). En outre, il est considéré comme l'organe central de la détoxification des substances toxiques exogènes et endogènes (Dufour et al., 2011). Il gère le métabolisme et l'excrétion des médicaments et des substances toxiques du corps. Il assure la protection contre les substances étrangères en les éliminant (Saleem et al., 2010).

II. Relation entre stress oxydant et maladies hépatiques

Le stress oxydant survient lors d'un déséquilibre entre la génération et l'élimination des radicaux libres. Ce déséquilibre est considéré comme facteur principal dans la pathogenèse des maladies hépatiques et dans leur progression vers la fibrose et la cirrhose (Cohen et al., 2011). La chaîne respiratoire mitochondriale représente la principale source des espèces réactives oxygénées (ERO) et des espèces réactives azotées (RNS). L'augmentation de l'expression et de l'activité des cytochromes, principalement le CYP2E1, représente également une source importante de production d'ERO, au niveau du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. En outre, les ERO/RNS peuvent être formés suite au métabolisme de certains médicaments par les cytochromes au niveau des hépatocytes (Aubert et al., 2011).

III. L'hépatotoxicité

L'hépatotoxicité ou la toxicité du foie est définie comme étant le pouvoir qu'une substance provoque des dommages au foie. L'hépatotoxicité se manifeste sous forme d'hépatite ou encore de nécrose, dans les cas plus sévères. La stéatose hépatique survient lorsque le gras a s'accumule dans le foie (Tillmann, 2020).

III.1 Hépatotoxines

Les hépatotoxines sont des molécules chimiques, qui provoquent des atteintes hépatiques plus ou moins graves. Plusieurs médicaments et composés chimiques ont été rapportés comme des agents hépatotoxiques parmi lesquels on peut citer, le chloroforme, le benzène, le sélénium, l'éthionine, et la thioacétamide et le tétrachlorure de carbone (CCl_4) (Timbrel, 2009).

III.1.1 Le tétrachlorure de carbone (CCl_4)

Le tétrachlorure de carbone une molécule simple soluble dans les lipides et est par conséquent très bien répartie dans tout le corps, cependant, son effet toxique majeur est sur le foie, quelle que soit la voie d'administration. Le CCl_4 est utilisé pour induire l'hépatotoxicité expérimentale car il est le plus communément utilisé d'une part et d'autre part, il induit une pathologie rencontrée en clinique : une nécrose hépatique centrolobulaire, une stéatose hépatique et des nécroses tubulaires rénales (El-Hadary et al., 2019). La toxicité de CCl_4 dépend principalement de l'activation métabolique du cytochrome P450, c'est la raison pour laquelle le foie est son cible principale (Dong et al., 2016).

La nécrose hépatique provoquée par CCl_4 est considérée comme étant bioactivée par les cytochromes P450, ce qui conduit à la formation de radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ERO), ce qui entraîne l'oxydation des protéines, la peroxydation des lipides, et l'endommagement de la membrane hépatocellulaire (Elgawish, Rahman, & Abdelrazek, 2015). Ce processus est accompagné par la libération de médiateurs inflammatoires par les macrophages hépatiques activés, qui sont censés potentialiser l'atteinte hépatique induite par CCl_4 (El-Hadary et al., 2019).

III.2 Mécanismes de l'hépatotoxicité

Les principaux mécanismes par lesquels les xénobiotiques stéatose semblent être hépatotoxiques sont généralement, le stress oxydatif, la production de métabolites toxiques par les cytochromes P450, la perturbation du métabolisme glucidolipidique et la dysfonction mitochondriale. Les facteurs augmentant le risque d'hépatotoxicité comme l'obésité et la stéatohépatopathie associée peuvent être joué un rôle important, pour certains xénobiotiques. Certains xénobiotiques comme l'alcool et quelques médicaments peuvent augmenter la progression de la stéatose en stéatohépatite non-alcoolique (NASH) ou aggraver chroniquement la stéatose préexistante (Fromenty, 2014).

Les mécanismes d'aggravation de la stéatose peuvent être variés; réduction de la sortie des lipoprotéines de très basse densité (VLDL), inhibition de la β -oxydation et stimulation de la lipogenèse. D'autres xénobiotiques comme le CCL₄, le thioacétamide et certaines médicaments (paracétamol, halothane) peuvent provoquer des hépatites aiguës sévères (El-Hadary et al., 2019; Tillmann, 2020). Un mécanisme qui est important dans cette situation est l'induction préexistante de l'activité du CYP2E1 hépatique principalement observée au cours de l'obésité (Fromenty, 2014) .

III.3 Marqueurs de la fonction hépatique

La fonction hépatique peut être évaluée par le dosage biochimique de plusieurs enzymes hépatique.

III.3.1 Transaminases

Enzymes qui accélèrent le transfert d'un groupement aminé d'un acide aminé sur un acide cétonique, l'augmentation de leur taux dans le sang est en effet révélatrice d'un certain nombre d'affections ; leur mesure permet donc d'orienter le diagnostic hépatique.

III.3.1.1 Alanine-aminotransférase (ALAT)

L'ALAT se retrouve principalement dans le foie et les reins et en faible concentration, dans les cellules des muscles striés et dans les globules rouges. Le taux sériques d'ALAT est inférieur à 15 UI/L en cas normal et augmente lors d'une hépatite virale. Il augmente aussi, dans de moindres proportions, au cours d'autres atteintes hypatiques (cancer, hépatite toxique, cirrhose, obstruction biliaire, etc.) et au cours de l'infarctus du myocarde (Yang et al., 2009).

III.3.1.2 Aspartate-aminotransférase (ASAT)

L'ASAT se présente principalement dans le foie et les muscles striés et dans les hématies. Son taux sanguin est normalement inférieur à 20 UI/L. Ils s'élèvent en cas de destruction des cellules, en particulier en cas d'infarctus du myocarde et de myopathie. Lors d'une destruction des cellules hépatiques, le taux d'ASAT augmente moins que celui d'ALAT (Kamisan et al., 2013).

III.3.2 Phosphatases alcalines (PAL)

Il s'agit d'un groupe d'enzymes dont le rôle est de catalyser le dédoublement des esters phosphoriques et dont l'action optimale se fait à un pH alcalin. Ces enzymes se retrouvent dans de nombreux tissus. Les taux des phosphatases alcalines sériques augmentent en cas de cholestase. Cette augmentation est due à une production accrue de phosphatases alcalines par l'hépatocyte soumis à la cholestase (Ozer et al. 2008).

III.3.3 Bilirubine totale

La bilirubine non conjuguée, liée à l'albumine est présente dans le plasma, provenant de la dégradation de l'hème par le système réticulo-endothélial. Son taux normal est entre 9 et 12 mg/L. Elle est captée par l'hépatocyte et véhiculée par les protéines transporteuses jusqu'aux sites de conjugaison. Une hyperbilirubinémie de type non conjuguée peut être due à un excès de production (hémolyse), à un déficit du transport ou plus souvent à la glucurono-conjugaison intra-hépatocytaire. Une hyperbilirubinémie conjuguée est liée à un trouble de l'excrétion ou du drainage biliaire. Cependant, une hyper-bilirubinémie de type mixte peut être le fait de perturbations complexe de l'hépatocyte (Alagille, Odievre, & Gautier, 1975).

IV. L'effet Hépatoprotecteur des plantes

La maladie hépatique chronique représente l'un des problèmes majeurs de la santé mondiale. Ainsi, les médicaments synthétiques disponibles pour traiter les troubles hépatiques peuvent causer des dommages au foie (Tillmann, 2020). Par conséquent, les recettes de plantes sont devenues de plus en plus populaires, et leur utilisation est largement répandue (Appiah et al., 2017). Plusieurs études ont rapporté l'activité hépatoprotectrice des plantes médicinales (Nawaz et al., 2014; Bakour et al., 2018). En outre, les plantes contiennent une variété de substances hépatoprotectrices à savoir les polyphénols, monoterpènes, les coumarines, glycosides,

alcaloïdes et xanthines (El-Hadary et al., 2019). Ainsi, environ 160 constituants chimiques de 100 plantes médicinales ont un effet hépatoprotecteur (Saleem et al., 2010). Il a été rapporté que les plantes médicinales préviennent les dommages causés au foie par l'inhibition des activités plasmatiques de l'ASAT, l'ALAT, le bilirubine, l'albumine et de phosphatase alcaline (Dey et al., 2015; Abirami et al. , 2015).

CHAPITRE V : Présentation des plantes étudiées

I. Historique

A l'époque, le thym était considéré comme une plante importante dans l'Égypte ancienne. Les Égyptiens l'employaient dans le processus de momification de leurs morts car il est avéré que le thym a des propriétés conservatrices. et c'est ainsi qu'il est utilisé de nos jours pour conserver les pièces de collections botaniques et anatomiques.

Les Grecs utilisaient aussi cette herbe en la brûlant pour purifier l'air et chasser les insectes, ils la considéraient aussi comme l'« ennemi du poison » et s'en servaient pour l'assainissement des chambres de malades.

Les Romains, de leur part brûlaient le Thym pour éloigner les créatures venimeuses, et l'utilisaient aussi pour aromatiser le fromage (Charles, 2013).

II. Généralités sur le thym

Le genre *Thymus* connu dans tout le monde, vient probablement du latin "*Thymus*" qui signifie « parfumé » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage ou du Grec "*Thymos*" qui signifie "courage" ou "force" (Stahl-Biskup & Sáez, 2002). Au Maroc, elle est appelée Zaâtar ou Zaâitra par les populations locales en arabe et Azukni ou Tazuknite en berbère.

Le Thym, une plante aromatique de grande valeur aux usages multiples, originaire des régions méditerranéennes, l'Asie, l'Europe du Sud et l'Afrique du Nord (Maksimović et al., 2008). Il est parmi les huit genres les plus importants en ce qui concerne le nombre d'espèces incluses dans la famille Lamiacées, regroupant environ 350 espèces, sous-espèces et variétés de plantes (Alaoui et al., 2018). Au Maroc, il y a vingt et une espèces de thym dont 15 sont endémiques, tel que *Thymus riatarum*, *Thymus bleicherianus*, *Thymus maroccanus*, *Thymus Zygis* etc. (Fennane et al., 2007).

III. Description morphologique du thym

Le thym véritable est un sous-arbrisseau vivace et dense qui atteint une hauteur de 40 cm, typiquement méditerranéen, très aromatique, appréciant les terrains secs et ensoleillés. Les feuilles sont petites, ovales, aux bords enroulés, aux tons vert grisâtre. Ses tiges ligneuses à la base mais herbacées dans leur partie supérieure, dressées et tortueuses. Les fleurs de couleur blanche à rose, les petites fleurs sont réunies par trois à l'aisselle des feuilles supérieures. Carpelles lisse, ovoïdes (Spichiger et al., 2002).



Figure 11: Thymus

IV. Classification

La classification botanique du *Thymus* est présentée dans le Tableau suivant.

Tableau 2: Classification botanique du *Thymus* (Kholkhal, 2014)

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheobionta
Sous embranchement	Magnoliophita
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Thymus</i>

V. Répartition géographique

La majorité des espèces du genre *Thymus* se concentrent dans la région méditerranéenne (Nickavar et al., 2005). Le *Thym* est réparti entre l'Europe du sud, l'Asie et la méditerranée (Figure 12). Ce genre est très répandu dans le Nord-africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye) ainsi que dans les montagnes d'Ethiopie, les montagnes d'Arabie du Sud-Ouest et l'Egypte. Passant par les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à l'Himalaya, il peut même atteindre les limites de la région tropicale et du Japon. Dans le nord, il pousse en Sibérie et en Europe nordique (Martin, 2014).

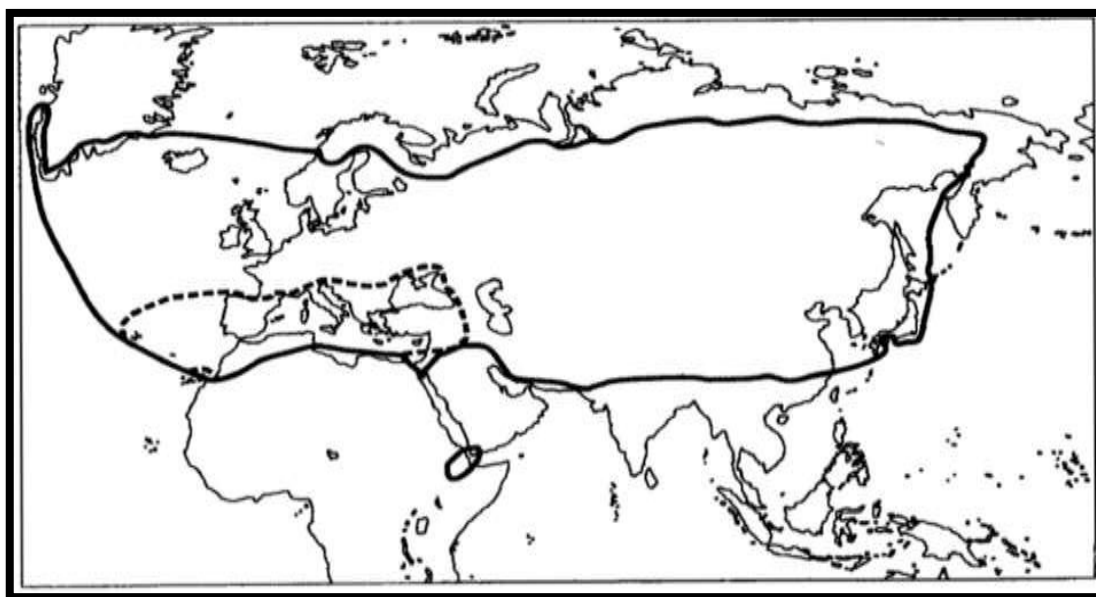


Figure 12: Distribution géographique du Thym dans le monde (Morales, 1997).

VI. Exigence écologique

Les variétés de Thym ont à peu près les mêmes besoins en termes d'habitat et de soins. Elles sont très résistantes, elles se développent bien dans un climat tempéré à chaud, sec, ensoleillé (Dauqan & Abdullah, 2017). La période de végétation de cette plante est de 200 à 210 jours (Pirbalouti et al., 2013) . Les espèces de Thym sont plus efficaces dans les sols grossiers et rugueux. Il est très important que les sols soient légers et bien drainés pour pouvoir déployer pleinement toutes ses vertus. Bien que le Thym soit résistant au froid, il peut être protégé en hiver dans les endroits exposés en le recouvrant.

VII. Utilisation du thym

Le Thym a pris une très grande importance dans la médecine en raison de ses propriétés pharmacologiques et biologiques. Le Thym est l'une des plantes les plus utilisées comme épices et extraits à fort pouvoir antibactérien et anti inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle (Labiad et al. 2017; Oualilalami et al., 2013).

En médecine traditionnelle, les feuilles de cette espèce sont utilisées sous plusieurs formes :

- En infusion contre les affections de voies respiratoires, la toux, et le rhume,
- En tisane tonique,

- En décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et les troubles de l'estomac et l'intestin,
- 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. (Ghelichnia, 2016; Labiad et al., 2017).

Son huile est parmi les dix premières huiles essentielles du monde. Elle est antiseptique et utilisée à ce titre pour soigner les infections pulmonaires tel que la bronchite et l'asthme. Son pouvoir antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée (Fadili et al., 2015).

De nos jours, le Thym 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 appréciée récemment par la force et les vertus antivirales (Pirbalouti et al., 2013; Javed et al., 2013). Les huiles et les extraits de Thym sont largement utilisés dans la cuisine, en tant qu'herbe aromatique et aussi grâce à ses propriétés conservatrices l'industrie pharmaceutique, cosmétique et en parfumerie pour l'aromatisation (Barati et al., 2013). Des études récentes ont montré que les espèces de Thym ont un fort pouvoir antibactérien, antifongique, antiviral, antiparasitaire, spasmolytique et antioxydantes. (Aouam et al., 2018; Ghelichnia, 2016).

Partie II

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel

I.1 Matériel végétal

Trois plantes appartenant au genre de *Thymus* ont été l'objectif de cette étude vu leur utilisation dans la médecine traditionnelle marocaine d'une part et le manque de travaux de recherche sur les propriétés biologiques de ces trois plantes d'autre part.

Les plantes du *Thymus riatarum* et *Thymus blecherianus* ont été récoltées durant la période de floraison janvier dans la région de Taza en 2016. La plante du *Thymus citriodorus L* a été récoltée de Taza pendant le mois de mars 2016. Ces espèces ont été identifiées par les Professeurs Amina Bari ; Botaniste de la faculté de sciences Dhar Mehraz, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès et Hassan Fougrach; Botaniste de la faculté de sciences Ben M'sik, Université Hassan 2 casablanca.

I.2 Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des rats *Wistar* adultes mâles normaux pesant entre 150-200 g, élevés dans l'animalerie du laboratoire PPSE ou ils ont séjourné sous les conditions suivantes : une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ d'humidité et à cycle naturel de la lumière. Les animaux ont libre accès à l'eau et à l'alimentation. Les animaux sont soumis à jeun pendant une nuit avant leur utilisation. Le soin et la manipulation des rats étaient en conformité avec les normes directives internationalement reconnue pour l'utilisation des animaux.

I.3 Souches bactériennes

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des plantes étudiées a été testée sur six souches, d'origine hospitalière, responsables d'infections nosocomiales, qui ont été isolés des patients hospitalisés au service de réanimation du Centre Hospitalier Universitaire à Fès. Il s'agit de bactérie Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri* et *Acenitobacter*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*). Le choix de ces

souches est basé sur leur fréquence élevée à infecter les patients hospitalisés au service de réanimation et leur résistance à divers types d'antibiotiques utilisés pour le traitement des infections nosocomiales.

- ***Staphylococcus aureus*** : est une bactérie appartenant au groupe des cocci à Gram positif qui tend à se grouper en amas. Elle appartient aux espèces les plus couramment isolées en milieu hospitalier. *Staphylococcus aureus* occupe une place importante dans les infections communautaires (Wertheim et al., 2005; Vincenot et al. 2008; Chambers, 1997).
- ***Escherichia coli*** (gram négatif), mobile grâce aux flagelles péritriches. C'est une bactérie présente dans l'intestin des êtres humains et de certains animaux. Elle peut être l'origine des infections urinaires ou digestives ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales (Mariani-Kurkdjian & Bingen, 2012; Fritze & Pukall, 2011).
- ***Pseudomonas aeruginosa*** est un bacille qui réagit négativement à la coloration de Gram (Gram négatif). Elle est très résistante, et souvent responsable des infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement vu sa résistance à de nombreux antibiotiques (Fritze & Pukall, 2011).
- ***Klebsiella pneumoniae*** : est une bactérie immobile et capsulée. Elle est commensale de l'Homme et des animaux. Considérée comme l'un des plus importants agents pathogènes opportunistes qui causent des infections nosocomiales et communautaires (urinaires et respiratoires) (El Fertas-Aissani et al., 2013).
- ***Acinetobacter*** : Les souches du genre *Acinetobacter* sont constituées de bactéries à Gram négatif, non fermentantes, non sporulées, coccoïdes, immobiles, aérobies strictes, à métabolisme respiratoire strict, catalase positive et oxydase négative. Elles sont connues comme étant capables de former des inclusions intracellulaires sous des conditions de stress.
- ***Citrobacter koseri*** : C'est un bacille de forme allongée qui se déplace à l'aide d'un flagelle comme les spermatozoïdes, naturellement présente dans le tube digestif des humains et des animaux, mais qui se trouve aussi dans les aliments, l'eau ou le sol. Cette bactérie occasionne des infections urinaires mais peut également engendrer des infections nosocomiales plus graves (Murray et al., 2010).

I.4 Antibiotiques

Des disques d'antibiotiques sont déposés sur gélose inoculée par les bactéries afin d'être utilisés comme des témoins négatifs de la croissance bactérienne : Imipénème (IMP), Amoxicilline (AMX), Céfotaxime (CTX), Kanamycine (K), Pénicilline (P), Ampicilline (AMP), Norfloxacine (NOR), Pristinamycine (PT) (Figure 13).



Figure 13: Disques imprégnés d'antibiotique pour réalisation d'antibiogramme

II. Méthodes

II.1 Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'obtention des huiles essentielles à savoir l'entraînement à la vapeur, l'hydro-distillation...etc. Dans cette étude, nous avons utilisé la technique d'hydro-distillation, c'est une technique d'extraction qui peut être utilisée pour extraire des espèces insolubles dans l'eau.

L'extraction des huiles essentielles de *Thymus riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L* a été réalisée par un hydrodistillateur au sein du laboratoire de la physiologie végétale à la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès. Cette technique consiste à introduire 100 g de la partie aérienne de chaque plante avec 500 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 3 heures (Fig. 14). Les vapeurs chargées d'huiles essentielles, en traversant le réfrigérant vont se condenser et se séparent en deux phases liquides par différence de densité : une phase aqueuse (eau aromatique) et une phase organique constituée par l'huile essentielle.

L'huile est finalement mise dans un tube taré afin de calculer le rendement. Et conservée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur usage (Ayoughi et al., 2011; Chanthaphon et al., 2008).



Figure 14: Montage expérimental d'hydrodistillation.

II.1.1 Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait obtenu, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Le rendement est calculé comme suit :

$$R(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100$$

Avec

R (%) : rendement en huile essentielle en g pour 100 g de matière sèche.

m : masse d'huile essentielle récupérée en g.

m_0 : masse de matière sèche distillée en g.

II.2 Extraction par les solvants organiques

II.2.1 Extraction par macération

10 g de poudre de feuilles des trois espèces sélectionnées est macérée à température ambiante dans 50 ml de solvants : l'acétate d'éthyle (AE), Méthanol (MeOH), Ethanol (EtOH) et eau (Aq) pendant 24 heures. L'extrait est ensuite filtré sur papier Wattman. Le filtrat est conservé à 4° C jusqu'à une utilisation ultérieure.

II.2.2 Par Soxhlet

La méthode du Soxhlet permet de faire l'extraction par solvant en continu d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide. Dans cette étude, l'extraction par Soxhlet a été effectuée par épuisement du matériel végétal, en utilisant des solvants à polarité croissante : acétate d'éthyle (Ac Eth), méthanol (MeOH), éthanol (EOh) et l'eau (Aq).

Le montage de l'appareil Soxhlet est constitué d'un extracteur qui est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction (50 ml). Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est placé la poudre contenant l'échantillon végétal (5 g) ; puis un réfrigérant est adapté au-dessus de l'extracteur. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon. Après épuisement d'échantillon végétal, Les extraits obtenus ont été filtrés et séchés sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapeur (Fig.15), puis conservés dans un réfrigérateur à 4°C.



Figure 15: Montage expérimental de l'appareil Soxhlet

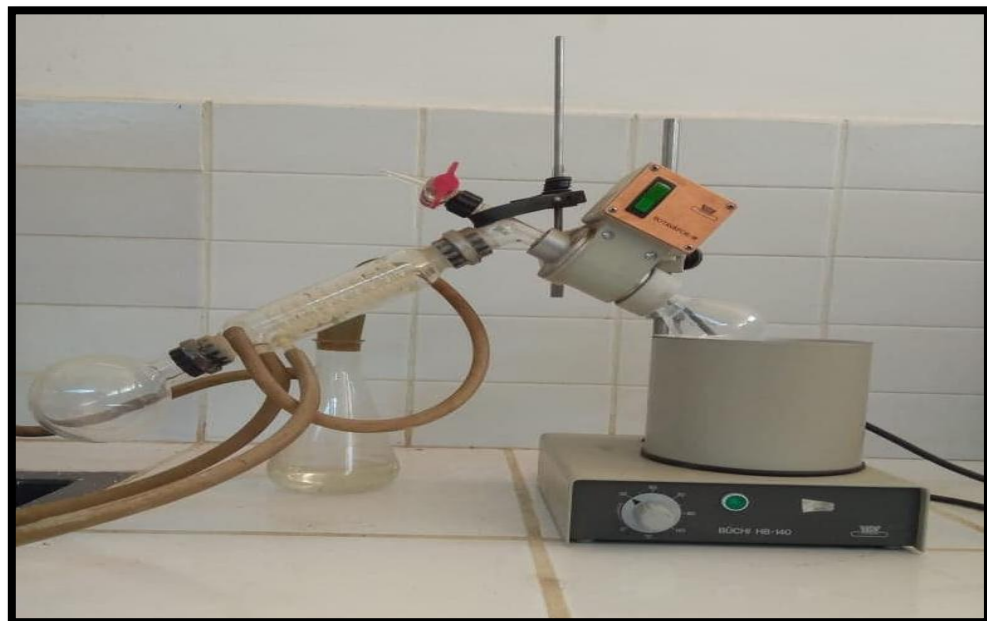


Figure 16: Rotavapeur (Laboratoire LPPSE, FSDM)

II.3 Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Les trois huiles essentielles ont été analysées par la méthode de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Fig. 17). Le principe de cette méthode réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge.

Dans cette étude, Les huiles essentielles ont été analysées par un CPG-SM de modèle Perkin Elmer Clarus MS 500 équipé d'une colonne capillaire en silice fondue ayant une phase stationnaire apolaire de type HP-5MS (60 m x 0.32 mm, 0,25 μm épaisseur de film). Un volume de 1 μl du mélange HE-Hexane 10% a été injecté dans la colonne. L'hélium et le gaz vecteur véhiculent à un débit de 1 ml/min.

La température du four a été maintenue à 40°C durant 2 minutes, puis 2°C/min jusqu'à 250°C et 10 minutes à 250°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 260°C. On a appliqué un split de 10 : 100. Les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV.

La détermination des composés a été réalisée en identifiant leurs indices de rétention (IR) par rapport à ceux d'une série homologue de n-alcanes (C8 à C20) et en comparant leurs spectres de masse à ceux données bibliographiques (Kondjoyan & Berdagué, 1996; Adams, 2007).

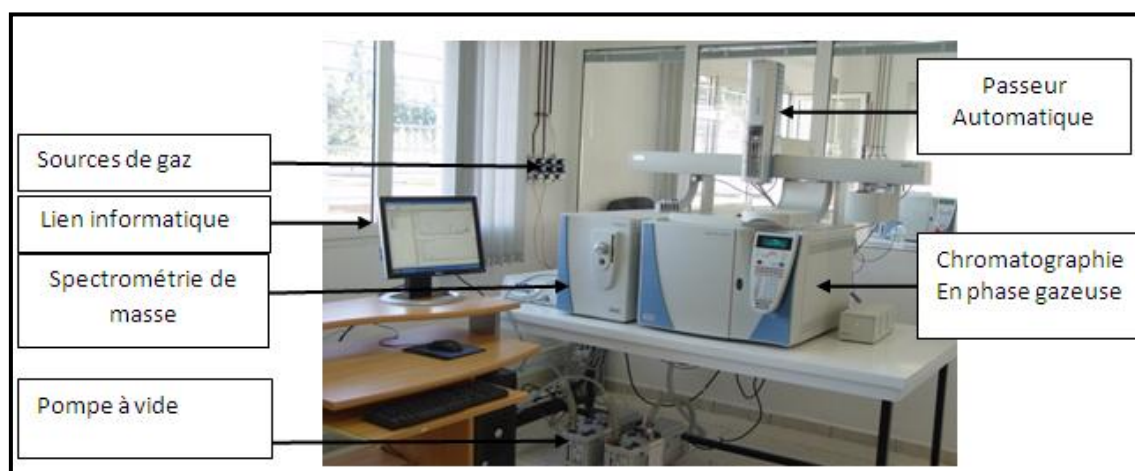


Figure 17: Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (Cité d'innovation Fès).

II.4 Méthodes d'activités biologiques

II.4.1 Criblage phytochimique

Pour mettre en évidence les différents groupes chimiques contenus dans les plantes étudiées, nous avons opté à la réalisation d'un screening phytochimique qui est une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et ou/ de précipitation. Nous nous sommes servis des protocoles décrites dans les travaux antérieurs (Jean. Bruneton, 2009; Koffi et al., 2009; Mogode, 2005).

✓ Alcaloïdes

Les alcaloïdes ont été caractérisés par le réactif de Dragendorff. On introduit dans un tube à essai 1 ml de filtrat issu de l'agitation et de la macération de l'acide sulfurique avec la poudre végétale séchée et filtré, et on ajoute 2 gouttes du réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité ou une coloration rouge orangé indique une réaction positive.

✓ Anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones libres, 1ml de l'ammoniaque dilué a été ajouté à l'extrait chloroformique obtenu. La présence des anthraquinones est confirmée par une coloration de la phase aqueuse au rouge.

✓ Flavonoïdes

La réaction à la cyanidine a été utilisée pour mettre en évidence les flavonoïdes. 5 ml de l'extrait aqueux a été repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique. Après l'ajout de 2 à 3 copeaux de magnésium, une coloration rose orangée ou violacée apparait. L'addition de 1 ml d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes.

✓ Polyphénols

La détection des phénols a été réalisée grâce à la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3). À chaque 2ml de l'extrait de plante on a ajouté 1 ml d'une solution de chlorure ferrique à 1%.

L'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée indique la présence des phénols (Sivaraj, Balakrishnan, M.Thenmozhi, & Venckatesh, 2011).

✓ **Saponines**

Dans dix tubes à essai, nous avons réparti successivement, 1 ml à 10 ml du décocté et on ajuste le volume dans chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Chaque tube a été agité pendant 15 s puis laissé au repos pendant 15 min, une mousse est produite dans chaque tube, dont sa hauteur est supérieure à 1 cm indique la présence des saponines. L'indice de mousse (I) est calculé par la formule suivante :

$$I = \frac{1000}{N} (l)$$

Avec : N est le numéro du tube où la hauteur de mousse est égale à 1 cm. La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (Dohoo, Martin, & Stryhn., 2003).

✓ **Stérols et terpènes**

Les stérols et les terpènes ont été identifiés par la réaction de Liebermann. 5 ml de chaque extrait est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique ; puis nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué un test positif.

✓ **Tanins**

La présence des tannins a été identifiée par ajout de FeCl₃. En ajoutant 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ (1 %) à 1 ml de chaque extrait aqueux, on remarque l'apparition d'une coloration bleu foncé qui indique la présence des tanins.

II.4.2 Evaluation de l'activité antibactérienne

Dans cette étude, nous avons étudié l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* L par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé afin de déterminer le diamètre d'inhibition, ce test se fait de la même manière qu'un

antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des HEs, et par la méthode de microdillution pour calculer la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir des cultures pures et jeunes puis incubées dans un milieu de gélose nutritive. Ces suspensions ont une opacité de 0.5 Mc Farland, ce qui correspond à une densité optique de 0.08-0.13 à une longueur d'onde de 620 nm. La concentration de l'inoculum bactérien devra être à l'ordre de 10^8 UFC/ml (Mello et al., 2014). Cet inoculum sert à ensemercer des géloses de Mueller Hinton (MH) coulées dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm, qui correspond à 20 ml pour les boîtes de diamètre de 90 mm puis séchées à l'étuve à 37°C avant l'emploi.

II.4.2.1 Méthode de diffusion sur disque ou méthode des aromatogrammes

Après avoir bien étalé 1 ml de l'inoculum fraîchement préparé de chaque souche à la surface de la gélose MH. Des disques de papiers filtres (Whatman n°1, 6 mm de diamètre) préalablement stérilisés sont déposés à la surface de l'agar MH après avoir été chargé de 15 µl de l'HE. Après 24h d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré (Hayes & Markovic, 2002). En prenant compte de trois cas :

- Diamètre inférieure ou égale à 6 mm = sensibilité du genre est nulle.
- Diamètre compris entre 6 et 13 mm = sensibilité est modérée.
- Diamètre supérieure ou égale à 13 mm = germe est très sensible.

Des antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatogrammes. Des disques sans HEs sont déposés sur gélose inoculée pour servir de témoin positif de croissance des bactéries et de s'assurer de l'état et de la conservation des souches testées.

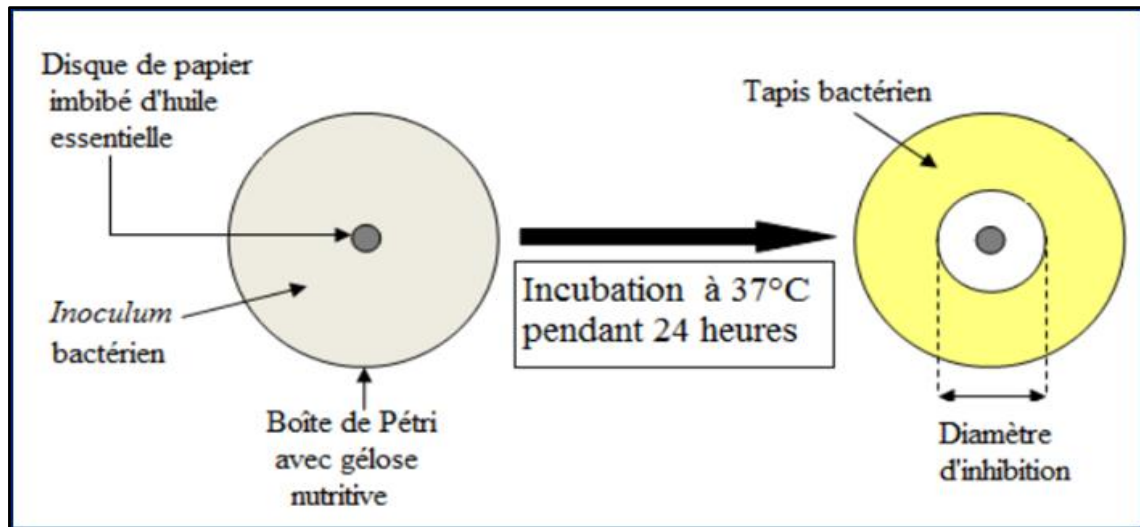


Figure 18: Principe de la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme).

II.4.2.2 Méthode de microdilution

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles a été déterminée selon la méthode rapportée par Remmal et al. (1993) avec quelques modifications. Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 %. Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300 et 1/500 dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essai contenant chacun 8ml du milieu solide LB, stérilisé à l'autoclave pendant vingt minutes à 120 °C et refroidis à la température ambiante, on ajoute aseptiquement 2ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 et 1/5000 (v/v). On agite convenablement les tubes afin de bien disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture avant de les verser dans les boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2% seule, sont également préparés. Le dépôt des souches bactériennes se fait à l'aide de la micropipette.

II.5 Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs techniques peuvent évaluer le potentiel antioxydant des extraits de plantes *in vitro*. Ces techniques sont basées sur le mélange de substances oxydantes comme les radicaux libres

avec un échantillon qui contient des antioxydants capables de neutraliser ces radicaux libres soit par transfert d'électron ou transfert d'un atome d'hydrogène (Prior et al., 2005).

Afin de refléter le profil antioxydant des différents échantillons, notre choix s'est porté sur l'utilisation de trois différents tests chimiques : La réduction du phosphomolybdate ou capacité antioxydante totale (CAT), le piégeage du radical libre (DPPH) et le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP).

II.5.1 Piégeage du radical libre DPPH

L'effet antioxydant des extraits a été mesurée in vitro par le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fig. 19), dont le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui possède une bande d'absorbance à 517 nm.

Le test de DPPH utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Wu, Chen et al (Wu et al., 2003), 100 µl de différentes concentrations de solutions échantillons sont ajoutées à 650 µl d'éthanol à 96% et 750 µl de DPPH fraîchement préparé (0,004%). L'absorbance du mélange a été mesurée à 517 nm avec un spectrophotomètre (Jasco V-530) après 30 min d'incubation à température ambiante dans l'obscurité. BHT a été utilisée comme témoin positif.

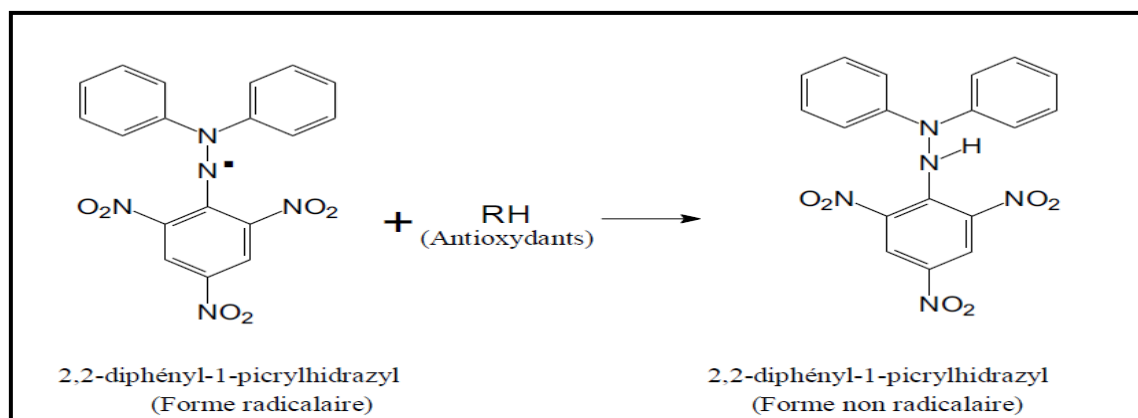


Figure 19: Neutralisation du DPPH par un antioxydant (RH).

Le pourcentage d'inhibition a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\%I = (1 - \text{Absorbance échantillon} / \text{Absorbance contrôle négatif}) \times 100$$

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH sont exprimés par la valeur d'IC₅₀ qui est la concentration d'extrait de plante responsable de l'inhibition de 50% de radicaux DPPH. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante des extraits est grande (Popovici & Saykova, 2009).

II.5.2 Test de la réduction du Fer (FRAP)

C'est un test direct et rapide, utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques. Il est basé sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique en fer ferreux.

Le pouvoir réducteur est basé par la méthode décrite par Oyaizu (Oyaizu, 1986) avec quelques modifications, 100 µL de chaque échantillon a été mélangé avec 500 µL de tampon phosphate et 500 µL de Férocyanates de potassium. Les solutions ont été bien mélangées puis maintenues dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min, ensuite 500 µL d'acide trichloracétique ont été ajoutés au mélange. Le tout est centrifugé pendant 10 min à 3000 trs. 500 µl du surnageant de chaque échantillon ont été ajoutés à 500 µL d'eau distillée et à 100 µL de chlorure ferrique. L'absorbance a été mesurée à 700 nm (Jasco v-530) contre un standard qui est la Quercétine. Les résultats ont été exprimés en EC₅₀ (mg/ml), sachant qu'EC₅₀ est définie comme la concentration qui correspond à 0,5 de l'absorbance.

II.5.3 Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO₄²⁻ en molybdate Mo (V) MoO₄²⁺ pour former un complexe vert de phosphate /Mo(V) à pH acide (Prieto et al., 1999).

100 µl de chaque échantillon a été ajouté à 1 ml de solution du réactif (0,6M acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes sont maintenus dans un bain-marie pendant 90min à 95C°. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 695 nm contre le blanc qui est préparé dans les mêmes conditions. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard pour la réalisation de la courbe d'étalonnage et la capacité antioxydante totale a été exprimée en mg Eq Vit C/g Ms.

II.5.4 Dosage de polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été évaluée par la méthode de réactif Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977). Le protocole de cette technique est basé sur la réduction de ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène par les groupements réducteurs des composés phénoliques.

0.5 ml de chaque extrait d'une dilution connue est mis dans des tubes à essai contenant 2.5 ml de réactif Folin-Ciocalteu à 10% (v/v). Après repos du mélange pendant 5 min, 2 ml de la solution de carbonate de sodium à 7 % ont été ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante dans l'obscurité, L'absorbance a été mesurée à 760 nm (Jasco v-530). La concentration des polyphénols dans différents extraits a été déterminée en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire établie avec l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 1g de matière végétale sèche (mgEq AG/gMs).

II.5.5 Dosage de flavonoïdes totaux

Ce dosage a été déterminé par la méthode colorimétrique au le trichlorure d'aluminium (Zhishen et al., 1999). Cette technique est basée sur l'oxydation des groupements hydroxyle OH libre des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude formant ainsi un complexe rose.

250 µL de chaque extrait ont été mélangé avec 75 µl d'une solution d'acétate de sodium CH₃COONa 5% et 75 µl d'une solution d'AlCl₃ 10%. Le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le Rutin a été utilisée comme standard pour la réalisation de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en (mg Eq Rutin/g MS).

II.5.6 Dosage de flavones et flavonols

Le taux de flavones et flavonols contenus dans les extraits a été mesuré par la méthode de Kosalec, et al., 2004. Le principe est de mettre 100 µl d'extrait de plante dans un tube à essai; ajouter 100µl d'une solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 20 % puis 100 µl d'acétate de sodium et 2,5 µl d'eau, laisser incuber une heure à température ambiante. L'absorbance a été

mesurée à partir du spectrophotomètre UV à 420 nm. La concentration des flavones et flavonols contenue dans les extraits a été calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la Quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en exprimés en mg d'équivalent de Quercétine par gramme de poids sec de chaque extrait (mg Eq Quercetine /g Ms).

II.6 Activité hépatoprotectrice des extraits aqueux des trois plantes étudiées

L'effet hépatoprotecteur des extraits aqueux du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L* est évaluée selon le protocole décrit par Kamisan et al., (2013). Les animaux sont regroupés en six groupes, de six rats chacun, comme suit. Le premier groupe reçoit oralement 10 ml/kg d'eau distillée quotidiennement pendant 7 jours. Le deuxième groupe, reçoit aussi 10 ml/kg d'eau distillée quotidiennement pendant 7 jours, lors du dernier jour, les rats reçoivent 1 ml/kg du tétrachlorure de carbone 50% par voie intrapéritonéale. Les animaux du troisième groupe reçoivent par voie orale et quotidiennement pendant 7 jours 50, 150 et 300 mg/kg de l'extrait aqueux du *T. riatarum*, respectivement. Trois heures après la dernière administration de l'extrait, 1 ml/kg de CCl₄ (50%) est injecté par voie intrapéritonéale. Le quatrième groupe reçoit par voie orale et quotidiennement pendant 7 jours 50, 150 et 300 mg/kg de l'extrait aqueux du *T. blecherianus*, respectivement. Après la prise orale de la dernière dose d'extrait, ces rats reçoivent par voie intrapéritonéale, 1 ml/kg de CCl₄ (50%). Les rats du cinquième groupe reçoivent à leur tour par voie orale et quotidiennement pendant 7 jours 50, 150 et 300 mg/kg de l'extrait aqueux du *T. citriodorus L*, respectivement. Après la dernière administration de l'extrait, les rats de ce groupe reçoivent 1 ml/kg de CCl₄ (50%) par voie intrapéritonéale. Les rats du sixième groupe constituent les standards; et sont prétraités par le silymarine 50 mg/kg par voie orale quotidiennement pendant 7 jours avant l'intoxication par le CCl₄.

- Groupe 1 ou témoin T1 : a reçu un volume de 10 ml d'eau distillé.
- Groupe 2 ou témoins T2 positif : 10 ml d'eau distillé + est intoxiqué par CCl₄ (1ml/kg).
- Groupes 3: traités par l'extrait aqueux du *T. riatarum* avec des doses de 50, 150 et 300 mg/kg, respectivement + intoxiqués par le CCl₄ (1ml/kg).
- Groupes 4 : traités par l'extrait aqueux du *T. blecherianus* avec les doses de 50, 150 et 300 mg/kg, respectivement + intoxiqués par le CCl₄ (1ml/kg).

- Groupe 5 : traités par l'extrait aqueux du *T. citriodorus* avec les doses de 50, 150 et 300 mg/kg, respectivement + intoxiqués par le CCl₄ (1ml/kg).
- Groupe 6 : traité par le silymarine comme médicament de référence à la dose de 50 mg/ml intoxiqués par le CCl₄ (1ml/kg).

Après 24 h de l'injection, tous les rats ont été sacrifiés par ponction cardiaque, le sang est récupéré dans des tubes héparines. Après dissection le foie est immédiatement récupéré, nettoyé avec du NaCl 0.9% stérile et froid.

- **Calcul de la prise du poids**

Les rats sont pesés au début et à la fin de l'expérimentation, Avant sacrifice les rats sont pesés calculer la différence entre le début et la fin de l'expérimentation.

- **Calcul du poids relatifs (PR)**

Le calcul du poids relatifs du foie se fait par l'équation suivante

$$PR = (\text{Poids du foie (Pf)} / \text{Poids Corporel (PC)}) * 100$$

Après centrifugation du sang récupéré à 3500 rpm pendant 15 minutes pour l'obtention du sérum. Le plasma recueilli est stocké à -20°C jusqu'au jour du dosage des différents paramètres. Les paramètres dosés étaient : Aspartate aminotransférase (ASAT), Alanine amino-transférase (ALAT), phosphatase Alcaline (PAL) et bilirubine totale.

II.7 Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne ± SD. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 Demo. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 (p < 0.05).

Partie III

Résultats et discussions

Chapitre I : Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus* L. et leurs activités antibactériennes

I. Introduction

Les infections bactériennes surtout nosocomiales représentent un véritable problème de santé publique en raison de la gravité de ces infections et de leurs conséquences en termes de morbidité et de mortalité. Les causes de ce phénomène sont multiples mais, la plus majeure est l'utilisation excessive et/ou inappropriée des antibiotiques (Munita & Arias, 2016).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est une grande menace pour la santé publique compliquant le traitement des infections bactériennes surtout par la dissémination des souches multi-résistantes (Ventola, 2015). La progression de cette multirésistance conduit à une augmentation de la létalité de certaines infections bactériennes d'où les infections nosocomiales et représente donc un problème majeur (Munita & Arias, 2016; Serragui et al., 2013). Le phénomène de résistance est connu pour toutes les familles d'antibiotiques et concerne toutes les espèces bactériennes. Ces dernières peuvent développer des mécanismes différents selon leurs sensibilité initiale et leurs capacités à exprimer les diverses résistances d'où la nécessité de se mobiliser en urgence pour chercher des nouvelles sources naturelles pouvant faire face à la résistance bactérienne (Vaubourdolle, 2013).

L'objectif de ce chapitre, est d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus* contre des souches responsables des infections nosocomiales par deux méthodes: la méthode de diffusion sur disque qui permet de mesurer le potentiel antibactérien des huiles essentielles sur chaque bactérie en mesurant les diamètres d'inhibition et la méthode des plaques de microtitrage qui permet de déterminer leur concentration minimale inhibitrice (CMI).

II. Résultats

II.1 Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus riatarum*

II.1.1 Rendement

Les huiles essentielles des feuilles sèches de *Thymus riatarum* ont été extraites par un hydrodistillateur de type Clevenger. L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune pâle avec un rendement de 0,5 %.

II.1.2 Composition chimique

L'identification des différents constituants chimiques des huiles essentielles de ce *Thymus* a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) grâce à la comparaison de leurs indices de rétention de Kovats avec ceux donnés dans la littérature. Les pics des chromatogrammes obtenus ont été comparés à ceux des composés de références (Figure 20).

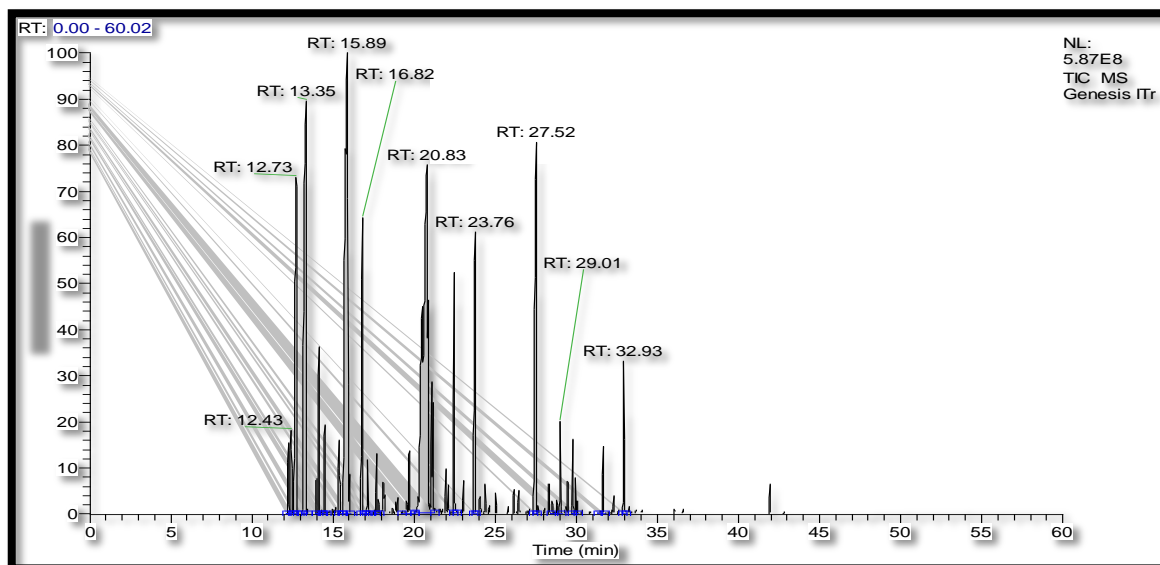


Figure 20: Chromatogramme de GC/MS de l'huile essentielle de *Thymus riatarum*.

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles a permis d'identifier quinze composés présentant un pourcentage de 99,6 %. (Tableau 3). Les composés majoritaires sont thymol (28.8%), borneol (20.0%) et α -phellandrene (13%).

Tableau 3: Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus riatarum*

Constituants	Indice de rétention (IR)	Tr (%)
a- thujene	930	2.6
α -pinene	943	7.3
Camphene	957	2.1
α -Phellandrene	1003	13.0
2-carene	1007	0.8
3-carene	1020	1.2
Borneol	1170	20.0
Bornyl acetate	1289	4.9
Thymol	1297	28.8
Carvacrol	1305	2.3
Acethyl thymol	1357	4.6
Eugenol	1375	7.7
Longifolene	1403	1.1
Caryophyllene	1420	1.7
Caryophyllene oxide	1457	1.5
Total		99.6

II.2 Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus blecherianus*

II.2.1 Rendement

Les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles sèches de *Thymus blecherianus* sont d'une couleur jaunâtre. Le rendement moyen fourni par extraction des HE de notre échantillon est de 2 %.

II.2.2 Composition chimique

Les huiles essentielles du *Thymus blecherianus* ont été analysées par CPG-SM. Le chromatogramme est présenté dans la figure 21.

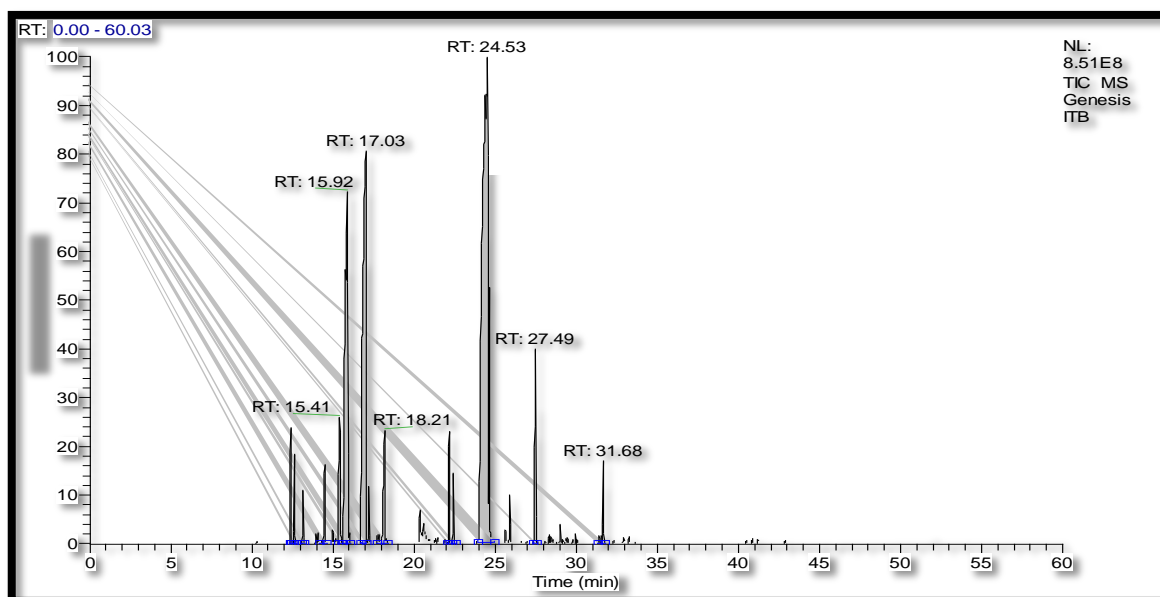


Figure 21: Chromatogramme de CG/MS de l'huile essentielle de *Thymus blecherianus*. L'analyse chimique de l'huile essentielle nous a permis d'identifier 11 composés présentant un pourcentage de 98.2 % (Tableau 4).

Tableau 4: Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus blecherianus*

Constituants	Indice de rétention (IR)	Tb (%)
a- thujene	930	1.4
α -pinene	943	0.9
Camphene	957	1.3
α -Phellandrene	1003	0.6
3-carene	1020	3.1
Borneol	1170	15.7
Bornyl acetate	1289	20.1
Thymol	1297	5.0
Carvacrol	1305	45.9
Eugenol	1375	3.1
Caryophyllene	1420	1.1
Total		98.2

Les résultats obtenus dans ce tableau nous ont permis d'identifier les composés majoritaires de l'huile essentielle de ce *Thymus* : carvacrol (45.9%) suivi de bornyl acetate (20.1%) et borneol (15.7%).

II.3 Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus citriodorus* L

II.3.1 Rendement

Les huiles essentielles du *Thymus citriodorus* L ont un aspect liquide mobile avec une couleur jaune pâle, une odeur et saveur citronnée douce avec un rendement de 1 %.

II.3.2 Composition chimique

Les huiles essentielles de la citronnelle ont été analysées par CG-MS. Le chromatogramme est présenté dans la figure 22.

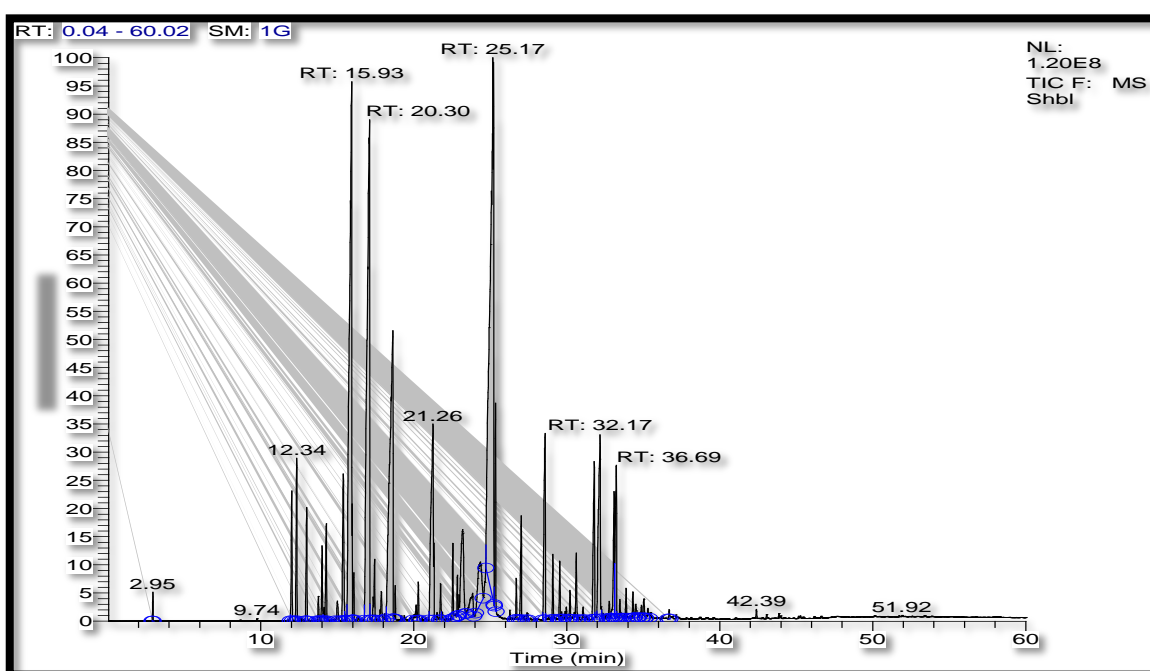


Figure 22: Chromatogramme de CG/MS de l'huile essentielle de *Thymus citriodorus* L.

L'analyse chimique de l'huile essentielle nous a permis d'identifier quarante-trois composés présentant un pourcentage de 95.4% présentés dans le Tableau 5.

Les principaux constituants de cette huile sont le terpinyl formate (10.4%), geraniol (8.7%), isogeraniol (7.2%), cubenol (7%), citronellyl tiglate (6.4%), thymol (5.3%) pulegone (4.8%) et le caryophyllene oxide (4%).

Tableau 5: Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus citriodorus L*

Constituants	Pourcentage (%)	IR	Constituants	Pourcentage (%)	IR
3-Carene	0.4	917	Eudesma-4,11-diene	0.4	1075
m-Mentha-4,8-diene	2.7	923	Longifolene	3.9	1086
Terpinyl propionate	2.2	929	Himachala-2,4-diene	1.6	1089
2,3-bornanediol	0.6	932	Himachala-3(12),4-diene	1.4	1093
1R-à-Pinene	0.4	937	Isoledene	0.6	1094
Isopulegyl acetate	1.9	941	Di-epi-à-cedrene	0.5	1096
p-mentha-1,4-diene	0.3	954	Patchoulene	1.7	1199
Squalene	1.6	960	Muuralene	0.9	1100
Terpinene	0.3	970	A-santanol acetate	2.0	1102
Phorbol	0.9	974	A-cedrene oxide	0.2	1105
terpinyl formate	10.4	984	Thymol	5.3	1108
Camphidine	1.3	987	Cubenol	7.0	1111
p-menth-4-en-3-one	2.8	1004	ç-Himachalene	0.5	1113
isogeraniol	7.2	1012	Neoisolongifolene,8-bromo	0.3	1115
Pulegone	1.0	1014	Calarene epoxide	3.2	1118
Humulene	0.8	1016	Caryophyllene oxide	4.0	1121
á-Guaiene	0.3	1024	Epiglobulol	0.5	1122
citronellyl tiglata	6.4	1027	Spathulenol	0.9	1125
Pulegone	4.8	1033	Farnesyl bromide	0.9	1128
Geraniol	8.7	1036	Calarene epoxide	1.2	1132
Caryophyllene	3.0	1063	Ledene oxide	0.4	1134
A-terpenyl ester	0.3	1073			
Total				95.4%	

II.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité antibactérienne des trois huiles essentielles, vis-à-vis de six souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales, a été mise en évidence à travers deux techniques : la première est la méthode de diffusion sur disque et la deuxième c'est la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de microdilution. Sachant que la CMI est la plus faible concentration d'un agent actif qui empêche la croissance visible d'une ou de plusieurs bactéries données.

Tableau 6: Activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées et des antibiotiques exprimés en diamètre d'inhibition.

Bacterial species	Zone d'inhibition (mm)			
	Huiles Essentielles			Antibiotiques Standards
	<i>T. blecherianus</i>	<i>T. riatarum</i>	<i>T. citriodorus</i>	
<i>Escherichia coli</i>	12.0±0.2	15.0±0.8	32.0±0.7	18 (IMP), 5 (AMP), 0 (CEC), 12 (PT)
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14.3±0.8	18.0±0.6	16.0±0.5	30 (IMP), 0 (AMP), 12 (CEC), 10 (PT)
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.1±0.1	21.0±0.5	18.5±0.5	39 (IMP), 0 (AMP), 10 (CEC), 16 (PT)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16.0±0.5	17.6±0.8	12.0±0.8	28 (IMP), 8 (AMP), 0 (CEC), 10 (PT)
<i>Acinetobacter</i>	10.6±0.7	14.3±0.1	10.0±0.2	22 (IMP), 0 (AMP), 5 (CEC), 6 (PT)
<i>Citrobacter Koseri</i>	12.0±0.5	15.5±0.9	28.0±0.8	17 (IMP), 8 (AMP), 15 (CEC), 8 (PT)

Les résultats des tests d'inhibition de l'activité antibactérienne sont illustrés dans le tableau 6. Nous avons comparé l'effet microbien des huiles essentielles des trois plantes. Les résultats montrent clairement que toutes les souches bactériennes sont sensibles aux huiles essentielles testés avec des diamètres d'inhibition allant de 10±0.2 à 32±0.76 mm. En effet, les huiles étudiées sont efficaces contre les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives.

L'effet antibactérien le plus élevé des HE de *T. citriodorus* a été observé contre la souche *E. coli* avec 32±0.76 mm. Par contre les huiles de *T. blecherianus* et *T. riatarum* ont montré un effet élevé contre *S. aureus* avec un diamètre de 20,1±0,1 mm et 21±0,5 mm respectivement. Cependant, l'inhibition la plus faible a été observée contre *Acinetobacter* pour toutes les huiles. D'autre part, l'effet antibactérien des trois HEs de thymus a montré une activité plus forte par

rapport à tous les antibiotiques standards utilisés comme témoins positifs à l'exception de l'IMP qui est très recommandé par les cliniciens dans le cas des infections nosocomiales.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de microdilution (tableau 7) a montré que les HEs de *T. blecherianus*, *T. riatarum* et de *T. citriodorus* sont efficaces à diverses concentrations allant de 0,019 à 0,156 mg/ml. Comme présenté dans le tableau ci-dessous, la concentration efficace la plus élevée était de 0,019 mg/ml contre *S. aureus* et *Klebsiella pneumonia* pour *T. riatarum* et contre *E.coli* pour *T. citriodorus*. Les huiles essentielles du *T. blecherianus* ont aussi présenté une concentration efficace contre *S. aureus* avec une valeur de CMI de 0,019 mg/ml. Ce qui concorde parfaitement avec les résultats des diamètres d'inhibition.

Tableau 7: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles en (mg/ml).

Souches bactériennes	<i>T.blecherianus</i>	<i>T.riatarum</i>	<i>T.citriodorus</i>
<i>Escherichia coli</i>	0,156	0,078	0,019
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0,078	0,019	0,078
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,019	0,019	0,156
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,078	0,039	0,156
<i>Acinetobacter</i>	0,156	0,078	0,156
<i>Citrobacter sp.</i>	0,156	0,078	0,019

III. Discussion

III.1 Rendement des huiles essentielles de *Thymus riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L.*

Les huiles essentielles des feuilles de *Thymus riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L.* ont été obtenues par appareil d'hydrodistillation. Pour les HEs obtenues à partir des feuilles de *T. blecherianus* et de *T. riatarum* étaient de couleur jaune avec un rendement de 2 % et 0,5 %, respectivement. Le rendement obtenu est supérieure aux résultats des études de la même espèce avec un rendement de 1,75% et 0,26% pour *T. blecherianus* et *T. riatarum* respectivement (Amarti et al., 2008; Fadli et al., 2014).

Concernant, le *T. citriodorus*, qui est étudié pour la première fois au Maroc, ses huiles essentielles étaient de couleur jaune pâle et ont été obtenus avec un rendement de 1%. Ce rendement est important de celui des feuilles récoltées en Turquie qui était de 0,9 % (Kizil & Toncer, 2016). Il est plus faible en comparaison avec ceux obtenus de la même plante dans une autre étude, rapporté par Bagdat et al. qui a indiqué que le rendement en huile essentielle de *T. citriodorus* était entre 1,30 et 1,43 % (Bagdat et al., 2011).

III.2 Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* L.

En ce qui concerne la composition chimique, quinze composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des feuilles de *T. riatarum* après analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), présentant un pourcentage de 99,6 % (Tableau 3). Les principaux composés identifiés étaient le thymol (28,8%), le bornéol (20,0%) et l' α – phellandrène (13%). Une composition différente a été récemment rapportée pour la même espèce, les principaux composés étant le bornéol (41,67%), le terpinène-4-ol (8,65%) et le trans-caryophyllène (7,59%) (Fadli et al., 2014). Une autre étude de cette HE a démontré que les principaux constituants étaient le carvacrol (22,3%), le p-cymène (17,5%) et l' α -terpinène (10,3%) (Amarti et al., 2011). En outre, Belmalha et al. (2012) a également révélé la composition chimique de *T. riatarum* avec 33 composés identifiés (87,71%); le bornéol (31,3%) a été identifié comme le composé le plus abondant.

Concernant la composition des huiles essentielles de *T. blecherianus* caractérisées par 11 composés s'élèvent à 98,2%. Cette huile était dominée par le carvacrol (45,9%) suivi de l'acétate de bornyle (20,1%) et du bornéol (15,7%). Amarti et al. (2011) a révélé une composition chimique différente pour la même espèce, dont les principaux constituants sont l' α -terpinène (42,20%) et le thymol (23,90%). Les analyses GC-MS ont conduit à l'identification de quarante-trois composés présentant un pourcentage de 95,4% du total des huiles de *T. citriodorus*. Les principaux constituants identifiés étaient le terpinyl formiate (10,4%), géraniol (8,7%), isogéraniol (7,2%), cubéol (7%), tiglate de citronellyle (6,4%), thymol (5,3%) pulegone (4,8%) et oxyde de caryophyllène (4%).

La composition chimique des huiles essentielles des feuilles du *T. citriodorus* marocain obtenue dans cette étude a été comparée avec celle d'autres pays ; En chine, l'analyse de la

composition chimique a montré que le bornéol (28,82%), thymol (14,43%), 3, 7-diméthyl-1, 6-octadiène- 3-ol (8,26%), 1-méthyl-4-[alpha-hydroxy-isopropyl] cyclohexène (8,23%) et terpènes camphre (5,1%) constituent les principaux composants des feuilles du *T. citriodorus* (Wu et al., 2013). Une composition différente d'huile essentielle de *T. citriodorus* est détecté aussi en Turquie dont les principaux constituants étaient le trans géraniol (30,07%), le trans citral (15,06%), cis-citral (11,71%) et cis-géraniol (7,65%) (Kizil & Tonçer, 2016). Cependant, les principaux constituants de l'huile de *Thymus citriodorus* d'Iran étaient le géraniol (54,4%), géraniol (13,9%), néral (10,1%), nérol (5,2%), 3-octanone (3,3%) et bornéol (3,2%) (Omidbaigi et al., 2005). Une autre étude a indiqué précédemment pour la même espèce que le géraniol était le principal composé (plus de 60%). Alors que le géranyl acétate (1,0%), le butyrate de géranyle (0,8%), le nérol (2,8%) et le citronellol (0,3%) sont des constituants minoritaires (Stahl-Biskup & Holthuijzen, 1995). Bagdat et al., (2011) a également établi que le composant principal de l'huile essentielle de *Thymus citriodorus* à partir de vingt-et-un constituants était le géraniol.

La composition de nos huiles essentielles est différente de celle des autres pays qualitativement et quantitativement. Ces variations dans la composition des huiles essentielles des trois thymus peuvent être attribuées à divers facteurs tels que les facteurs intrinsèques (génétiques) de la plante et les facteurs extrinsèques: les conditions climatiques, l'emplacement géographique. Les méthodes de distillation peuvent également influencer la composition des huiles essentielles (Asdadi et al., 2015; Argyropoulou et al., 2007).

III.3 Activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées

L'effet antibactérien des trois HEs du *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus* a été testé contre six souches de bactéries : *E. coli* ; *P. aeruginosa* ; *K. pneumoniae* ; *S. aureus* ; *Acinetobacter* et *Citrobacter koseri* responsables des infections nosocomiales au Centre Hospitalier Universitaire de Fès Maroc.

Selon nos résultats présentés dans le tableau 6, toutes les souches bactériennes étaient sensibles aux HEs des *Thymus* étudiés. Le *T. blecherianus* et *T. riatarum* agissent à peu près de la même façon. L'effet antibactérien le plus élevé des HEs de *T. blecherianus* et *T. riatarum* a été observé contre la souche de *S. aureus* avec un diamètre d'inhibition de $20,1 \pm 0,1$ mm et $21 \pm 0,5$ mm pour *T. blecherianus* et *T. riatarum* respectivement. Cependant, l'inhibition la plus faible

a été observée contre *Acenitobacter* et *Citrobacter Koseri*. Concernant les huiles essentielles du *T. citriodorus*, ont témoigné d'une activité inhibitrice meilleure par rapport à ceux des deux autres huiles contre les souches bactériennes *E.coli* et *Citrobacter Koseri* avec des diamètres d'inhibition de l'ordre de 32 ± 0.76 et 28 ± 0.86 mm respectivement ce qui signifie une CMI égale à 0,019 mg / ml contre les deux souches.

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de microdilution (tableau 7) a montré que les HEs du *T. blecherianus*, *T. riatarum* et *T. citriodorus* sont efficaces à diverses concentrations allant de 0,019 à 0,156 mg / ml. La concentration efficace la plus élevée était de 0,019 mg / ml contre *S. aureus* pour les HEs du *T. blecherianus*, *T. riatarum* et également contre *K. pneumonia* pour seulement le *T. riatarum*. Pour l'huile essentielle du *T. citriodorus*, elle est efficace contre les souches bactériennes *E.coli* et *Citrobacter Koseri* avec une CMI égale à 0,019 mg/ml.

A l'exception du *T.citriodorus*, on peut dire que les HEs sont généralement plus efficaces contre les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives ce qui concorde parfaitement avec des études antérieures. Ceci est dû à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries gram négatives qui pourrait fonctionner comme une barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule et sans cette membrane, la paroi cellulaire des bactéries Gram positives peut s'infiltrer plus facilement et les agents externes peuvent perturber la membrane cytoplasmique (Bagamboula et al., 2004; Upadhyay & Ahmad, 2010; Hammer et al., 2003).

Nos résultats sont plus importants que ceux rapportés par El Bouzidi et al., (2013) sur l'action efficace de l'HE sauvage et cultivée de *T. maroccanus* contre *S. aureus* avec une CMI = 0,46 et 0,96 mg/ml, respectivement. Une étude menée par Rota et al., (2008) a montré une sensibilité accrue de *S. aureus* pour le chémotype Thymol de *Thymus zygis ssp. Gracilis*. Cependant, Rota et al., (2008) ont constaté que *E. coli* est plus sensible que *S. aureus* au thym. Des études antérieures ont également démontré que les huiles essentielles du *T. riatarum* et *T. numidicus* présentaient une activité antibactérienne significative et la souche bactérienne *S. aureus* présentait une inhibition plus élevée (Fadli et al., 2014; Adrar et al., 2016).

Cette grande activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym peut s'expliquer par la présence de carvacrol et de thymol (El-Jalel et al., 2018; Hussain et al., 2011), il est possible que d'autres constituants mineurs contribuent également à l'activité. Il serait aussi légitime de

déduire, que l'activité antimicrobienne des huiles testées résulte de l'impact synergique de l'association des composants dans l'HE (Ghasemi et al., 2013).

Vu la variabilité des quantités des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribué à un mode d'action, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson et al., 2002).

Jusqu'à présent, il n'existe pas encore une étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mécanisme d'action des huiles essentielles. Étant donnée la complexité de la composition chimique des huiles essentielles, Il est très probable que chacun des constituants a son propre mode d'action. D'une manière générale, leur action se déroule comme suit ; l'huile essentielle attaque la paroi bactérienne grâce à son caractère hydrophobe, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires. Une acidification de l'intérieur de la cellule se fait en bloquant la production de l'énergie. Tous ces changements, aboutissent à la destruction du matériel génétique, conduisant ainsi la mort de la bactérie (Bajpai et al., 2012; Sikkema et al., 1995).

IV. Conclusion

D'après les résultats de cette étude, on peut conclure que les huiles essentielles des trois espèces étudiées possèdent une activité antibactérienne remarquable vis-à-vis des six souches bactériennes responsables des infections nosocomiales chez les patients au Centre Hospitalier Universitaire de Fès. Ainsi, ces huiles pourraient devenir un agent antimicrobien naturel et peuvent être utilisées comme outil de purification et de désinfection des établissements de santé afin de prévenir ces infections nosocomiales.

Chapitre II : Activité antioxydante des huiles essentielles du *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus*

L

I. Introduction

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses. Les radicaux libres sont impliqués dans l'étiologie de plusieurs maladies qui sont maintenant considérées comme l'un des problèmes majeurs de santé publique.

Lors d'un stress oxydatif, les radicaux libres non piégés induisent des dommages importants aux composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et l'ADN. Ainsi, l'importance des antioxydants s'est focalisée sur la recherche et l'isolation des antioxydants naturels à partir des végétaux afin de remplacer les antioxydants synthétiques les plus utilisés actuellement tels que le butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

Notamment, les huiles essentielles sont considérées comme source potentielle de molécules naturelles bioactives, susceptibles d'être utilisées pour la protection des aliments contre l'oxydation. De ce fait, le recours aux huiles essentielles ces dernières décennies comme agent antibactérien et antioxydant, ces huiles essentielles pourraient éviter à la fois les risques de contamination et d'oxydation des aliments ce qui permettra de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques jugés souvent comme cancérigènes.

De nombreuses et diverses techniques sont disponibles pour évaluer les activités antioxydantes de composés spécifiques ou de mélanges complexes tels que les huiles essentielles. Cependant, une seule technique ne peut pas être suffisante pour identifier tous les mécanismes possibles caractérisant un antioxydant. C'est ainsi, que dans la présente étude, trois dosages ont été réalisés afin d'évaluer *in vitro* les propriétés antioxydantes de nos échantillons d'huiles essentielles à savoir l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH), le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) et la capacité antioxydante totale (CAT).

II. Résultats

II.1 Le piégeage du radical libre DPPH•

Nous avons évalué en premier l'activité antioxydante des HEs par le test du radical DPPH qui permet de mesurer la capacité de piégeage des radicaux libres. Des dilutions en cascade des trois huiles essentielles étudiées ainsi que le témoin BHT ont été préparées. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne d'un passage de la couleur violette à la couleur jaune (Villaño et al., 2007).

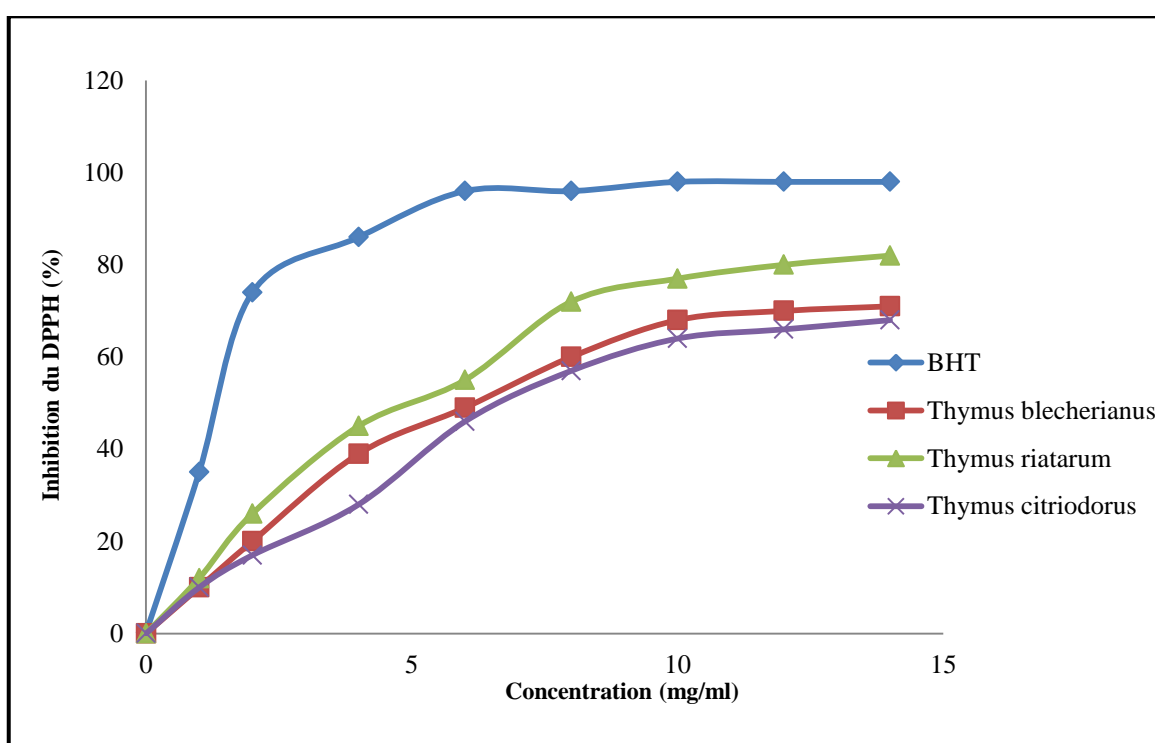


Figure 23: Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des huiles essentielles étudiées comparé avec BHT.

D'après la figure 23, on remarque que le pourcentage d'inhibition des échantillons augmente en fonction de la concentration. A partir de cette figure, on peut déterminer la valeur de l' IC_{50} qui correspond à la concentration nécessaire pour neutraliser 50% du radical libre DPPH dont les valeurs exactes sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8: Activités antioxydantes des huiles essentielles en comparaison avec les standards.

	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)	FRAP EC ₅₀ (mg/ml)	AAT (mg Eq Vit C /g HE)
<i>Thymus blecherianus</i>	6.87±0.30 ^a	14.73±0.25 ^a	135.82±14.20 ^d
<i>Thymus riatarum</i>	5.75±0.06 ^b	11.86±0.15 ^b	220.15±25.05 ^c
<i>Thymus citriodorus L</i>	7.23±0.10 ^a	15.50±0.36 ^a	457.23 ± 15.70 ^b
BHT	0.11±0.002 ^c	-	540.62 ± 40.0 ^a
Quercétine	-	0.03±0.006 ^c	512.70 ± 15.0 ^a

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD, les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative pour le même solvant (p <0,05).

L'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande.

D'après les résultats, le *T. riatarum* présente la plus grande capacité de piégeage des radicaux avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 5,75 ± 0,06 mg/ml suivi par *T. blecherianus* avec une IC₅₀ de l'ordre de 6,87 ± 0,3 mg/ml. Le potentiel antioxydant significativement le plus faible a été enregistré pour les huiles essentielles du *T. citriodorus* (7.23 ± 0.1 mg/ml). Cependant, comparés à l'antioxydant de référence pur BHT (0,11 ± 0,002 mg / ml), toutes les HEs testés ont montré une activité antioxydante significativement plus faible (Tableau 8).

II.2 Pouvoir réducteur (FRAP)

La capacité du pouvoir réducteur est une méthode utile pour mesurer les activités antioxydantes (Hyun et al., 2014). Dans ce test, les radicaux hydroxyles sont générés par la réaction de Fe²⁺ et H₂O₂, et les agents antioxydants réduisent la génération de radicaux hydroxyles en chélatant Fe²⁺ (Bokhari et al., 2013).

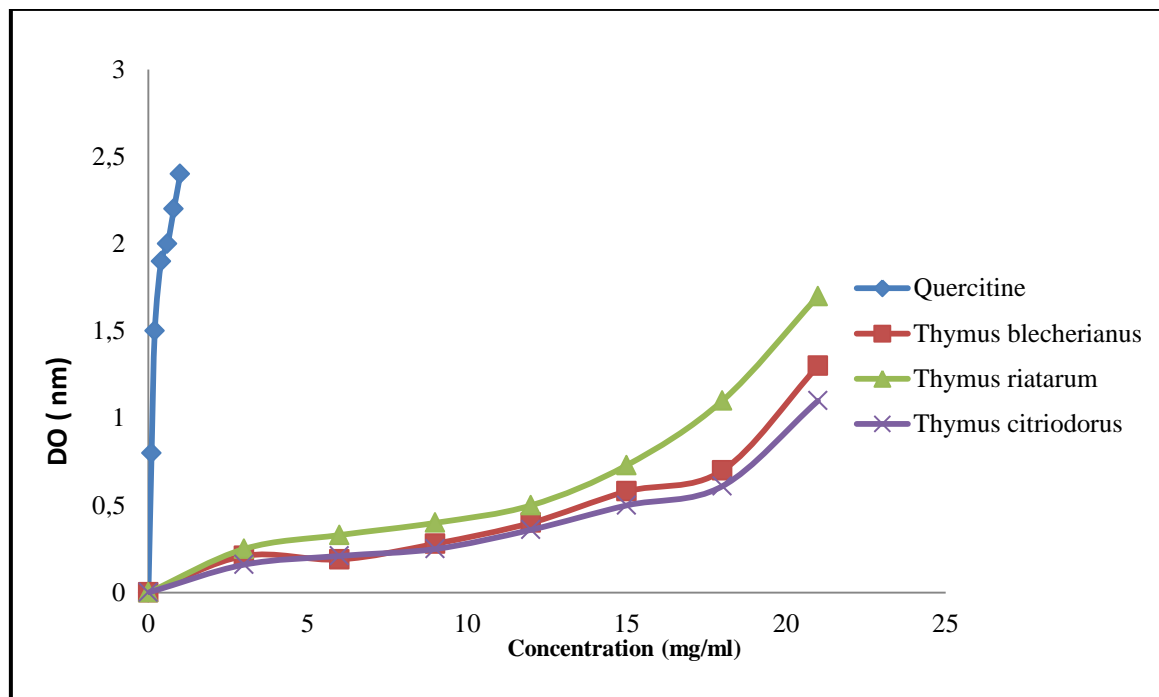


Figure 24: Absorbance en fonction des différentes concentrations des huiles essentielles étudiées comparé avec la Quercétine.

Les résultats de cette activité (Tableau 8) ont montré que les HEs des trois plantes ont une capacité réductrice comparable contre l'ion ferrique; $14,73 \pm 0,25$ mg/ml pour *T.blecherianus* et $11,86 \pm 0,15$ mg/ml pour *T. riatarum*. Par contre l'huile essentielle du *T.citriodorus* possède un pouvoir réducteur trop faible avec un EC_{50} de $15,5 \pm 0,36$ mg/ml. Ces résultats peuvent expliquer que les HEs du *T. riatarum* présente un pouvoir réducteur important renferment des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort. Toutes les huiles testées présentent un pouvoir réducteur très significativement inférieur à celui de la Quercétine.

II.3 Capacité antioxydante totale CAT

Les résultats de ce test (Tableau 8), exprimés en mg EqVitC/gHE, montrent clairement que la capacité antioxydante totale de l'huile essentielle du *T. citriodorus* était significativement meilleure comparée à celle du *T. riatarum* et *T. blecherianus*. Toutefois les capacités antioxydantes totales des différents échantillons restent significativement inférieures à celles du BHT et de la Quercétine.

III. Discussion

D'après les résultats de ce pouvoir antioxydant, on constate qu'en générale, les HEs des feuilles du *T. riatarum* possèdent significativement le meilleur pouvoir antioxydant par rapport aux autres huiles. Cependant, ce pouvoir reste significativement inférieur à celui de l'antioxydant de référence BHT et Quercétine (Tableau 8).

En comparant avec une étude antérieure, qui a évalué l'activité antioxydante des feuilles du *T. bleherianus* du Maroc par le test de DPPH (Amarti et al., 2011) dont les résultats ont révélé que ces huiles possèdent une activité antioxydante modérée, avec une IC_{50} qui est de l'ordre de 77,8 $\mu\text{g/ml}$. Cette valeur est plus importante que celle des huiles qui font objet de la présente étude ($IC_{50} = 6,87 \pm 0,30 \text{ mg/ml}$) (Amarti et al., 2011). Une autre étude menée par Nikolić et al. (2014) montre que le *T. serpyllum*, *T. algeriensis* et *T. vulgaris* possèdent une activité antioxydante très importante avec une valeur d' IC_{50} de l'ordre de 0,96 $\mu\text{g/ml}$, $IC_{50} = 1,64 \mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 4,80 \mu\text{g/ml}$, respectivement.

Les résultats obtenus par la méthode de FRAP, montrent que les huiles essentielles étudiées possèdent un pouvoir réducteur significativement faible en comparaison avec la quercétine. Cependant, l'huile essentielle du *T. riatarum* possède une bonne affinité à l'ion Fe^{2+} par rapport aux autres échantillons avec une valeur d' EC_{50} de l'ordre de $11,86 \pm 0,15 \text{ mg/ml}$. Cette valeur est inférieure à celle trouvée dans une autre étude qui s'est intéressée sur les HEs du *T. serpyllum* et *T. algeriensis*. Ces derniers possèdent un pouvoir antioxydant de l'ordre de ($EC_{50} = 0,66 \mu\text{g/ml}$ et $0,68 \mu\text{g/ml}$, respectivement) (Nikolić et al., 2014). La même chose pour les HEs du *T. maroccanus* sauvage et cultivé avec une valeur de $139,31 \pm 1,08$ et $149,41 \pm 1,13 \mu\text{g/ml}$, respectivement (El Bouzidi et al., 2013). Plusieurs études antérieures ont également rapporté l'activité antioxydante des HEs de différentes espèces de Thymus (Nikolić et al., 2014; Amarti et al., 2011). Tohidi et al. (2017) ont démontré que la capacité de réduction de l'espèce Thymus augmentait avec l'augmentation de la concentration des huiles essentielles.

Le pouvoir réducteur intéressant des huiles de thym est souvent attribué à la présence de thymol et/ou carvacrol, et sa richesse en flavonoïdes et polyphénols vu leurs forte corrélation (Bahman et al., 2012; Sarikurkcu et al., 2018).

L'activité antioxydante présentée par les HEs testés justifie les utilisations traditionnelles des herbes de Thym. Le potentiel antioxydant observé serait dû aux constituants phénoliques de l'huile (Hazzit et al., 2009), tandis que l'efficacité chimioprotectrice de l'huile contre les troubles liés au stress oxydatif est principalement due à ses propriétés de piégeage des radicaux libres et de chélation des métaux.

IV. Conclusion

D'après les résultats de ce chapitre, on peut conclure que les huiles essentielles des trois espèces étudiées sont dotées des propriétés antioxydantes intéressantes et peuvent être utilisées comme des antioxydants naturels dans le domaine pharmaceutique et agroalimentaire.

Chapitre III : Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L.* par deux techniques : Soxhlet et macéré

I. Introduction

La technique d'extraction dite Soxhlet est une méthode conventionnelle d'extraction qui permet l'extraction par solvant en continu d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide. Parmi ces avantages, un gain de temps de manipulation (à condition de laisser l'appareil fonctionner un certain temps), un intérêt économique : elle requiert moins de solvant que la méthode des macérations, et la troisième chose c'est que le solvant est constamment distillé, de sorte qu'il ne se sature jamais. Cependant, l'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques (Berrghioua, 2016).

Concernant la technique de macération c'est la méthode la plus simple à mettre en œuvre pour l'extraction des métabolites secondaires présents dans un mélange solide-liquide. Elle se base sur l'affinité des molécules pour différents solvants, les solvants les plus utilisés sont le pentane, l'hexane, le dichlorométhane, l'oxyde de diéthyle, l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'eau. Cette technique nous permet d'obtenir des extraits riches en molécules d'intérêt (Ibáñez et al., 1998).

Dans ce chapitre, on a procédé à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des trois espèces aromatiques du thym à savoir le *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L.* par le biais de trois tests antioxydants différents mais complémentaires : activité de piégeage des radicaux libres (DPPH), le pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP) et la capacité antioxydante totale (CAT). Les quantifications des principes actifs susceptibles d'être responsables aux activités antioxydantes ont été également mises en évidence. Il s'agit des dosages des polyphénols, des flavonoïdes, des flavones et flavonols. Pour les trois espèces du

thym, l'extraction de ces composés est réalisée soit à froid par macération ou à chaud par la technique de Soxhlet en utilisant quatre solvants : méthanol, éthanol, eau et acétate d'éthyle.

II. Résultats

II.1 Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *T. riatarum*, *T.blecherianus* et *T.citriodorus* par la technique de Soxhlet

II.1.1 Rendement des extraits

Tableau 9: Rendements des différents extraits obtenus à partir de *T. riatarum*, *T.blecherianus* et *T.citriodorus*

Extraits	Rendement (%)		
	<i>T. riatarum</i>	<i>T.blecherianus</i>	<i>T.citriodorus</i>
Méthanol	8,17	12,32	13,6
Ethanol	10,4	15,45	14,85
Eau	14,22	20,01	16
Acétate d'éthyle	2,6	6	4,33

Le tableau 9 présente les rendements des extractions qui ont été calculés par rapport au poids sec total. On constate d'après les résultats que l'extrait aqueux présente le rendement le plus élevé 20,01 % pour le *T.blecherianus*, 16 % pour le *T.citriodorus* et 14,22 % pour le *T. riatarum*. Quant aux extraits méthanolique ont un rendement moindre avec les valeurs de 13,6%, 12.32 % et 8,17 % pour *T. citriodorus* L, *T. blecherianus* et *T. riatarum* respectivement. L'extrait d'acetate d'ethyle présente le rendement le plus faible.

Il est remarquable que quel que soit le solvant utilisé, le rendement obtenu pour le *T. blecherianus* est nettement supérieur à celui des deux autres espèces.

II.1.2 Résultats du criblage phytochimique

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de famille chimique des substances organiques naturelles de la plante. Toutefois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimique présentent des imprécisions car ils sont basés

en partie sur l'analyse qualitative. Le principe est soit basé sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés en utilisant des réactions de coloration (conjugaison ou insaturation dans une molécule).

Tableau 10: Résultats du criblage phytochimique des différents extraits étudiés

Tests	Extraits	<i>T.riatarum</i>	<i>T.blecherianus</i>	<i>T.citriodorus</i>
Tanins	Méthanol	+++	++	+++
	Ethanol	+	++	-
	Aqueux	+++	+	+++
	Acétate d'éthyle	+	-	+
Terpènes	Méthanol	++	+++	++
	Ethanol	+	+	-
	Aqueux	++	-	++
	Acétate d'éthyle	++	++	+
Stérols	Méthanol	+++	++	+
	Ethanol	-	-	+
	Aqueux	++	-	++
	Acétate d'éthyle	-	-	-
Alcaloïdes	Méthanol	+	++	+
	Ethanol	+++	+++	-
	Aqueux	++	-	++
	Acétate d'éthyle	+	+	-
Saponines	Méthanol	++	+++	+
	Ethanol	-	-	-
	Aqueux	++	++	+
	Acétate d'éthyle	-	-	+
Flavonoïdes	Méthanol	+++	++	++
	Ethanol	++	++	+++
	Aqueux	+++	+++	+
	Acétate d'éthyle	+	++	+
Polyphénols	Méthanol	++	++	+++
	Ethanol	+++	+++	++
	Aqueux	+++	++	+
	Acétate d'éthyle	+	+	+

+++ : Fortement abondant ; ++ : Moyennement abondant ; + : Faiblement abondant ; - : Négatif

D'après le tableau 10, on constate que les quatre extraits (méthanolique, éthanolique, aqueux et acétate d'éthyle) des trois espèces sont généralement riches en flavonoïdes, polyphénols et tanins. Les terpènes sont présents aussi avec des quantités importantes dans les extraits méthanoliques des plantes étudiées. Cependant ils sont absents dans l'extrait aqueux du *T.blecherianus* et l'extrait éthanolique du *T.citriodorus*. On note une absence des saponines et

stérols dans les extraits éthanoliques et d'acétate d'éthyle. Cependant, ces métabolites secondaires sont très abondants dans les deux autres extraits.

D'après l'étude complète du screening phytochimique des extraits des trois espèces de thym étudiées, on peut conclure que les tanins, les flavonoides et polyphénols ont donné les réactions les plus franches. Les trois plantes sont riches aussi en terpènes et alkaloides. On peut dire que l'abondance de ces composés peut être l'explication des activités antibactériennes, antioxydantes, antiseptiques, anti-inflammatoires, et antivirales de différentes espèces de thym.

II.1.3 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est réalisé par spectrophotométrie avec le réactif de Folin Ciocalteu qui donne une couleur bleue en présence de polyphénols (Berregioua, 2016). Les teneurs obtenues sont exprimées en mg, équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/mg MS), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

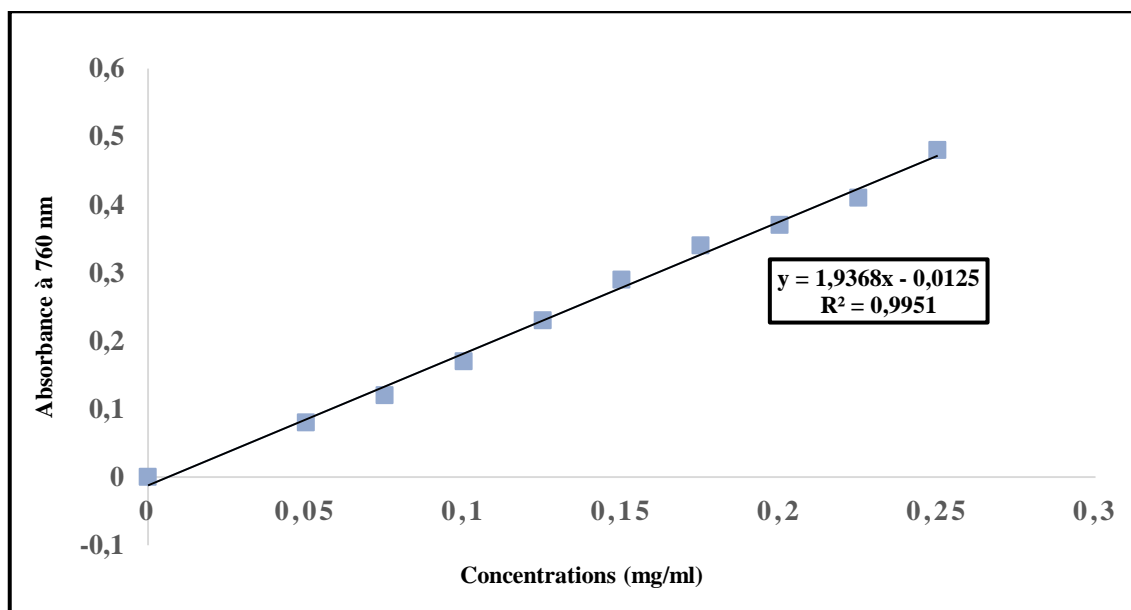


Figure 25: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats de la teneur en polyphénols sont exprimés en mgEq AG/gMs et sont représentés dans la Figure 26.

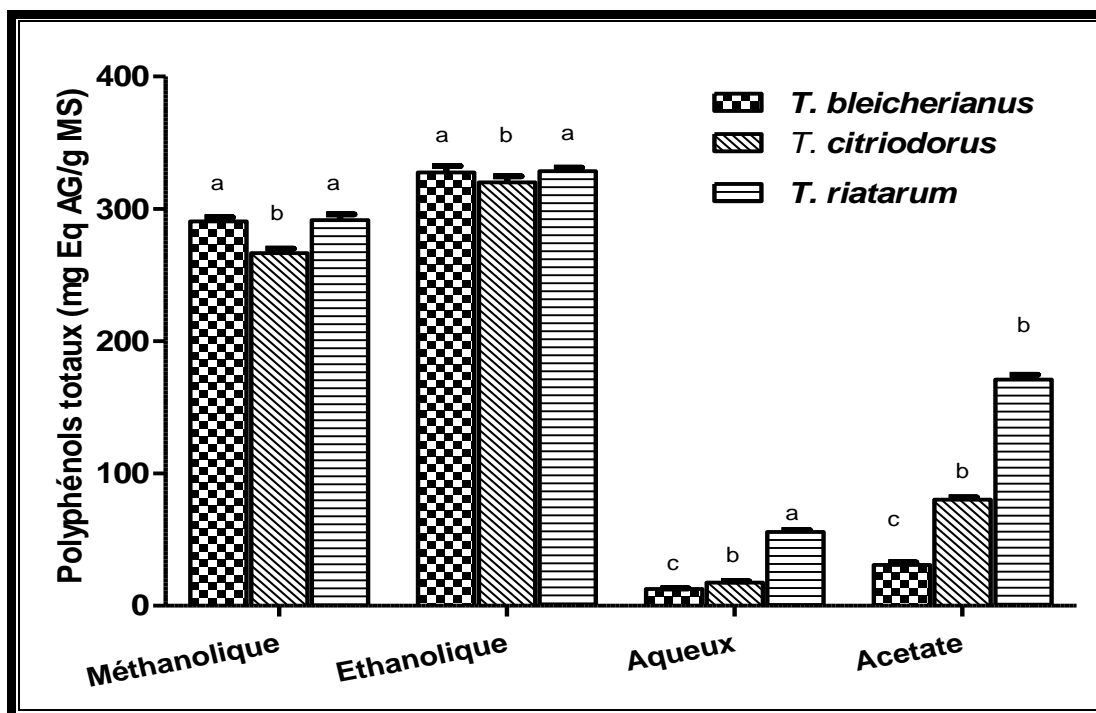


Figure 26: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des trois espèces de thym: *T. blecherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,05$).

Les résultats de la figure 26 montrent que quel que soit l'espèce étudiée, la teneur en polyphénols dépend du solvant d'extraction utilisé. La teneur la plus élevée en polyphénols est présente surtout dans les extraits éthanoliques et méthanoliques pour les trois espèces étudiées. Cependant, la teneur la plus faible a été observée dans l'extrait aqueux avec des valeurs de l'ordre de $55,68 \pm 1,52$ mg Eq AG/g Ms pour le *T. riatarum*, $17,61 \pm 0,99$ mg Eq AG/g Ms pour le *T. citriodorus* et $12,68 \pm 0,52$ mg Eq AG/g Ms pour le *T. blecherianus*. Généralement, les extraits du *T. riatarum* présentaient une concentration en polyphénols significativement supérieure par rapport aux *T. blecherianus* et *T. citriodorus*. En ce qui concerne le solvant d'extraction, l'éthanol reste le meilleur solvant d'extraction des polyphénols pour les trois espèces étudiées.

II.1.4 Détermination de la teneur en flavonoïdes

II.1.4.1 Dosage des flavonoïdes totaux

Les quantités de flavonoïdes ont été déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage du Rutin (Figure 27).

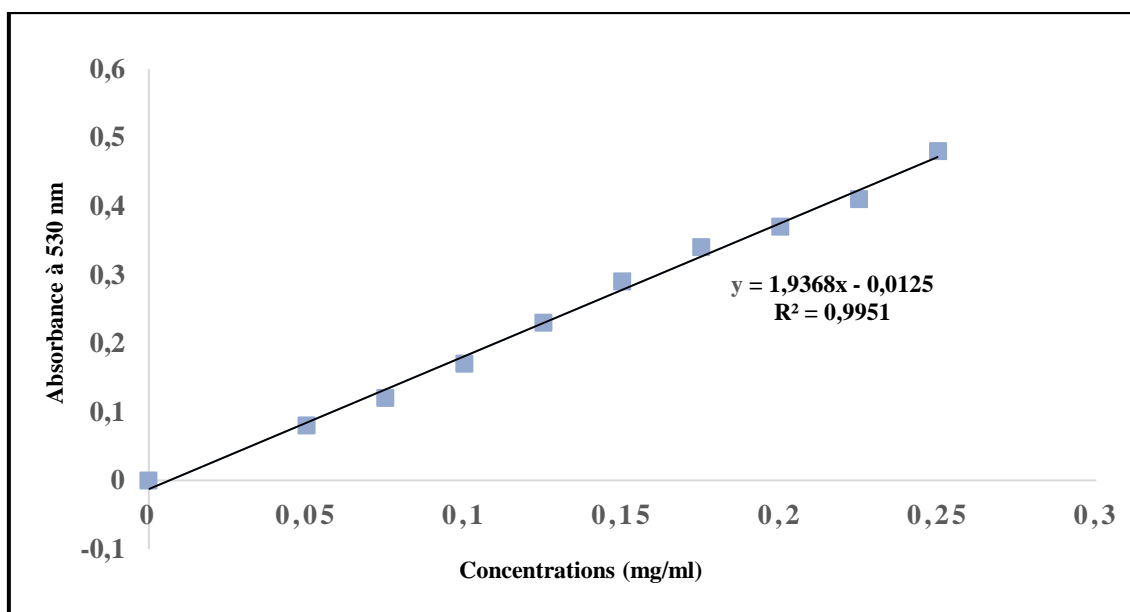


Figure 27: Courbe d'étalonnage de Rutin pour le dosage des Flavonoïdes.

Les résultats de la teneur en flavonoïdes ont été exprimés en mg Eq Rutin/g Ms et sont représentés dans la figure 28.

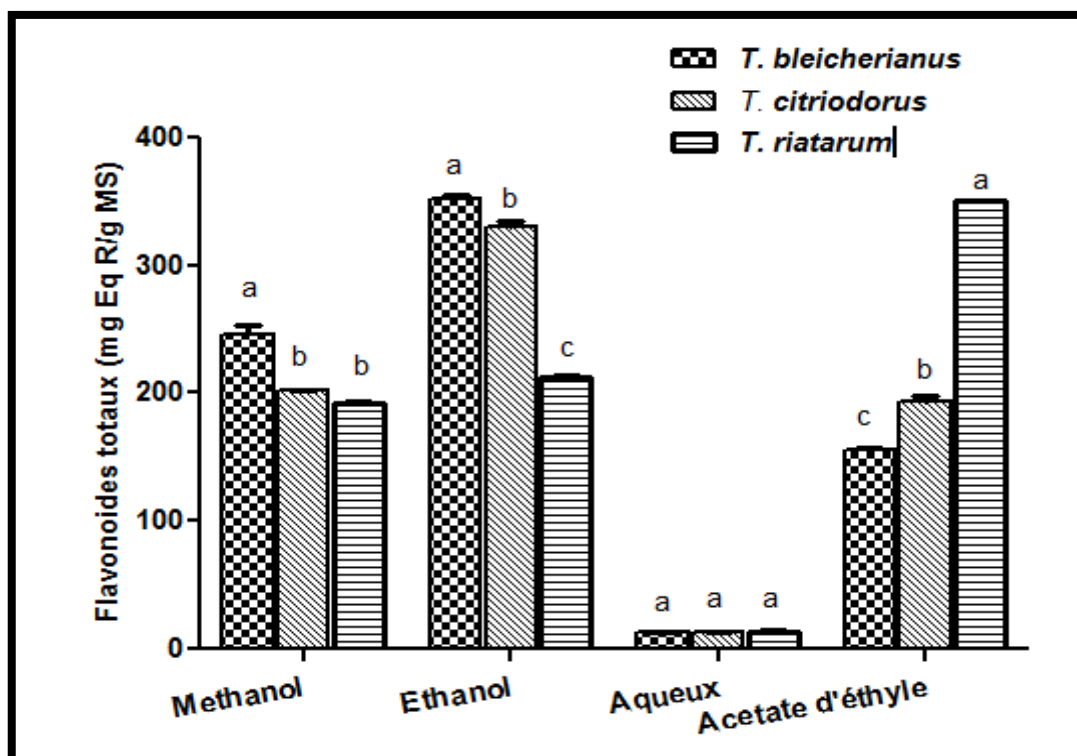


Figure 28: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des trois espèces de thym : *T.blecherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,05$).

Les résultats de la figure 28 ont montré que les flavonoïdes totaux sont présents dans tous les extraits des trois espèces étudiées avec des concentrations qui varient de $13,04 \pm 0,78$ à $350,50 \pm 7,35$ mg Eq Rutin/g Ms selon le solvant d'extraction et l'espèce étudiée.

L'extrait aqueux présente la teneur la plus faible en flavonoïdes avec une valeur de l'ordre de $13,78 \pm 0,34$ mg Eq Rutin/g Ms pour le *T. riatarum*, $13,48 \pm 0,45$ mg Eq Rutin/g Ms pour le *T. blecherianus* et $13,04 \pm 0,78$ mg Eq Rutin/g Ms pour le *T. citriodorus*. Quelle que soit l'espèce étudiée, l'éthanol reste le meilleur solvant d'extraction des flavonoïdes.

II.1.4.2 Dosage des flavones et flavonols

Le dosage des flavones et flavonols a été réalisé par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par (Kim *et al.*, 2003). Une courbe d'étalonnage (Figure 29) a été

réalisée avec la Quercétine prise comme étalon positif. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de Quercétine par g de la matière végétale sèche mg Eq Q/ g Ms.

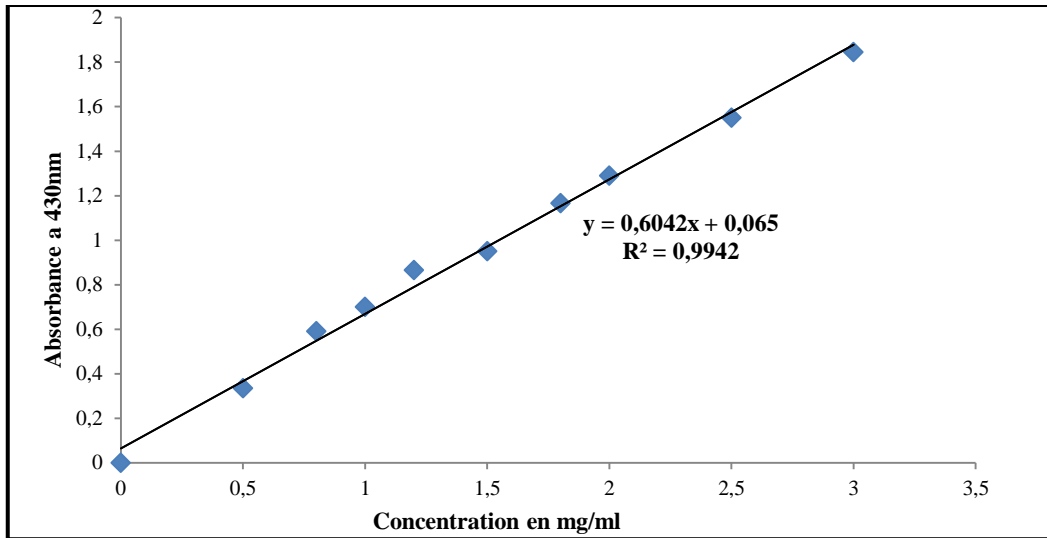


Figure 29: Courbe étalon de la Quercétine.

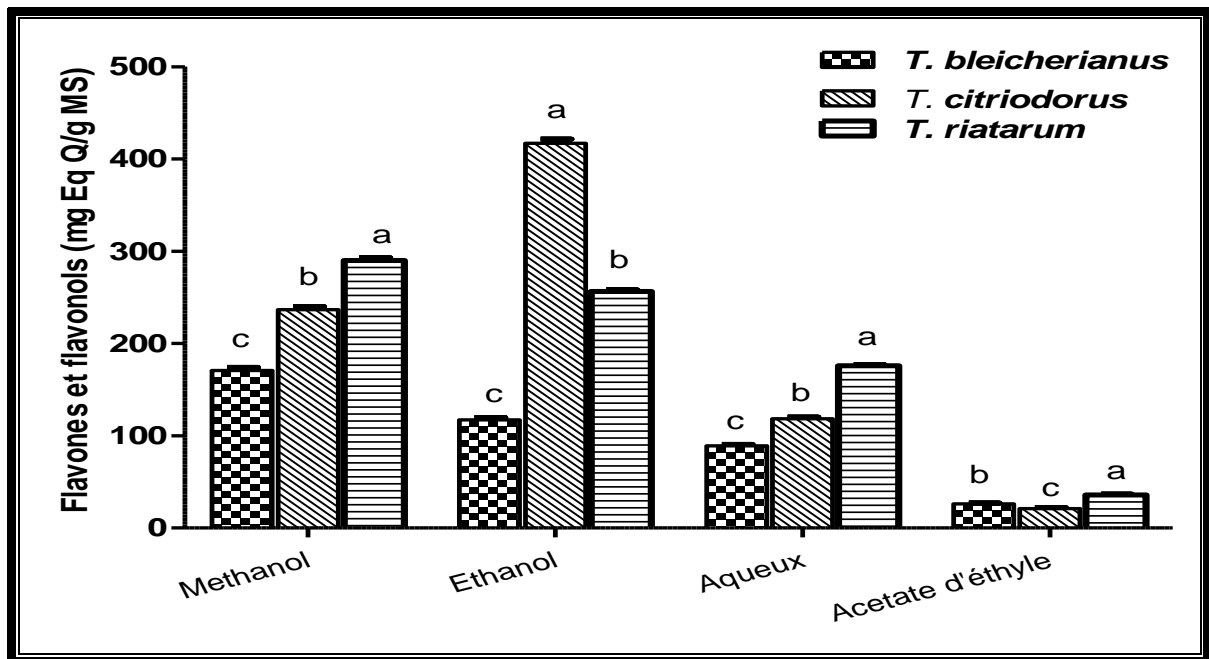


Figure 30: Teneur en flavones et flavonols dans les différents extraits des trois espèces de thym: *T. blecherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,05$).

Les résultats de ce dosage sont présentés dans la figure 30. A l'exception de l'extrait éthanolique, les extraits du *T. riatarum* présentaient une teneur significativement supérieure à celle des extraits des deux autres plantes. L'extrait éthanolique du *T. citriodorus* présente la teneur la plus élevée avec une valeur de $417,10 \pm 4.54$ mg Eq Q /g Ms.

II.1.5 Activité antioxydante des extraits

II.1.5.1 Piégeage du radical libre DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH est évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne d'un passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de chaque extrait (Figures 31, 32 et 33). Ces figures montrent que les pourcentages d'inhibition varient en fonction des différentes concentrations utilisées; ce qui reflète la présence des composés actifs susceptibles de réduire le radical DPPH.

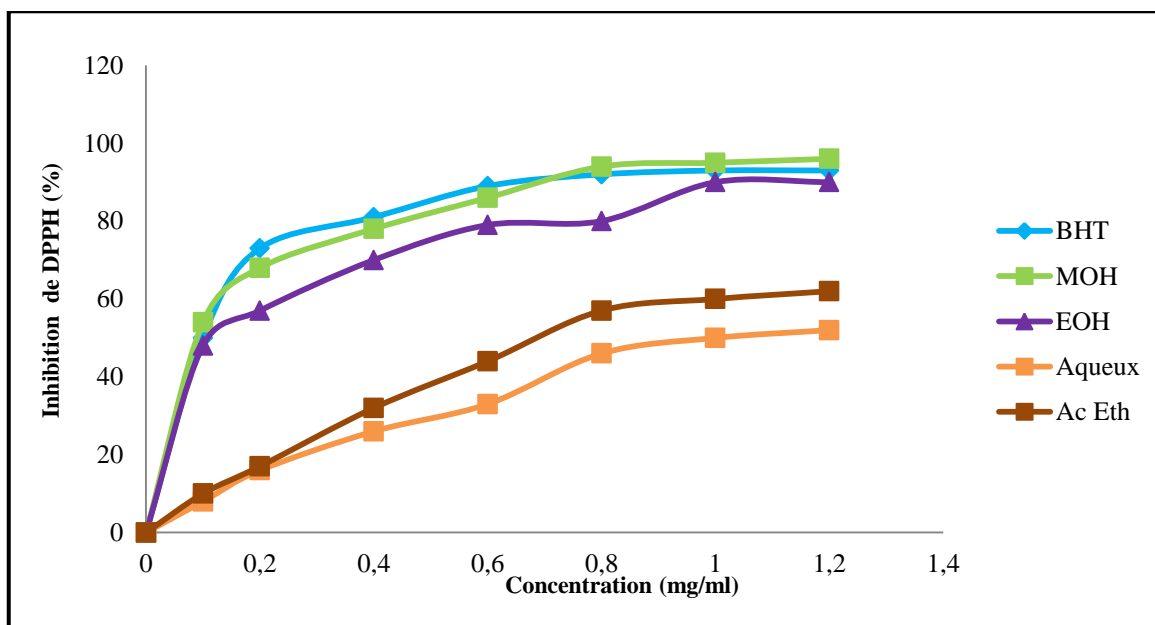


Figure 31: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du *Thymus riatarum* préparés par la technique du Soxhlet comparés au BHT.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (Aqueux) : Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus riatarum*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus riatarum* ; BHT : Hydroxytoluène butylé

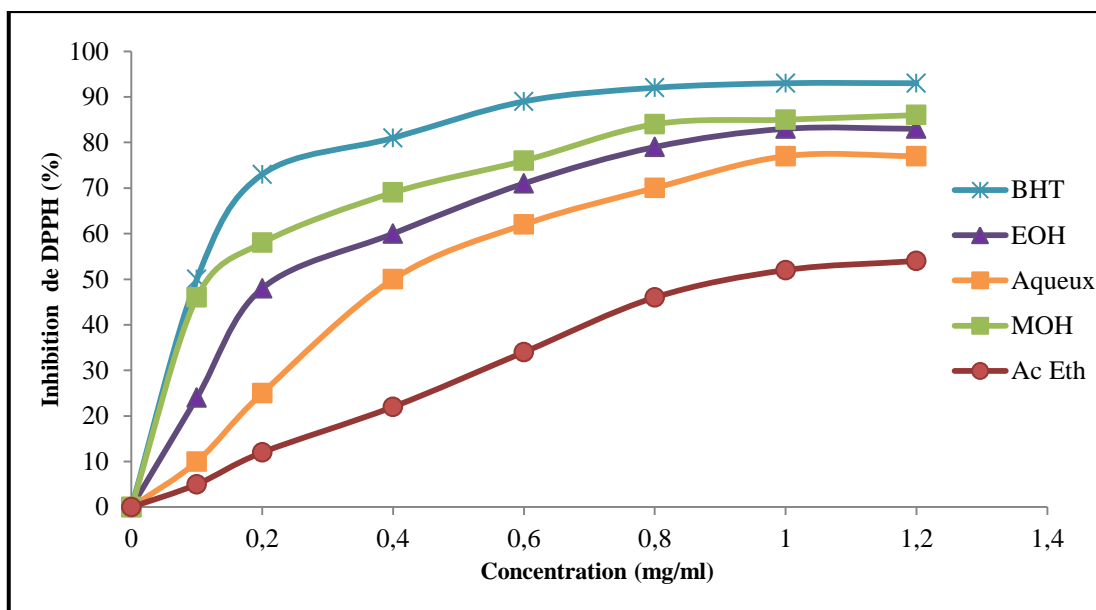


Figure 32: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du *Thymus blecherianus* préparés par la technique du Soxhlet comparés au BHT

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus blecherianus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus blecherianus*. BHT : Hydroxytoluène butylé

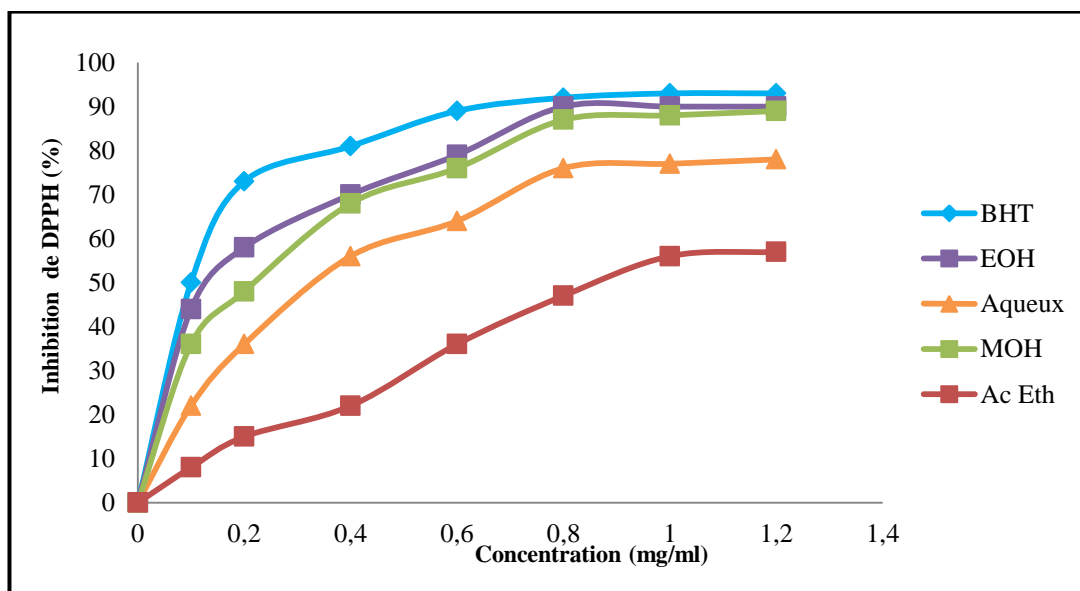


Figure 33: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du *Thymus citriodorus L.* préparés par la technique du Soxhlet comparés au BHT

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus citriodorus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus citriodorus*. BHT : Hydroxytoluène butylé

Ces résultats sont exprimés selon les valeurs d'IC₅₀ (Tableau 11) en comparaison à celle du standard (BHT). L'IC₅₀ exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration initiale du DPPH de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée.

Tableau 11: Les valeurs des IC₅₀ des différents extraits en comparaison avec le BHT

Plantes	IC ₅₀ extraits (mg/ml)			
	EOH	MeOH	Ac Eth	Aq
<i>T. riatarum</i>	0.110±0.016 ^b	0.085±0.010 ^d	0.766±0.028 ^c	1.079±0.016 ^a
<i>T. blecherianus</i>	0.22±0.020 ^a	0.15±0.024 ^b	0.87±0.010 ^b	0.42±0.009 ^b
<i>T. citriodorus L.</i>	0.115±0.040 ^{cb}	0.24±0.030 ^a	0.89±0.070 ^a	0.34±0.010 ^c
BHT	0.119±0.002 ^c	0.119±0.002 ^c	0.119±0.002 ^d	0.119±0.002 ^d

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart type de trois essais différents. Dans chaque colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05). EOH : Extrait éthanolique; MeOH : Extrait méthanolique ; Ac Eth : Extrait acétate d'éthyle ; Aq : Extrait aqueux

Comme le montre le tableau 11, tous les extraits obtenus à partir des trois espèces de thym ont montré une activité antioxydante par la méthode de DPPH avec une IC₅₀ comprise entre 0,085 et 1,079 mg/ml.

La valeur d'IC₅₀ du BHT qui est utilisé comme antioxydant de référence est de l'ordre de 0.119±0.002 mg/ml, cette valeur est significativement similaire à celle des extraits méthanoliques et éthanoliques du *T. riatarum* avec une IC₅₀ de 0,085 ± 0,010 mg/ml et 0,110 ± 0,016 mg/ml respectivement suivi par l'extrait éthanolique du *T. citriodorus L* dont la valeur d'IC₅₀ est de 0.115±0.040 mg/ml. Il est noté également que les extraits d'acétate d'éthyle des trois espèces présentent un effet antioxydant très faible vis à vis du radical DPPH. En effet, La concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC₅₀) est de 0.766±0.028 mg/ml ; 0.87±0.010 mg/ml et 0.89±0.070 mg/ml pour le *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus L.* respectivement.

II.1.5.2 Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur du fer est une méthode d'analyse du pouvoir antioxydant qui est reproductible, rapide et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . Les valeurs obtenues des différents extraits des trois plantes étudiées ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans les figures 35, 36 et 37 nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

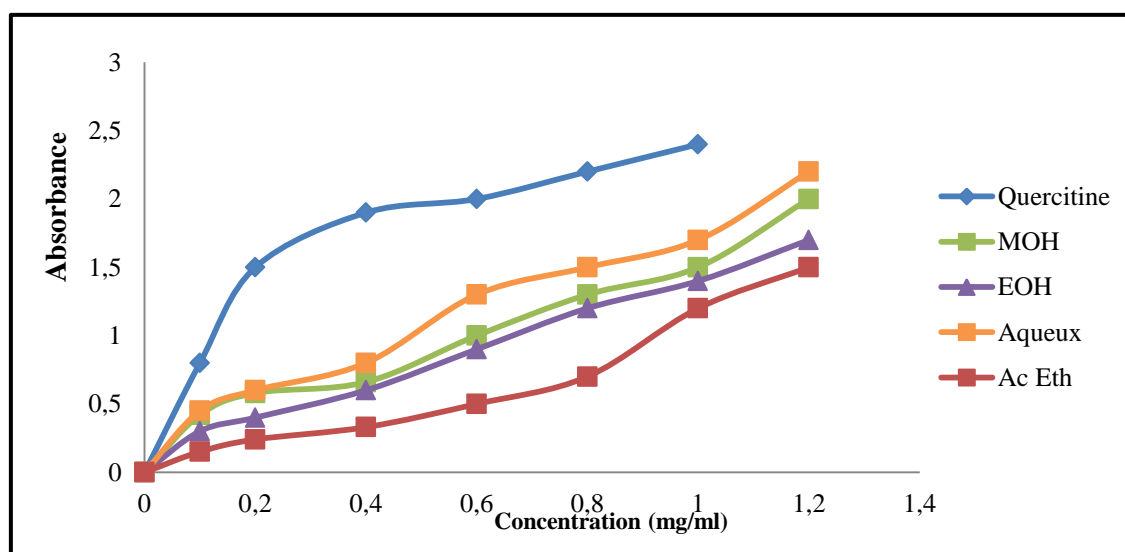


Figure 34: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits du *T.riatarum* préparés par Soxhlet comparés à celui de la quercétine

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus riatarum*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus riatarum* .

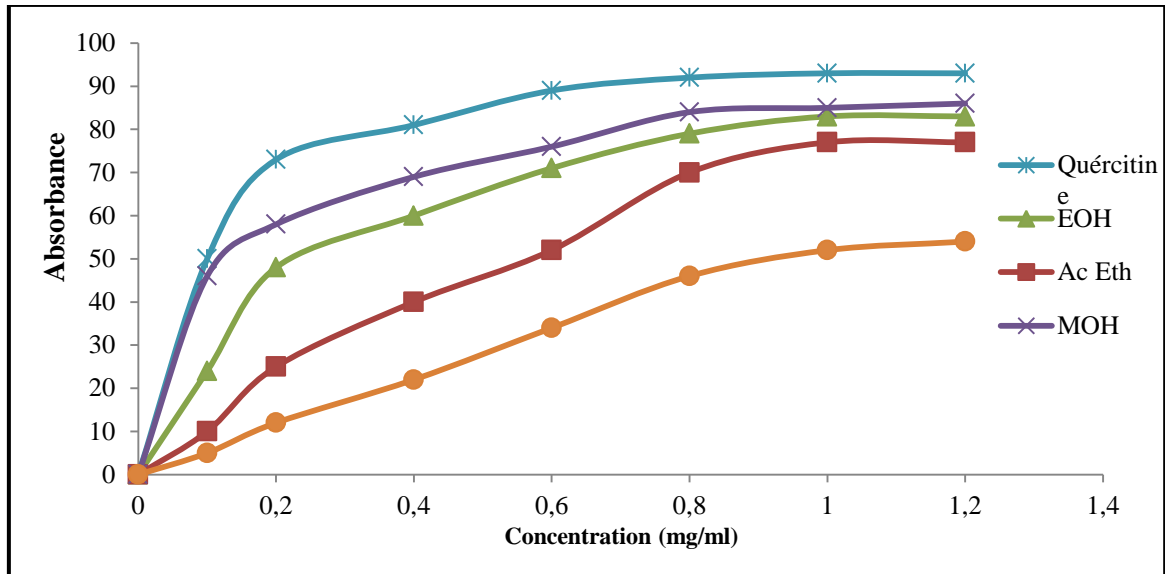


Figure 35: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits du *T.blecherianus* préparés par Soxhlet comparés à celui de la quercétine

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus blecherianus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus blecherianus*.

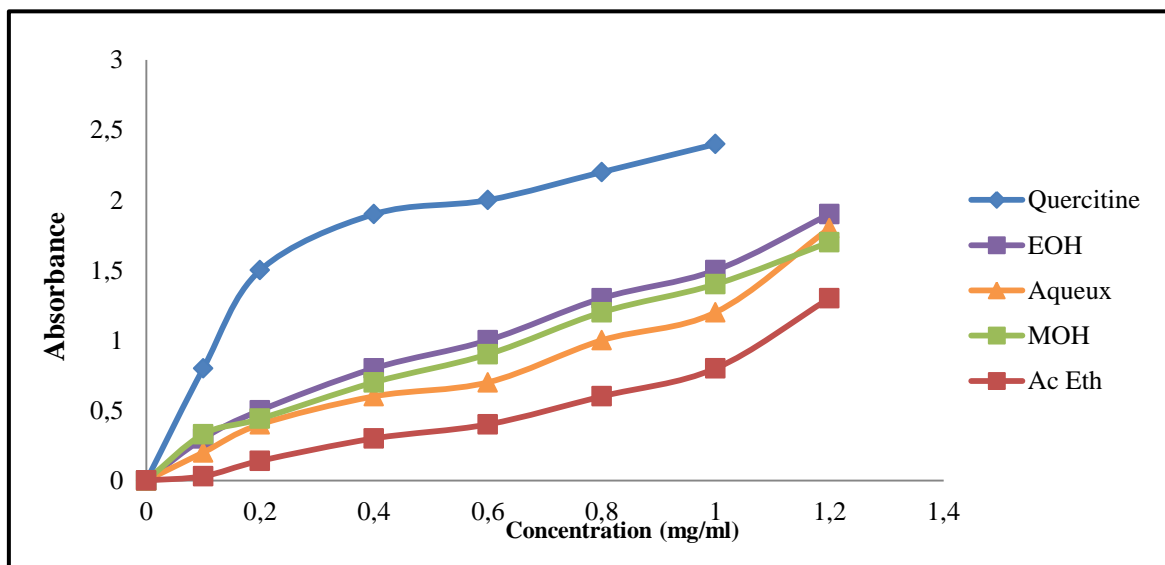


Figure 36: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits du *T.citriodorus L.* préparés par Soxhlet comparés à celui de la quercétine.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus citriodorus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus citriodorus*.

Nous avons évalué le pouvoir réducteur des HEs des trois plantes par rapport à la Quercétine en calculant la concentration efficace EC₅₀, qui est définie comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer. Les résultats d'activité réductrice exprimés en mg/ml sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Les valeurs des EC₅₀ pour les différents extraits en comparaison avec la Quercétine

Plantes	EC ₅₀ extraits (mg/ml)			
	EOH	MeOH	Ac Eth	Aq
<i>T. riatarum</i>	0.312±0.017 ^a	0.179±0.013 ^c	0.639±0.053 ^b	0.15±0.013 ^c
<i>T. blecherianus</i>	0,19±0.008 ^c	0,34±0.011 ^a	0,76±0.033 ^a	0,46±0.021 ^a
<i>T. citriodorus L.</i>	0,21±0.010 ^b	0,25±0.0109 ^b	0,76±0.018 ^a	0,33±0.011 ^b
Quercétine	0.03±0.006 ^d	0.03±0.006 ^d	0.03±0.006 ^c	0.03±0.006 ^d

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart type de trois essais différents. Dans chaque colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05). EOH : Extrait éthanolique; MeOH : Extrait méthanolique ; Ac Eth : Extrait acétate d'éthyle ; Aq : Extrait aqueux

Les résultats ci-dessus montrent clairement que les extraits aqueux et méthanoliques du *T. riatarum* présentent le pouvoir de réduire l'ion Fe⁺³ le plus intéressant, c'est-à-dire le potentiel antioxydant le plus fort, avec une valeur d'EC₅₀ égale à 0.15 ± 0.013 mg/ml et 0.179 ± 0.013 mg/ml respectivement. Ces résultats pourront expliquer que ces extraits qui présentent un pouvoir réducteur important renferment des molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort. Cependant, tous les extraits testés présentent une activité réductrice significativement plus faible en comparaison avec la quercitine dont l'EC₅₀ est égale à 0.03±0.006 mg/ml. En revanche, les extraits d'acétate d'éthyle des trois espèces de thym étudiées, possèdent le pouvoir réductrice le plus faible puisqu'ils ont les EC₅₀ les plus élevées.

II.1.5.3 Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale a été évaluée par la formation de complexes de phosphomolybdène. Ce dosage est basé sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) par l'extrait; la réaction de cette méthode s'accompagne de l'apparition d'une couleur verte.

Les résultats obtenus de ce test sont exprimés en mg équivalent de la vitamine C, prise comme étalon, par g de la matière sèche de l'échantillon végétal (mgEqVitC/gMS).

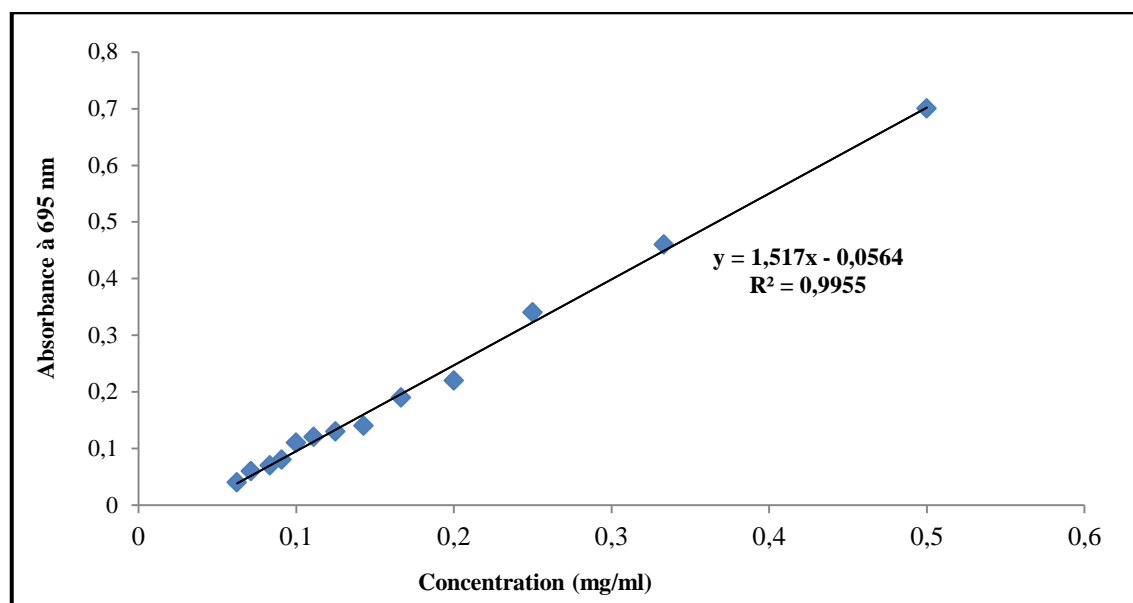


Figure 37: Courbe d'étalonnage de la vitamine C

Tableau 13: Capacité antioxydante totale des différents extraits en mgEqVitC/gMs.

Plantes	Extraits			
	EOH	MeOH	AcEth	Aq
<i>T. riatarum</i>	530±1,52 ^a	400,80±1,73 ^b	13,78±1,55 ^b	249±0,34 ^b
<i>T. blecherianus</i>	412±11,69 ^c	392,80±9,65 ^b	18,40±4,51 ^a	153,85±3,01 ^c
<i>T. citriodorus</i>	500,17±10,34 ^b	412,60±5,34 ^a	22,50±1,88 ^a	257,27±2,94 ^a

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart type de trois essais différents. Dans chaque ligne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,05). EOH : Extrait éthanolique; MeOH : Extrait méthanolique ; Ac Eth : Extrait acétan bhhptètygcvtc d'éthyle ; Aq : Extrait aqueux

D'après les résultats présentés dans le (Tableau 13), tous les extraits ont montré une capacité antioxydante totale. Les extraits éthanoliques du *T. riatarum* et *T. citriodorus* possèdent la meilleure capacité antioxydante totale qui est de l'ordre de 530±1,52 et 500,17±10,34 mgEq VitC/gMs respectivement suivi par les extraits méthanoliques des mêmes espèces de thym avec une valeur de 400,80±1,73 et 412,60±5,34 mgEqVitC/gMs respectivement. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle présente la capacité antioxydante la plus faible pour les trois types de thym.

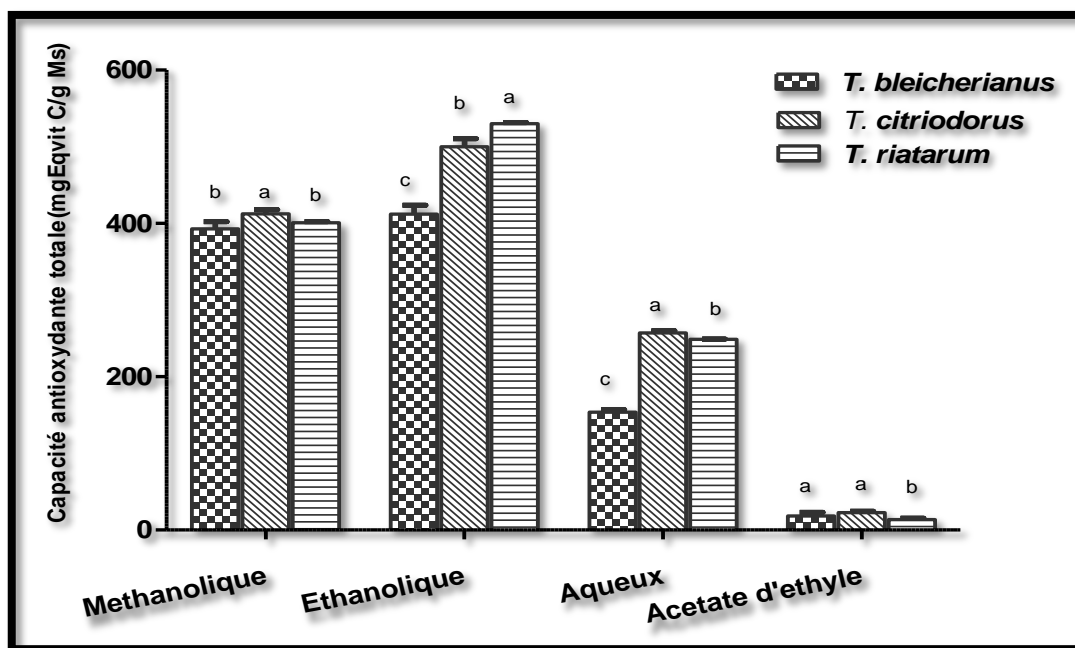


Figure 38: Capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits des trois espèces de thym : *T.blecherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,05$).

II.1.6 Corrélations

Dans le but de chercher la relation entre l'activité antioxydante des extraits et la teneur en composés phénoliques, on a calculé le coefficient de corrélation Pearson. Les résultats sont illustrés dans le tableau 14.

Tableau 14: Coefficients de corrélation de Pearson entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par différents tests

	DPPH	FRAP	CAT
Polyphénols	-0,78**	-0,58	0,76**
Flavonoïdes	-0,52	-0,30	0,84**
Flavones et Flavonols	-0,66	-0,74**	0,85**

* $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$.

II.1.6.1 Corrélation entre DPPH et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols

En établissant la relation entre les teneurs en polyphénols, en flavonoïdes, en flavonols et le DPPH des différents extraits des plantes étudiées, On remarque qu'il existe une corrélation significative avec la teneur en polyphénols ($r = -0,78$) et en flavones et flavonols ($r = -0,66$). Une moyenne corrélation existe aussi avec la teneur en flavonoïdes avec une valeur de $r = -0,52$.

II.1.6.2 Corrélation entre FRAP et les teneurs en polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols

Les résultats obtenus montrent une forte corrélation entre le paramètre EC_{50} et la teneur en flavones et flavonols ($r = -0,74$). Une faible corrélation est détectée entre la capacité de réduction de fer et la teneur en flavonoïdes avec un coefficient de corrélation de l'ordre de $r = -0,30$.

II.1.6.3 Corrélation entre la CAT et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols

D'après les résultats présentés dans le tableau 14. On remarque que la capacité antioxydante totale est fortement liée à la teneur en flavones et flavonols ($r = 0,85$) et en flavonoïdes ($r = 0,84$). Une corrélation significative existe aussi entre la capacité antioxydante totale et la teneur en polyphénols avec une valeur de $r = 0,76$.

II.2 Dosage de Polyphénols, flavonoïdes et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus* obtenus par macération

II.2.1 Rendement des extraits

Tableau 15: Rendements des différents extraits obtenus à partir de *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus*

Extraits	Rendement (%)		
	<i>T. riatarum</i>	<i>T. blecherianus</i>	<i>T. citriodorus</i>
Méthanol	6	10,45	8,14
Ethanol	8,02	13,22	12
Aqueux	16	20,21	18
Acétate d'éthyle	3,13	4,97	4,26

Il est remarquable d'après le tableau 15 que le rendement le plus élevé a été observé chez l'extrait aqueux avec les valeurs de 20,21 % , 18 % et 16 % pour le *T.blecherianus*, *T.citriodorus* et *T. riatarum* respectivement. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle présente le rendement le plus faible pour les trois plantes. Quel que soit le solvant utilisé, le rendement obtenu pour le *T.blecherianus* est nettement supérieur à celui des deux autres espèces.

II.2.2 Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols est réalisée par spectrophotométrie avec le réactif de Folin Ciocalteu. Le dosage des polyphénols totaux des quatre extraits étudiés est calculé à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de la matière sèche (mgEqAG/gMS). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans les quatre extraits (Figure 39).

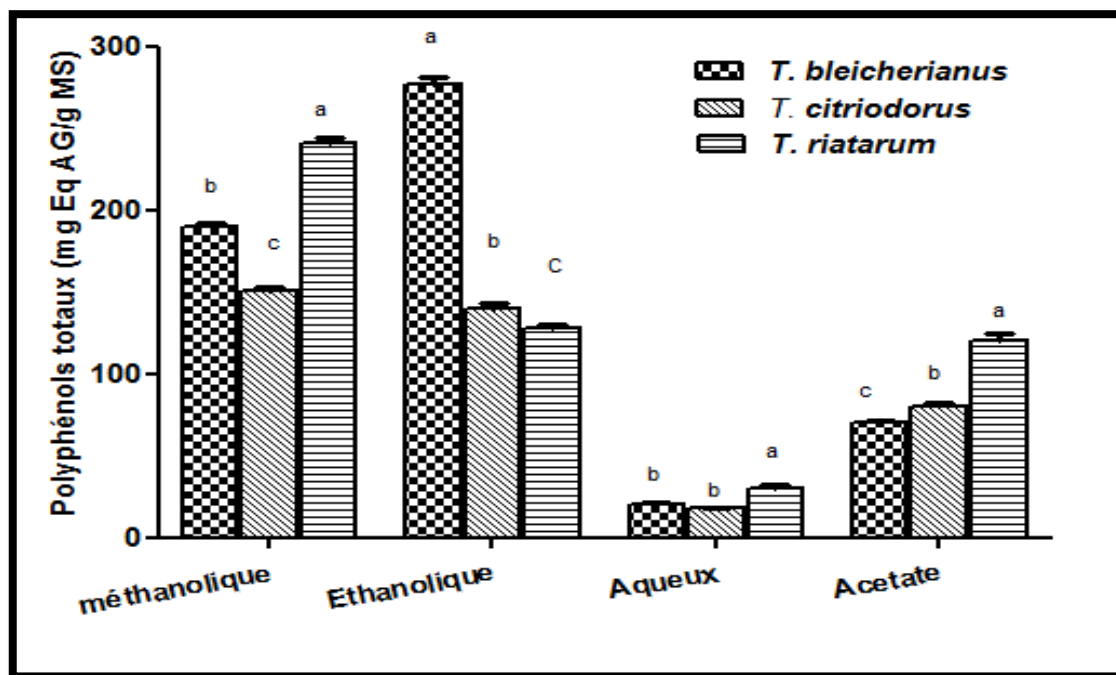


Figure 39: Teneur en polyphénols dans les différents extraits des trois espèces de thym : *T.blecherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMS. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,05$).

Les résultats obtenus indiquent qu'avec l'éthanol et méthanol on pourrait extraire la quantité la plus élevée des composés phénoliques à partir des trois espèces étudiées. Par contre l'extrait aqueux a présenté la teneur la plus faible avec des valeurs de l'ordre de 29,68±2,22 mgEqAG/gMs pour le *T. riatarum*, 20,68±1,25 mgEqAG/gMs pour le *T. blecherianus* et 17,61±1,01 mgEqAG/gMs pour le *T. citriodorus*. A l'exception de l'extrait éthanolique c'est le *T. riatarum* qui contient la quantité la plus élevée des polyphénols dans les différents extraits.

II.2.3 Détermination de la teneur en flavonoïdes

II.2.3.1 Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes est réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃).

La quercétine est utilisé comme standard, il nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes des différents extraits étudiés. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de la quercétine par gramme de la matière sèche (mgEqQ/gMs).

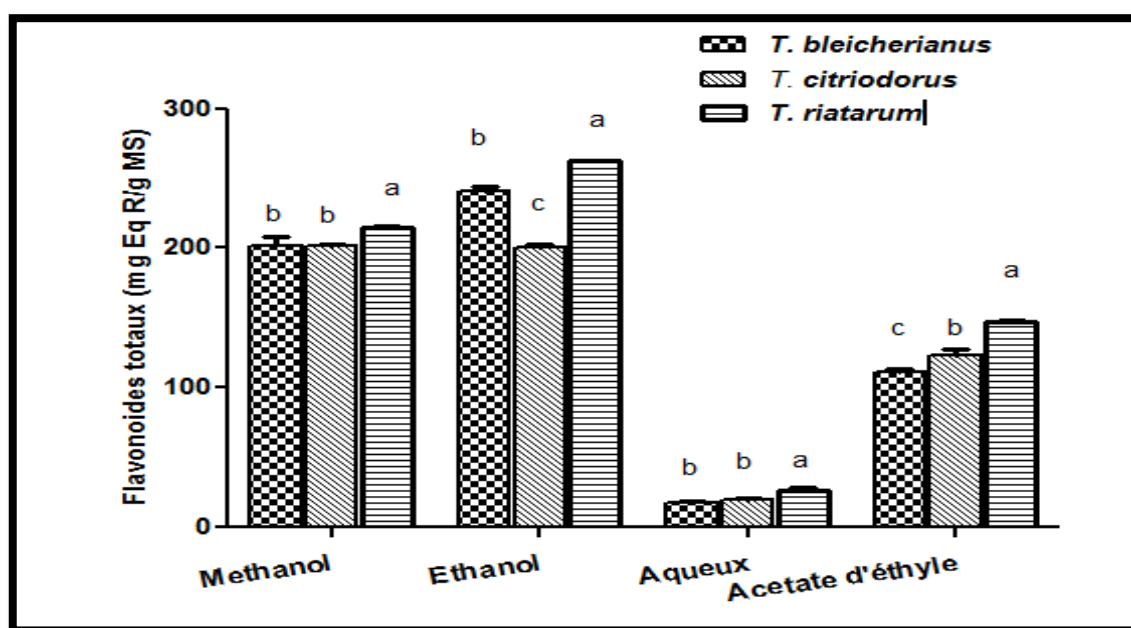


Figure 40: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des trois espèces de thym : *T.blecherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs ± SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant (p < 0,05).

D'après les résultats présentés dans la Figure 40 ci-dessus, on remarque que quel que soit le solvant d'extraction utilisé, le *T. riatarum* est très riche en flavonoïdes que les deux autres espèces de thym. Cette richesse est beaucoup plus marquée lorsque l'éthanol est utilisé comme solvant d'extraction avec une valeur de $262,30 \pm 0,25$ mgEqR/gMs. Il est également à noter que pour les trois espèces étudiées, la teneur en flavonoïdes des extraits aqueux est faible.

II.2.3.2 Dosage des flavones et flavonols

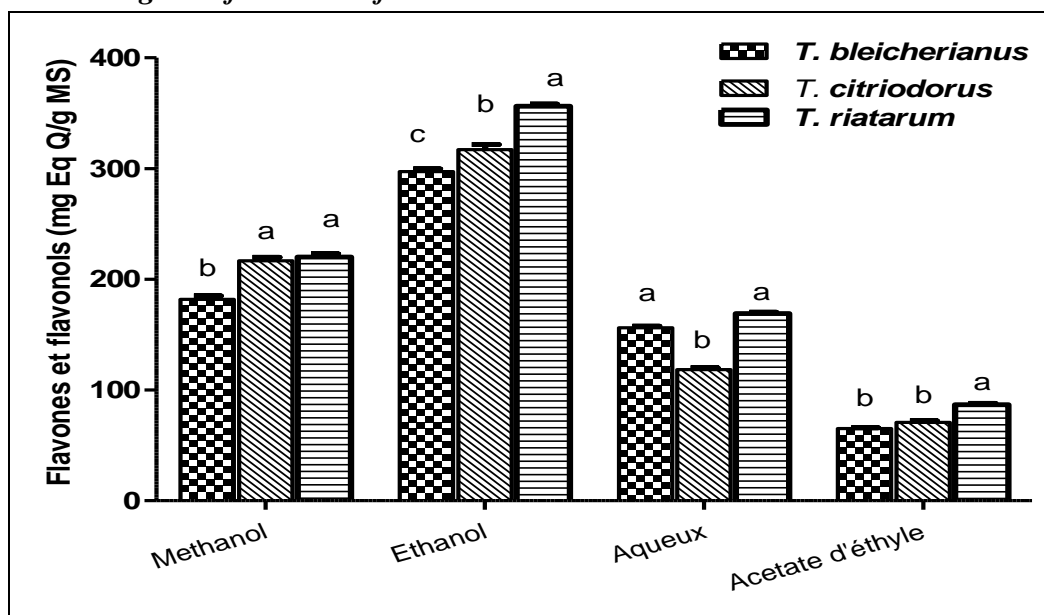


Figure 41: Teneur en flavones et flavonols dans les différents extraits des trois espèces de thym: *T.bleicherianus*, *citriodorus* et *riatarum*

Les résultats ont été exprimés en mgEq AG/gMs. Chaque valeur représente la moyenne des trois valeurs \pm SD, les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ($p < 0,05$).

La teneur en flavones et flavonols, de chaque échantillon végétal ainsi extrait, est calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée avec la Quercétine prise comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de Quercétine par gramme de la matière végétale sèche (mgEqQ/gMs). Les résultats sont présentés dans la figure 41. L'extrait éthanolique a pu extraire les quantités les plus importantes des flavones et flavonols à partir des trois plantes, avec des valeurs qui sont de l'ordre de $356,21 \pm 2,10$ mgEqQ/gMs pour le *T. riatarum*, $317,10 \pm 4,54$ mgEqQ/gMs pour le *T. citriodorus* et $297,20 \pm 2,45$ mgEqQ/gMs pour le *T. bleicherianus*. Généralement, le *T. riatarum* contient significativement les quantités les plus importantes en flavones et flavonols par rapport aux deux autres espèces de thym.

II.2.4 Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

II.2.4.1 Piégeage du radical libre DPPH

Les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de chaque extrait (Figures 42, 43 et 44). Ces figures montrent que les pourcentages d'inhibition varient en fonction des différentes concentrations utilisées.

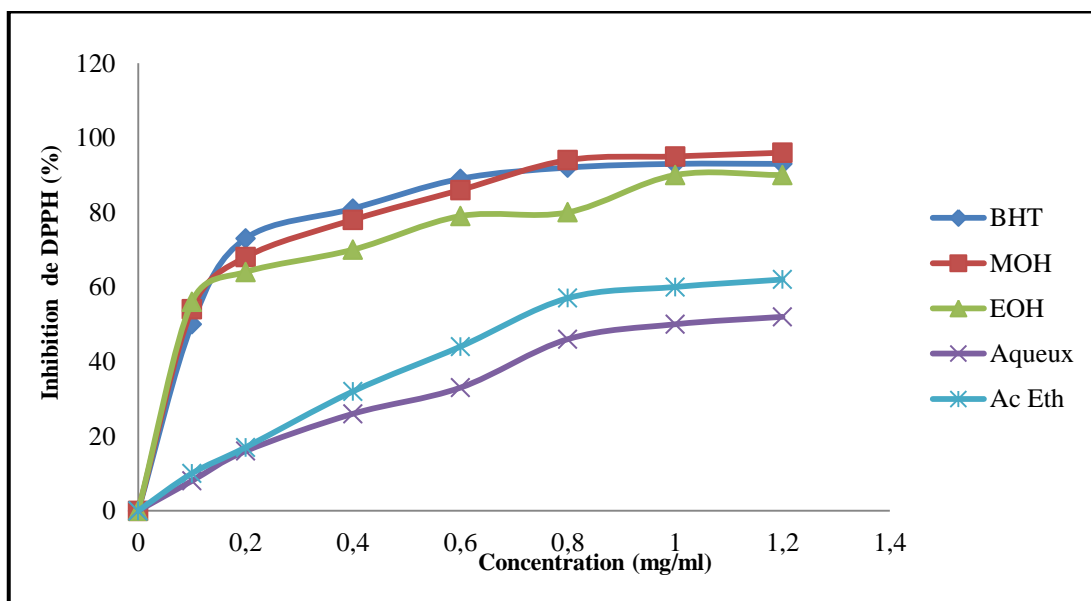


Figure 42: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du *Thymus riatarum* préparés par macération comparés au BHT.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus riatarum*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus riatarum*. BHT : Hydroxytoluène butylé

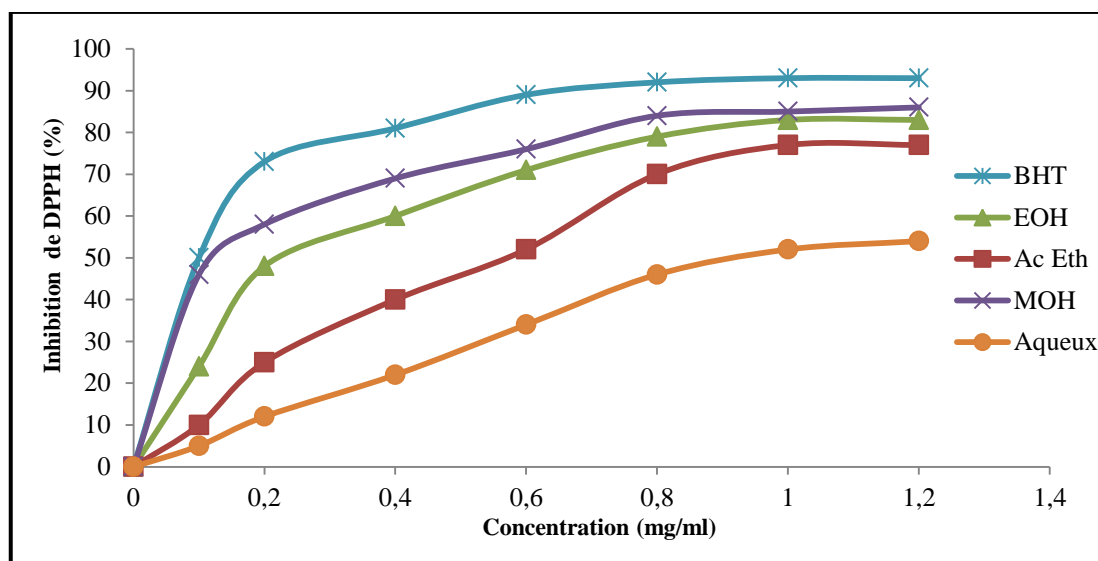


Figure 43: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du *Thymus blecherianus* préparés par macération comparés au BHT.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus blecherianus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus blecherianus* ; BHT : Hydroxytoluène butylé

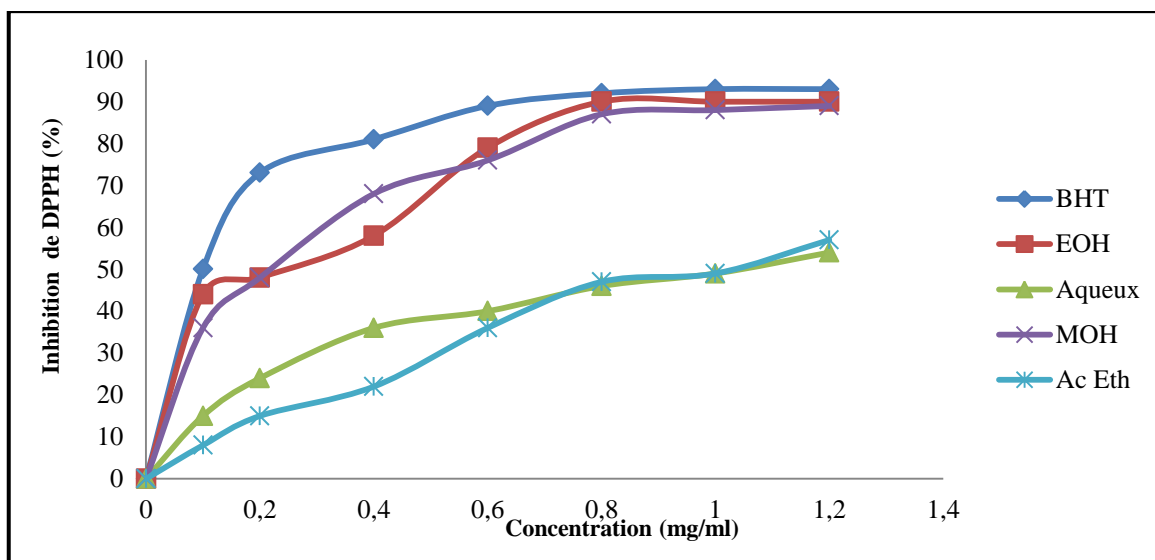


Figure 44: Test de DPPH des différents extraits des feuilles du *Thymus citriodorus L.* préparés par macération comparés au BHT.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus citriodorus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus citriodorus*. BHT : Hydroxytoluène butylé

Les résultats présentés dans le tableau 16 sont exprimés selon les valeurs d'IC₅₀ en comparaison à celle du standard (BHT). Ces résultats, montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits.

La valeur d'IC₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé. Elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est élevée, plus l'activité antioxydante d'un composé est basse.

Tableau 16: Les valeurs des IC₅₀ des différents extraits en comparaison avec le BHT

Plantes	IC ₅₀ extraits (mg/ml)			
	EOH	MeOH	Ac Eth	Aq
<i>T. riatarum</i>	0.091±0.02 ^d	0.087±0.01 ^d	0.670±0.03 ^b	1.025±0.02 ^b
<i>T. blecherianus</i>	0.36±0.02 ^a	0.19±0.04 ^b	0.58±0.19 ^b	1,05±0.01 ^b
<i>T. citriodorus L.</i>	0.27±0.04 ^b	0.36±1,13 ^a	1,12±0.05 ^a	1.34±0.03 ^a
BHT	0.119±0.002 ^c	0.119±0.002 ^c	0.119±0.002 ^d	0.119±0.002 ^c

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart type de trois essais différents. Dans chaque colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05). EOH : Extrait éthanolique; MeOH : Extrait méthanolique ; Ac Eth : Extrait acétate d'éthyle ; Aq : Extrait aqueux ; BHT : Hydroxytoluène butylé

Ces résultats indiquant clairement que tous les extraits possèdent une bonne activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH avec des valeurs d'IC₅₀ allant de 0.087 ± 0.01 jusqu'à 1.34 ± 0.03 mg/ml. Il est remarquable que la concentration inhibitrice piégeant 50 % du radical DPPH (IC₅₀) des extraits éthanolique et méthanolique du *T. riatarum* est significativement inférieure à celle du BHT avec les valeurs de 0.091±0.02 et 0.087±0.01 mg/ml respectivement. Ce qui signifie que les constituants de ces extraits du *T. riatarum* possèdent un pouvoir antioxydant plus élevé que celui du BHT. Cependant, quel que soit la plante, l'extrait aqueux a révélé l'effet antioxydant le plus faible vis-à-vis du radical DPPH.

II.2.4.2 Pouvoir réducteur du fer

Les résultats de l'activité réductrice des différents extraits des plantes étudiées, sont représentés dans les figures (45, 46 et 47).

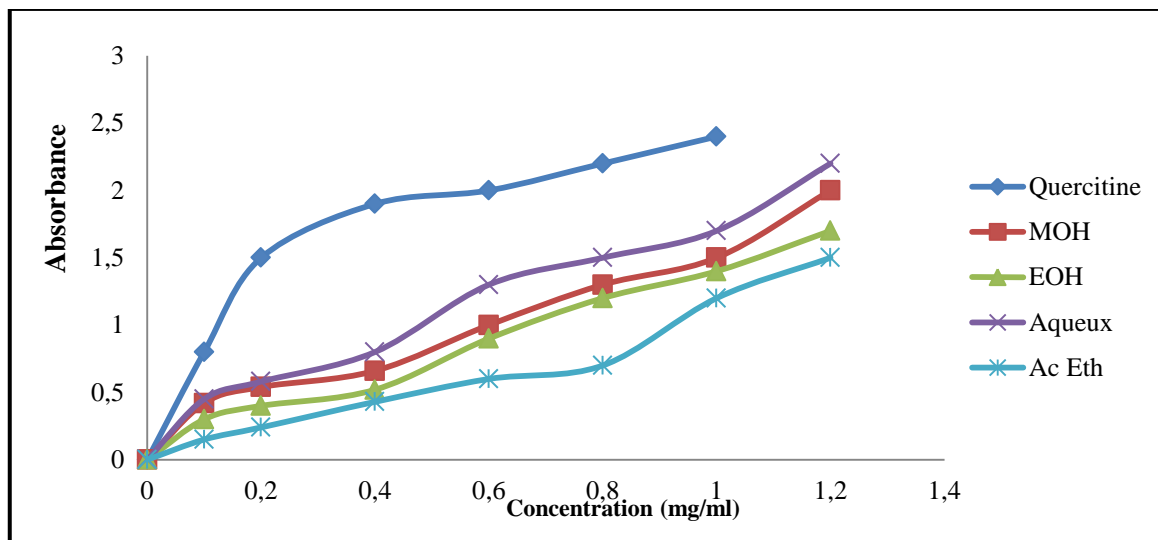


Figure 45: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits des extraits du *T.riatarum* préparés par macération comparés à la quercétine.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus riatarum*; (Aqueux) : Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus riatarum*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus riatarum*.

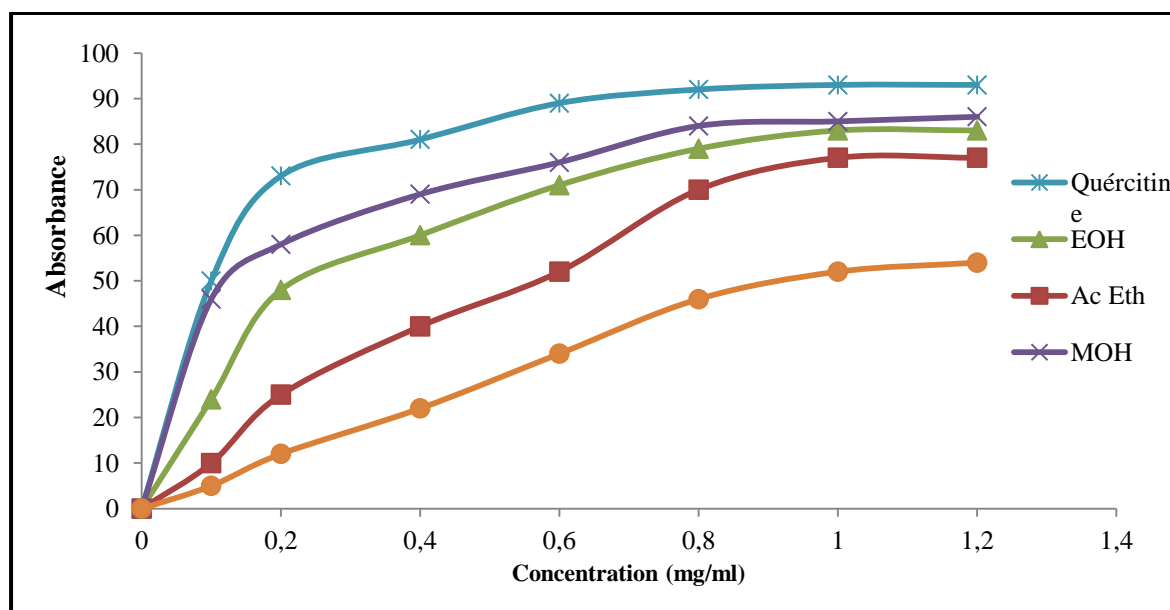


Figure 46: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits des extraits du *T.blecherianus* préparés par macération comparés à la quercétine.

(EOH) : Extrait éthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus blecherianus*; (Aqueux) : Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus blecherianus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus blecherianus*.

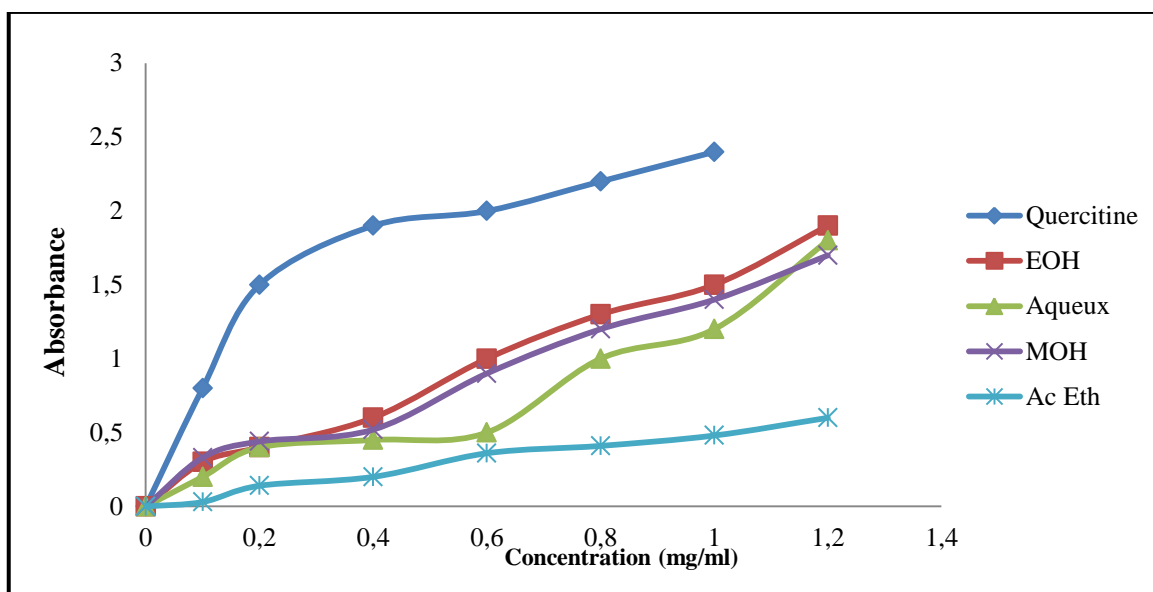


Figure 47: Pouvoirs réducteurs du fer des extraits des extraits du *T.citriodorus* préparés par macération comparés à la quercétine.

(EOH) : Extrait éthanologique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (MOH) : Extrait méthanolique des feuilles du *Thymus citriodorus*; (Aqueux): Extrait aqueux des Feuilles du *Thymus citriodorus*; (Ac Eth) : Extrait d'acétate d'éthyle des feuilles du *Thymus citriodorus*.

Tableau 17: Les valeurs des EC₅₀ des différents extraits en comparaison avec la Quercétine

Plantes	EC ₅₀ extraits (mg/ml)			
	EOH	MeOH	Ac Eth	Aq
<i>T. riatarum</i>	0,39±0,02 ^a	0,19±0,01 ^c	0,43±0,05 ^c	0,17±0,02 ^b
<i>T. blecherianus</i>	0,32±0,01 ^b	0,48±0,02 ^a	1,25±0,03 ^a	0,62±0,04 ^a
<i>T. citriodorus L.</i>	0,29±0,04 ^c	0,38±0,06 ^b	1,15±0,04 ^b	0,6±0,05 ^a
Quercétine	0,03±0,006 ^d	0,03±0,006 ^d	0,03±0,006 ^d	0,03±0,006 ^c

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart type de trois essais différents. Dans chaque colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05). EOH : Extrait éthanologique; MeOH : Extrait méthanolique ; Ac Eth : Extrait acétate d'éthyle ; Aq : Extrait aqueux

Les résultats de l'activité réductrice montrent clairement que les extraits du *T. riatarum* présentent une activité réductrice significativement plus importante que celle du *T. blecherianus* et *T. citriodorus*. En effet, l'extrait aqueux du *T. riatarum* présente le pouvoir de réduire l'ion Fe⁺³ le plus intéressant avec une valeur d'EC₅₀ de 0,17 ± 0,02 mg/ml suivi par l'extrait

méthanolique de la même plante dont la valeur d'EC₅₀ est de 0,19 ± 0,01 mg/ml. En comparaison avec la quercétine, tous les autres extraits testés sont significativement moins actifs.

II.2.4.3 Capacité antioxydante totale (CAT)

Tableau 18: Capacité antioxydante totale des différents extraits en mgEqVitC/gMs.

Plantes	Extraits			
	EOH	MeOH	AcEth	Aq
<i>T. riatarum</i>	420±2,25 ^a	268,84±1,58 ^a	18,16±1,21 ^a	149±0,17 ^b
<i>T. blecherianus</i>	405,70±1,72 ^b	242,80 ±9,90 ^b	22,08±4,62 ^c	115,68±1,30 ^a
<i>T. citriodorus</i>	316±1,60 ^c	236,53 ±3,35 ^c	26,85±1,52 ^b	127,87±2,66 ^a

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart type de trois essais différents. Dans chaque ligne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P <0,05). EOH : Extrait éthanologique; MeOH : Extrait méthanolique ; Ac Eth : Extrait acétate d'éthyle ; Aq : Extrait aqueux

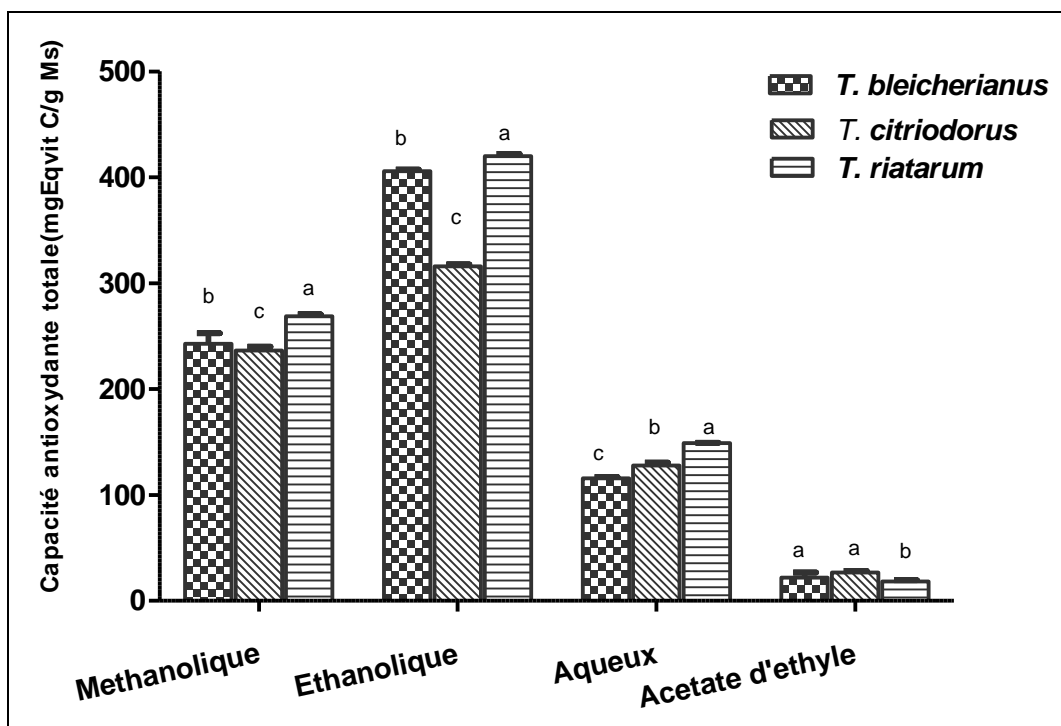


Figure 48: Capacité antioxydante totale (CAT) des différents extraits en mg Eq Vit C /g Ms. Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD.

Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant d'extraction (p <0,05). EOH : Extrait d'éthanol ; MeOH : Extrait méthanolique ; Aq : Extrait aqueux ; AcEth : Extrait d'acétate d'éthyle.

Les résultats présentés dans le tableau 18 et la figure 49 montrent que les extraits éthanolique du *T. riatarum* et *T. blecherianus* révèlent une activité antioxydante totale importante avec des valeurs qui sont de l'ordre de $420 \pm 2,25$ mgEqVitC/gMs et $405,70 \pm 1,72$ mgEqVitC/gMs respectivement. Cependant, les teneurs les plus faibles ont été obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle des trois plantes étudiées.

II.2.4.4 Corrélations

II.2.4.4.1 Corrélation entre DPPH et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols

Les résultats des coefficients de corrélations Pearson sont illustrés dans le tableau 19. Ce coefficient est calculé dans le but de chercher la relation entre la teneur des extraits en différentes composées et leurs activités antioxydantes.

Tableau 19: Coefficients de corrélation de Pearson entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante par différents tests

	DPPH	FRAP	CAT
Polyphénols	-0,74**	-0,61	0,85**
Flavonoïdes	-0,92***	-0,50	0,98***
Flavones et Flavonols	-0,55	-0,66	0,65

* P< 0,05 ; ** : P< 0,01 ; *** : P< 0,001.

Les résultats présentés dans le tableau 19 justifient une forte et significative corrélation entre la teneur en flavonoïdes et le test de DPPH avec un coefficient de corrélation égale à -0,92. Une bonne corrélation est aussi enregistrée entre les polyphénols et le DPPH ($r = -0,74$). Toutefois, le test du radical libre DPPH et la teneur en flavones et flavonols indique une corrélation faible.

II.2.4.4.2 Corrélation entre FRAP et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols

Les résultats obtenus montrent une corrélation significative entre le paramètre EC_{50} et la teneur en flavones et flavonols ($r = -0,66$) et polyphénols ($r = -0,61$). Il y a une aussi une

corrélation entre la capacité de réduction de fer et la teneur en flavonoïdes avec un coefficient de corrélation de l'ordre de $r = -0,50$.

II.2.4.4.3 Corrélation entre la CAT et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols

Dans le but d'établir la relation entre la capacité antioxydante totale et les teneurs en différents composés phénoliques des extraits, on a calculé le coefficient de corrélation (Pearson). On remarque que la capacité antioxydante totale est fortement liée à la teneur en flavonoïdes ($r=0,98$) et en polyphénols ($r=0,85$). Une corrélation significative existe aussi entre la capacité antioxydante totale et la teneur en flavones et flavonols avec une valeur de ($r = 0,65$).

III. Discussion

III.1 Rendement des extraits

Quelle que soit la méthode d'extraction (Soxhlet ou macéré) ou la plante étudiée, l'extrait aqueux révèle le rendement le plus élevé. Cependant l'acétate d'éthyle présente le rendement le plus faible pour les trois plantes étudiées. Nos résultats, sont beaucoup plus élevés que ceux rapporté par Ramchoun et al. (2012) en enregistrant des rendements avec des valeurs de l'ordre de 10.00, 7.60, 7.60 et 14.80 % pour les extraits aqueux de *T. satureioides*, *T. zygis L.*, *T. atlanticus* et *T. vulgaris* respectivement. Concernant nos extraits méthanoliques des différents types de thym, Le rendement a été remarquablement élevé comparé à celui enregistré par Korib et al. (2017) avec un taux de 4 % avec les feuilles et de 2.92 % avec les fleurs de *T.ciliatus*. Cependant, une autre étude a révélé un rendement élevé de l'ordre de 13,11 % en étudiant l'extrait méthanolique de *Thymus spathulifolius* de la Turquie (Sokmen et al., 2004).

En conclusion, plusieurs paramètres peuvent influencer le rendement, telle que les conditions d'extraction (le temps et la température), la méthode d'extraction, ainsi que le type de solvant utilisé.

III.2 Criblage phytochimique

Le screening phytochimique sur les extraits des végétaux est une étape préliminaire et d'une grande importance puisqu'elle révèle la présence des constituants connus par leur activités physiologiques et possédant des vertus médicinales (Sofowora, 1993). Les compositions des extraits du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* ne sont pas identifiées dans la littérature. Selon les travaux antérieurs, les espèces du genre *Thymus* sont riches en flavonoïdes (Haraguchi et al., 1996; Ismaili et al., 2001); ces données sont comparables avec nos résultats puisque ces analyses ont révélé la présence des flavonoïdes avec des quantités importantes. Kholkhal et al. (2014) rapporte d'après une analyse faite sur le *Thymus ciliatus ssp coloratus* et *ssp euciliatus* que les flavonoïdes et les tanins sont présents avec une intensité importante dans la partie aérienne des deux plantes. Ceci concorde parfaitement avec nos résultats qui montrent la richesse des extraits éthanoliques des trois plantes en métabolites secondaires.

L'abondance de ces composés peut être l'explication des activités antibactériennes, antioxydantes, antiseptiques, anti-inflammatoires, et antivirales de différentes espèces de thym.

III.3 Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes, flavones et flavonols

Les résultats de la teneur en composés phénoliques chez les feuilles du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* ont montré que les extraits éthanoliques et méthanoliques extraites par les deux techniques Soxhlet et macéré, contiennent les quantités les plus élevées de polyphénols par rapport aux autres extraits. La teneur en phénols totaux de nos extraits éthanoliques des trois espèces de Thym est supérieure au taux trouvé par Köksal et al. (2017) et Nieto et al. (2011) qui ont montré que la quantité de composés phénoliques totaux dans l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* est de 158.0 et 101.4 (μg EAG /mg d'extrait) respectivement.

En comparant nos résultats à celle d'une autre étude menée par Sokmen & Gurel, (2001), on constate que la quantité des composés phénoliques de l'extrait méthanolique du *T. spathulifolius* est inférieure à la nôtre avec une valeur de 141 mg EAG/gMs.

Le changement de distribution des métabolites secondaires peut être lié aux conditions climatiques (la température élevée, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Fadili et al., 2017).

La teneur élevée des composés phénoliques d'une plante dépend aussi de plusieurs facteurs tels que, les conditions climatiques, le solvant d'extraction, le moment de la récolte, les conditions de stockage (Fadili et al., 2015).

Concernant les résultats de la teneur en flavonoïdes, l'extrait éthanolique a montré la teneur la plus intéressante en flavonoïdes quel que soit la plante et quel que soit la technique utilisée. Cependant, les teneurs minimales ont été obtenues avec l'extrait aqueux des trois plantes, ce qui n'est pas en concordance avec une étude préliminaire menée par Tepe et al. (2005) qui a révélé que les extraits aqueux de *T. saturoioides*, *T. atlanticus* et *T. zygis* ont montré la teneur en flavonoïdes la plus élevée avec les valeurs de l'ordre de $182,79 \pm 3,23$ mg EQ/gMs, $155,11 \pm 3,90$ mgEQ/gMs et $208,13 \pm 4,20$ mgEQ/gMs respectivement. En général, pour les deux techniques l'éthanol reste le meilleur solvant d'extraction des flavonoïdes pour les trois espèces étudiées.

Pour l'extrait éthanolique préparé par la technique de Soxhlet, c'est les feuilles du *T. citriodorus L* qui contiennent la teneur significativement la plus importante en flavones et flavonols. Toutefois, l'extrait éthanolique de la *T. riatarum* préparé par macération montre des quantités plus importantes en flavones et flavonols par rapport aux *T. blecherinaus* et *T. citriodorus L*. Concernant les solvants d'extraction, c'est l'acétate d'éthyle qui donne le rendement le plus faible en flavones et flavonols pour les deux techniques, quel que soit la plante étudiée.

Diverses recherches expérimentales ont montré que de nombreux métabolites secondaires tels que les composés polyphénoliques et flavonoïdes extraits de plantes médicinales et aromatiques possèdent une activité antioxydante élevée en raison de leurs groupes hydroxyle et peuvent protéger plus efficacement contre de nombreuses maladies causées par les radicaux libres (Ozen, et al., 2011).

III.4 Activité antioxydante

III.4.1 piégeage du radical libre (DPPH)

La détermination de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux donne une idée sur le potentiel antioxydant des extraits, mais elle ne peut pas être utilisée pour prédire le comportement antioxydant. Cela nous a donc conduit à réaliser une étude de l'activité antioxydante par des méthodes spécifiques à savoir le piégeage du radical libre (DPPH), la réduction de fer (FRAP), et l'activité antioxydante totale (CAT).

Plusieurs études antécédentes ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend de plusieurs paramètres: la structure, les substituant, la dose et le degré de polymérisation de la molécule (Kitagawa et al., 1992). Le test DPPH est un radical libre stable, qui accepte un électron ou un proton pour donner une molécule stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. Ce test est basé sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en α - α ,diphényl-b-picryl-hydrazine de couleur jaune en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron.

Pour mettre en évidence les extraits de thymus les plus actifs, nous avons comparé l'activité antiradicalaire DPPH avec celle d'un antioxydant de référence BHT. L'IC₅₀ de chaque extrait est déduite à partir de la droite d'étalonnage correspondante. Une IC₅₀ intéressante signifie une faible activité antioxydante. Le *T. riatarum*, *T. blecherianus* et *T. citriodorus* constituent une bonne source d'antioxydants. En outre, d'après nos résultats on a pu remarquer clairement que les extraits méthanolique et éthanolique préparés par Soxhlet des trois plantes étudiées possèdent une bonne activité antiradicalaire vis-à-vis du DPPH. Surtout le *T. riatarum* qui a révélé des valeurs d'IC₅₀ légèrement inférieur à celle du standard, 0,085±0,010 mg/ml pour l'extrait méthanolique et 0,110±0,016 mg/ml pour l'extrait éthanolique. Ces résultats corroborent parfaitement avec les résultats d'une étude antérieure Zeghib et al.,(2013) en terme de la forte activité antioxydante obtenue par les extraits méthanoliques du *T. numidicus* et *T. guyonii*. Une autre étude à prouver que le rendement d'extrait méthanolique des feuilles et fleurs à enregistré une bonne inhibition de 50% de radicaux libre (IC₅₀) de l'ordre de 0,0374 mg/ml et de 0,0499 mg/ml respectivement pour les feuilles et fleurs (Korib, 2017). Par contre, Tortosa et al., (2012) a révélé que l'eau peut être considéré comme un bon extracteur, en effet, l'activité antiradicalaire de l'extrait aqueux du *T. membranaceus* est légèrement plus élevée que les autres extraits.

D'après les résultats intéressants de cette présente étude, on peut déduire que les extraits éthanoliques et méthanoliques des trois espèces de thym étudiés peuvent être utilisé comme des agents protecteurs contre le stress oxydatif. En effet, les composés antioxydants, peuvent être utilisés pour prévenir de la dégradation induite par l'irradiation UV.

III.4.2 Le pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Benzie & Strain (1996), ont considéré l'antioxydant comme toute molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprété l'activité antioxydante comme la capacité réductrice.

La réduction du fer est une analyse de l'activité antioxydante facile, rapide et reproductible. La capacité réductrice d'un composé peut donner une idée significative de son activité antioxydante potentielle.

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction du fer ferrique en fer ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleue dans le milieu réactionnel à 700 nm (Cung et al., 2002). En d'autre terme, le système $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination semi quantitative des concentration des polyphénols, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et al., 2008).

Dans cette partie de la présente étude, nous avons opté pour tester les différents extraits issus des trois espèces de thym. Pour chaque extrait l' EC_{50} est déduite à partir de la droite d'étalonnage correspondante. De même, les résultats obtenus corroborent avec le fait que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (Liu et al., 2007; Öztürk et al., 2007)

Une étude menée à Tlemcen par Mahlia, (2016) a montré que les extraits aqueux des feuilles et de tiges de *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* a révélé une bonne efficacité à chélater le fer en enregistrant des EC_{50} avec des valeurs de l'ordre de 0,19 et 0,033 mg/ml respectivement. Ces données corroborent parfaitement avec les résultats de la présente étude en termes de la forte activité antioxydante obtenue par l'extrait aqueux des feuilles du *T. riatarum* marocaine préparé par Soxhlet dont les EC_{50} sont de l'ordre de 0.179 ± 0.013 mg/ml. Une autre étude a démontré que les extraits méthanoliques des feuilles et fleurs de *Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus* présentent une efficacité de réduction de fer en enregistrant une EC_{50} de l'ordre de 0,0171mg/ml et 0,0306mg/ml respectivement (Korib, 2017).

Le pouvoir réducteur des trois espèces étudiées est probablement dû à la participation des groupements hydroxyle liés au noyau catéchol qui peuvent servir comme donneurs d'électrons.

III.4.3 Capacité antioxydante totale (CAT)

L'activité antioxydante totale varie selon la plante étudiée et le solvant d'extraction. Généralement, l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction. D'ailleurs, pour la méthode d'extraction Soxhlet, le *T. blecherianus* qui a révélé la capacité antioxydante la plus faible par rapport aux deux autres espèces de thym. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur

la capacité antioxydante totale des extraits des trois espèces étudiées, il est difficile donc de comparer nos résultats avec les données de la bibliothèque scientifique.

III.5 Corrélation

Généralement, quel que soit la méthode d'extraction soit par la technique de Soxhlet ou par macération, nous avons constaté une corrélation très significative entre les trois tests de l'activité antioxydante (DPPH, FRAP et CAT) et la teneur en polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols. Ce résultat est confirmé par d'autres groupes de chercheurs. Selon Liu et al., (2007), il existe une étroite relation entre l'activité antioxydante et la composition phénoliques ainsi que le solvant utilisé dans l'extraction. D'après Brown et al., (1998), les composés phénoliques ont une bonne corrélation avec le pouvoir chélateur du fer. Cependant, Miguel et al., (2010) a révélé que les composés mono-hydroxylé le 1,8-cinéole et le terpinèn-4-ol sont incapable de chélater les ions ferreux.

IV. Conclusion

La mise en évidence des polyphénols, flavonoïdes, flavones et flavonols, par les extraits des feuilles du *Thymus riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L* montrent que ces derniers sont riches en composés phénoliques. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits réalisés par estimation de la capacité de piégeage du radical libre (DPPH), le pouvoir chélateur du fer (FRAP) et la capacité antioxydante totale (CAT) montre que les extraits des trois plantes étudiées sont doués d'un pouvoir antioxydant très important. A l'issue de ce travail, nos extraits étudiés pourraient devenir un agent antioxydant naturel et possède un potentiel dans le domaine des industries alimentaires et pharmaceutiques, à condition que le solvant et la technique d'extraction soient appropriés.

CHAPITRE IV : Activité hépatoprotectrice des extraits aqueux du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* L

I. Introduction

Les pathologies hépatiques représentent l'un des problèmes les plus importants de santé mondiale, avec une cirrhose du foie et des lésions hépatiques d'origine médicamenteuse qui représente la neuvième cause de décès dans les pays en voie de développement (Saleem et al., 2010).

Il est connu que les médicaments synthétiques destinés pour traiter les maladies hépatiques peuvent causer des dommages au foie (Chen et al., 2011). Cependant, les médicaments à base de plantes sont devenus largement répandue et de plus en plus utilisé. Plusieurs études antécédentes ont montré l'activité hépatoprotectrice des plantes médicinales. Les plantes hépatoprotectrices contiennent plusieurs constituants chimiques tels que des phénols, monoterpènes, coumarines, glycosides et alcaloïdes (Bhawna & Kumar, 2009). Un certain nombre de plantes sont disponibles pour le traitement des maladies du foie (Gite et al., 2010). Plus de cent dix plantes ont révélé une activité hépatoprotective importante (Girish et al., 2009). Ces dernières protègent contre les dommages causés au foie par l'inhibition des activités plasmatiques des aminotransférases (ASAT, ALAT), phosphatase alcaline (PAL) et de la bilirubine.

Il est important que des travaux soient entrepris afin d'apporter une base scientifique à l'utilisation des remèdes traditionnelles par les populations pour le soin des troubles hépatobiliaires.

II. Effet hépatoprotecteur des extraits aqueux du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* L

Le but de ce chapitre est d'évaluer les propriétés hépatoprotectrices des extraits aqueux des trois thymus étudiés, les rats reçoivent pendant sept jours ces extraits de différentes doses par voie orale. Ensuite, l'hépto-toxicité est induite par l'injection intra-péritonéale du tétrachlorure de carbone (CCl₄).

II.1 Effet des trois espèces de thym sur le poids corporel et le poids relatif du foie

L'étude expérimentale a été réalisée sur des rats Wistar albinos, dont le poids varie entre 170 et 230 g. les animaux sont répartis de façon aléatoire en six groupes de six rats chacun, On a procédé à une prise de poids au début et à la fin de l'expérimentation.

Les résultats des moyennes du poids initial (avant le traitement) et du poids final (après le traitement) des rats des six groupes sont présentés dans la figure 49.

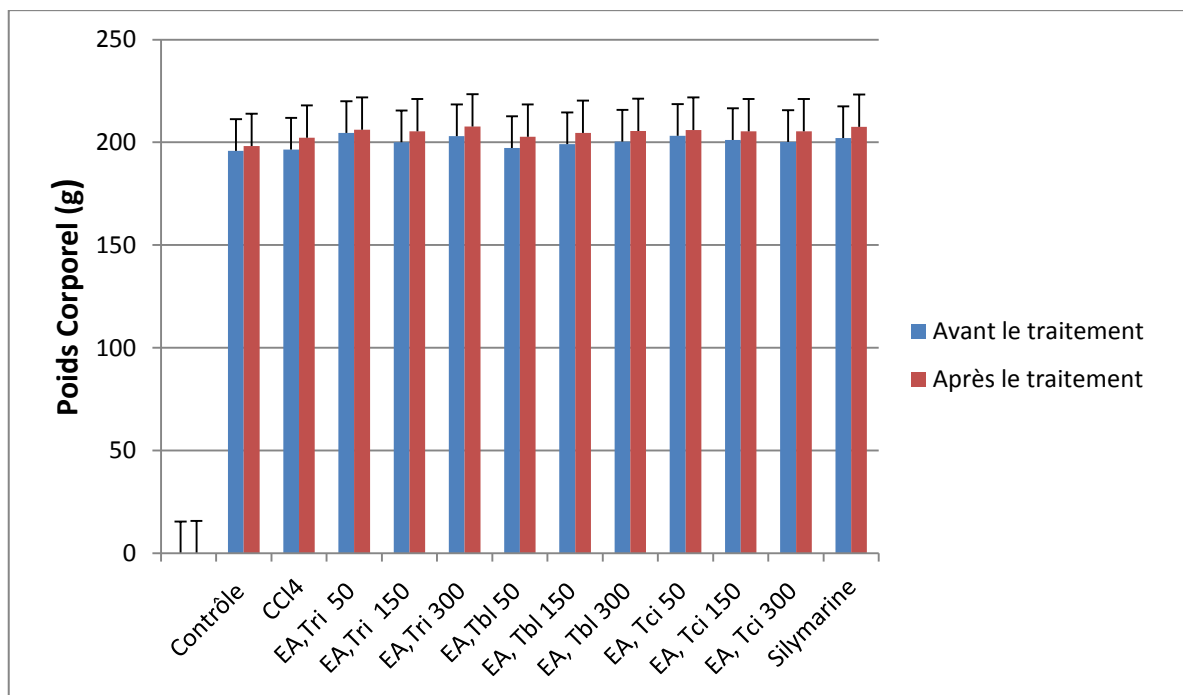


Figure 49: Effet des extraits des trois espèces de thym sur le poids corporel des rats. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6).

D'après ces résultats, en comparant le poids corporel de chaque groupe de rats avant et après le traitement avec les extraits des trois plantes étudiées, une légère augmentation a été révélée dans les poids des animaux.

Après chaque sacrifice, on a prélevé les organes des rats, lavés avec une solution de NaCl et pesés. D'après les résultats (Figure 50), il s'est avéré que le poids relatif du foie des rats traités avec le tétrachlorure de carbone CCl_4 est augmenté d'une manière significative, par rapport au témoin ($p < 0,05$). Cette augmentation est diminuée par le traitement avec les extraits aqueux des plantes étudiées. La diminution la plus observée est celle de l'extrait aqueux du *T.riatarum* avec la dose de 150 mg/kg.

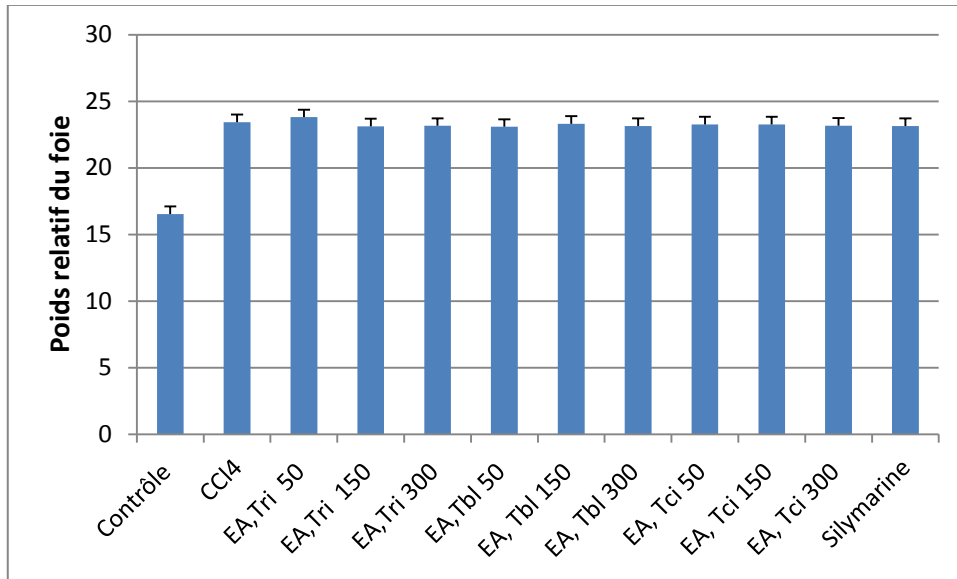


Figure 50: Effet du prétraitement des extraits des plantes étudiées sur le poids relatif du foie des rats. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6).

II.2 Effet des trois thymes sur les paramètres biochimiques

Certains enzymes sont libérés dans le sang à de faible taux à partir des cellules hépatiques ou cardiaques. Toutefois, l'augmentation anormale de ce taux peut être un indicateur fiable des lésions hépatiques et/ou cardiaques.

II.2.1 Effet sur les transaminases

L'effet du prétraitement des extraits aqueux des trois plantes à la dose de 50, 150 et 300 mg/kg sur les aminotransférases (ASAT, ALAT) est présenté dans les figures 51 et 52.

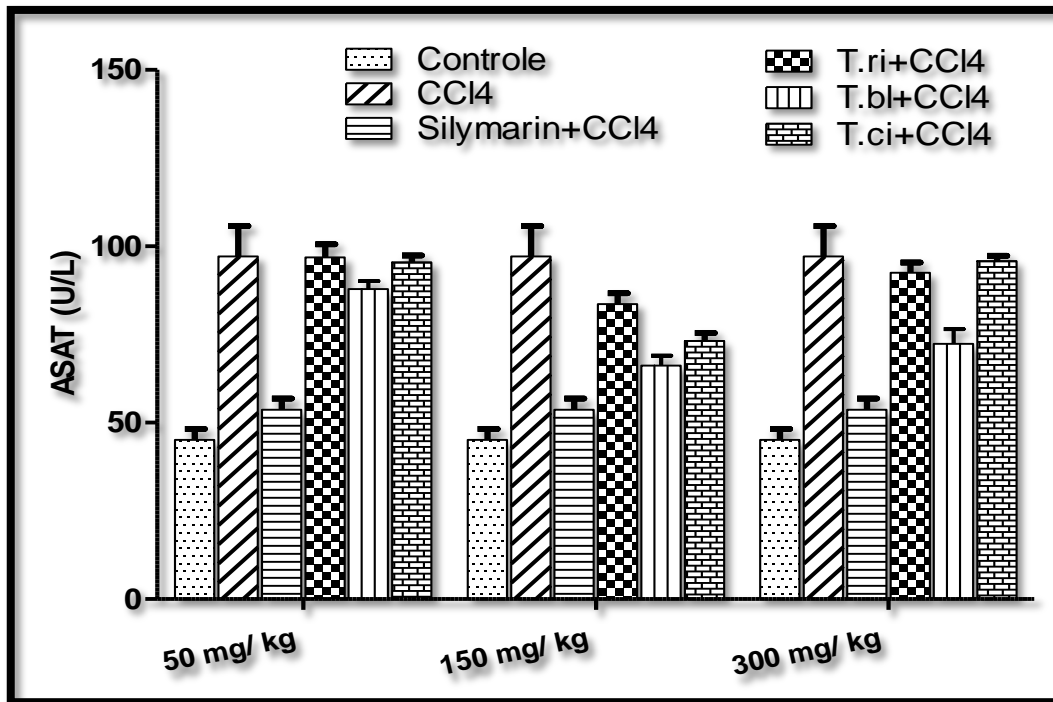


Figure 51: Effet des extrait aqueux des trois plantes sur le taux de l'ASAT des rats traités avec CCl₄. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6).

Le prétraitement des doses différentes des extraits aqueux des trois plantes réduit de façon significative le taux de l'ASAT par rapport au groupe intoxiqué (Figure 51). L'extrait aqueux du *T. riatarum* utilisé à la concentration de 150 mg/kg a enregistré l'effet inhibiteur le plus faible ($83,60 \pm 3,13$ U/L). Cependant, l'effet le plus important a été présenté par l'extrait du *T. blecherianus* avec une valeur de l'ordre de $66,23 \pm 2,80$ U/L. Cet effet est inférieur que celui exercé par le silymarine, utilisé comme hépatoprotecteur standard.

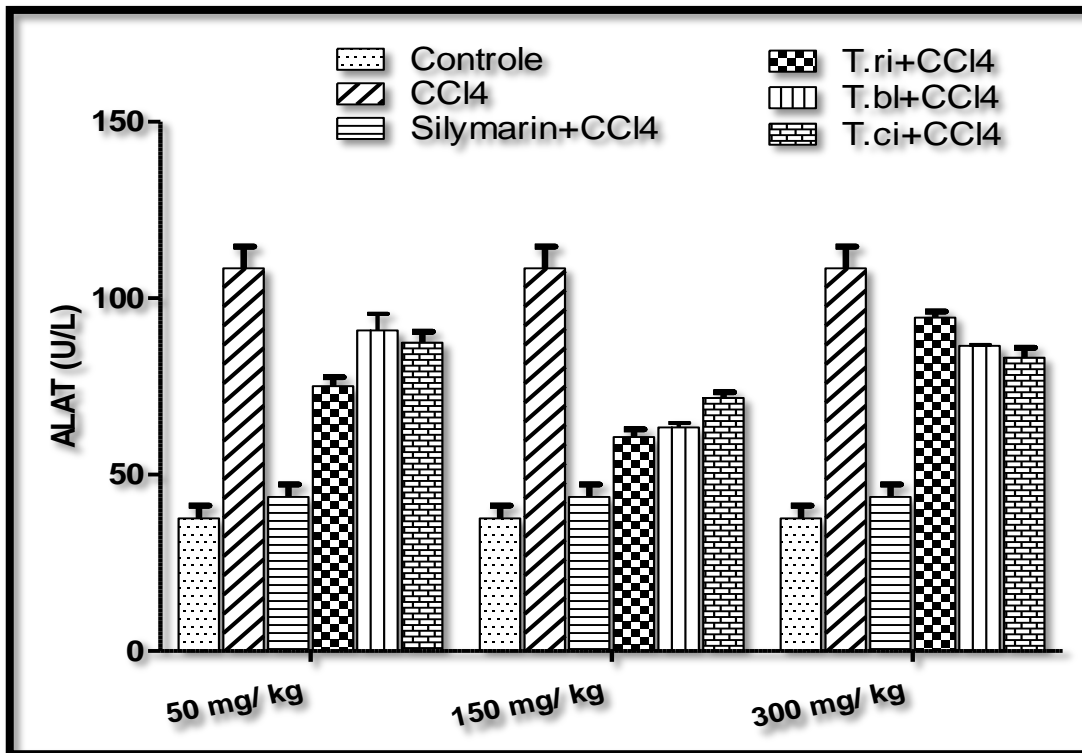


Figure 52: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de l'ALAT des rats traités avec CCl₄. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6).

D'après les résultats présentés dans la figure 52, Le gavage par le tétrachlorure de carbone (1 ml/kg) produit une augmentation significative ($P < 0,05$) des marqueurs biochimiques sériques l'ALAT. Par contre, l'administration des extraits des trois plantes réduisent le taux élevé de l'ALAT d'une manière significative. En effet, la dose de 150 mg/Kg représente la dose la plus efficace. Ainsi, l'extrait aqueux à cette dose qui exerce l'effet inhibiteur le plus puissant estimé à 60.70 ± 2.16 U/L est celui du *T. riatarum* suivi par celui de *T. blecherianus* avec $63.40 \pm 4,73$ U/L et en dernier lieu celui de *T. citriodorus* avec une valeur de $71.75 \pm 1,63$ U/L.

II.2.2 Effet sur la phosphatase alcaline

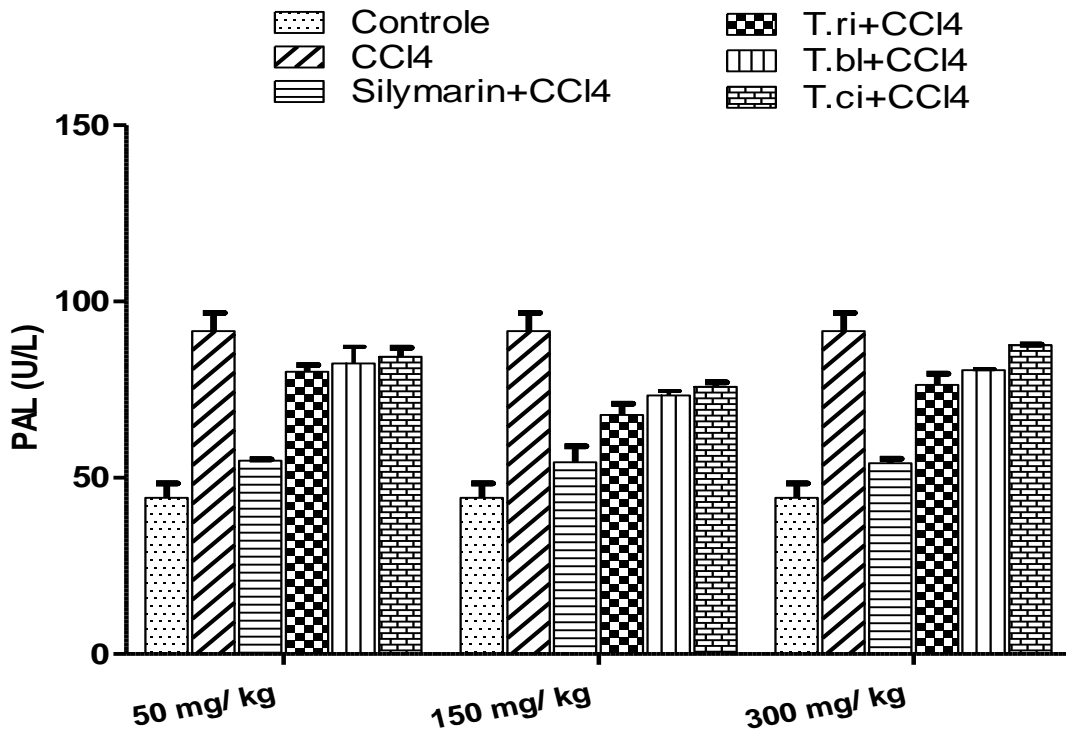


Figure 53: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de PAL des rats traités avec CCl₄. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n = 6).

Tous les extraits aqueux réduisent le taux de la phosphatase alcaline d'une manière à peu près similaire (Figure 53). Le prétraitement des rats par les différentes doses d'extrait aqueux du *T. riatarum* suivi de l'induction de l'hépatotoxicité par le CCl₄ induit une inhibition hautement significative de la PAL par rapport aux *T. blecherianus* et *citriodorus*. En effet, la dose de 150 mg/kg de l'extrait aqueux du *T. riatarum* présente une valeur de $67,80 \pm 3,24$ (U/L).

II.2.3 Effet sur la bilirubine totale

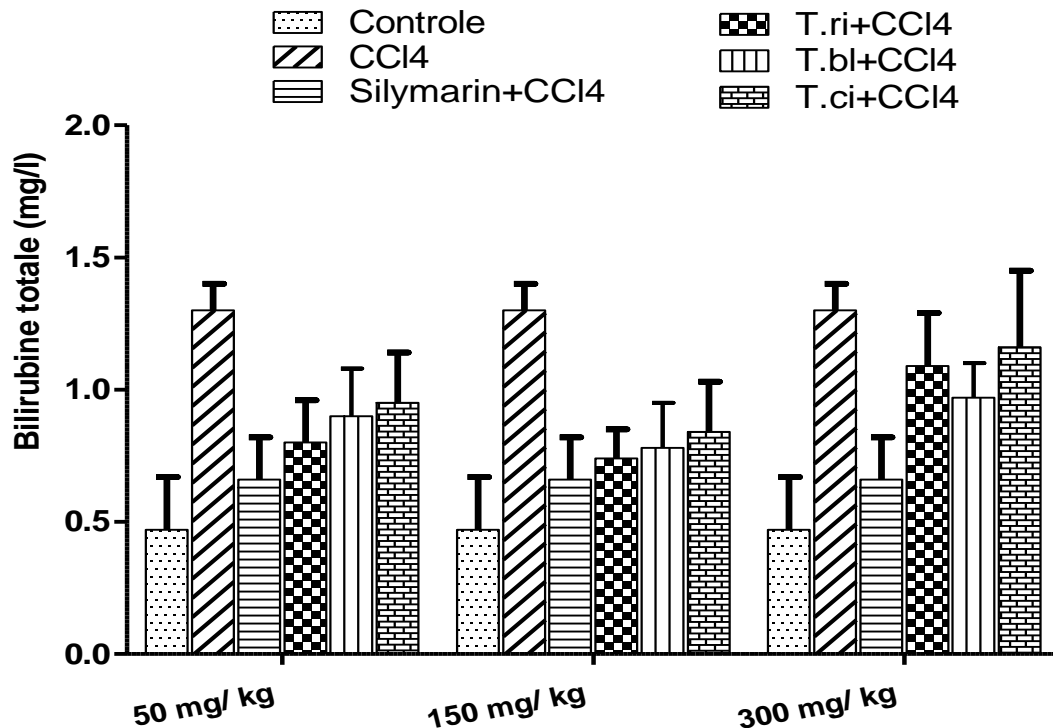


Figure 54: Effet des extraits aqueux des trois plantes sur le taux de bilirubine totale des rats traités avec CCl₄. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD (n = 6).

Le prétraitement par le *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* a restauré le taux de la bilirubine totale vers des valeurs proches à la normale indiquant ce qui manifeste clairement l'effet hépatoprotecteur des trois plantes. En effet, la bilirubine totale augmente de $0,47 \pm 0,2$ mg/l jusqu'à $12,8 \pm 5,7$ mg/l (Figure 54).

Le prétraitement des rats par 150 mg/Kg de l'extrait aqueux du *T. riatarum* suivi de l'induction de l'hépatotoxicité par le CCl₄ induit une diminution hautement significative du taux de la bilirubine totale où il atteint $0,64 \pm 0,11$ mg/l. Cet effet est proche de celui de silymarine considéré comme référence ($0,66 \pm 0,16$ mg/l). Les résultats suggèrent que le système antioxydant déséquilibrée dans le foie par du tétrachlorure de carbone est restauré par l'effet protecteur des extraits aqueux des trois plantes

III. Discussion

Les dommages du foie causés par différents agents hépatotoxiques sont considérés comme un problème majeur toxicologique conduisant au décès. Les médicaments classiques qui assurent une protection du foie sont rares et sont hépatotoxiques à une certaine dose. Le traitement naturel basé sur l'utilisation des plantes médicinales et aromatiques est considéré comme étant très efficace et sans effets indésirables (Arem et al., 2014).

La présente étude a pour but d'évaluer l'effet hépatoprotecteur des extraits aqueux du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus*, des variétés de thym largement utilisées dans tout le Maroc. Pour étudier l'effet de ces extraits, on a provoqué une hépatotoxicité chez les rats en utilisant le CCl₄.

III.1 Effet des extraits des plantes étudiées sur le poids corporel et le poids relatif du foie

D'après les résultats obtenus dans cette étude, on constate que le poids corporel de chaque groupe de rats avant et après le traitement avec les extraits des trois plantes étudiées a subi un léger changement. On peut dire que l'administration du CCl₄, n'a pas affecté les propriétés physiques soit le comportement général ou le poids du corps. Cependant, après l'intoxication avec le CCl₄, une augmentation significative dans le poids du foie est observée. Cette augmentation est diminuée par le traitement avec les extraits des plantes étudiées et plus précisément le *T. riatarum*. Cette augmentation peut être due à l'infiltration des glycérols et des acides gras dans les hépatocytes via leurs membranes cellulaires endommagées. Ce dommage du foie est un phénomène signalé suite à l'agression par le CCl₄ (Huang et al., 2012).

III.2 Effet des extraits aqueux du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* sur les paramètres biochimiques

L'eau est le solvant qui peut extraire la plupart des constituants chimiques responsables des différentes activités étudiées ce qui justifie, la pertinence de la forme traditionnelle d'utilisation du thym. Les substances phénoliques solubles dans l'eau, avec des propriétés antiradicalaires, pourraient expliquer les propriétés hépatoprotectrices des extraits aqueux comme celles de la Syllimarine. Les trois thym étudiés sont riches en saponines, stérols et triterpènes. Ces derniers ont des propriétés hépatoprotectrices avérées (Germanò et al., 2001).

La toxicité induite chez les animaux par le CCl₄, ainsi que l'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux étudiés sont estimés via l'évaluation des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, PAL et Bilirubine totale).

Le taux des transaminases hépatiques ALAT et ASAT constitue un bon indicateur de détection de l'hépatotoxicité. En effet, l'élévation de l'ALAT dans les maladies non hépatiques est inhabituelle. De ce fait, l'ALAT est le meilleur paramètre pour détecter une lésion hépatique (Nkosi et al., 2005).

Les résultats de cette présente étude révèlent que l'intoxication des rats par le CCl₄ conduit à des sévères dommages hépatiques et à une augmentation importante des taux de transaminases hépatiques (ALAT et ASAT), de la phosphatase alcaline PAL et la bilirubine totale en comparant avec les rats intoxiqués puis traités par nos extraits. Ces résultats sont en parfait d'accord avec une étude récente sur le thym mené par Nawaz et al., (2014). Les antioxydants n'agissent pas comme des donateurs d'hydrogènes mais ils sont également responsables de l'effet modulateur dans la cellule. Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus par Dey et al., (2015). Ceci peut être dû à des lésions hépatocellulaires. Dans une lésion hépatique, la fonction des hépatocytes est perturbée, en provoquant un niveau enzymatique accrue dans le sérum (Rajagopal et al., 2003). Ainsi, les dommages des fonctions hépatiques causées par le CCl₄ peuvent expliquer l'augmentation du taux de ces enzymes (Subramanian et al., 2013; Abirami et al., 2015). L'élévation du taux sérique de la phosphatase alcaline, qui est normalement libérée dans la bile, peut résulter d'une obstruction des voies biliaires (Girish et al., 2012) ou d'un endommagement (Farida et al., 2012). En ce qui concerne la bilirubine, elle est utilisée comme indicateur pour évaluer la fonction sécrétoire des hépatocytes (Al-Harbi et al., 2014). L'élévation de ce paramètre biochimique dans la circulation sanguine pourrait être attribuée à la dégradation des érythrocytes due à des lésions hépatiques lors d'un traitement avec l'hépatotoxine (CCl₄) (Sasidharan et al., 2010).

Le prétraitement par le *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodoris* sur les rats intoxiqués par le CCl₄ a diminué significativement les taux élevés de l'ALAT, ASAT, PAL et de la bilirubine totale. Les niveaux diminués des enzymes sériques peuvent être attribués à l'effet stabilisant des constituants phytochimiques et aux divers substances actives sur la membrane plasmique des hépatocytes (Ranawat et al., 2010).

Cette activité des extraits peut être due à leur effet stabilisant sur le plasma membrane comme rapporté précédemment par Al-Harbi et al., (2014). L'inhibition de la peroxydation lipidique par l'actif les constituants des extraits peuvent également être impliqués avec un effet hépatoprotecteur dûment soutenu par l'étude de Kanchana et al., (2011). Le stress oxydatif est considéré aussi comme une cause importante de lésion hépatique, induit par des agents hépatotoxiques. Les radicaux libres en particulier les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont impliquées dans le dommage tissulaire.

IV. Conclusion

Les résultats de l'évaluation de l'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus L* chez les rats intoxiqués par le CCl₄, ont montré une réduction significative des paramètres biochimiques testés de l'ALAT, ASAT, PAL et de la bilirubine totale ce qui est considéré comme un indicateur de la régénérescence du processus de réparation des lésions du tissu hépatique due au CCl₄. Nous pouvons donc affirmer que l'administration répétée des extraits aqueux avec une dose de 150 mg/l protègent contre l'hépatotoxicité provoquée par le CCl₄ avec une efficacité proche de celle de la silymarine. Ces résultats justifient pour la première fois l'utilisation des trois thymus étudiés comme hépatoprotecteur dans la médecine populaire.

Conclusion générale & perspectives

Conclusion générale et perspectives

Dans la présente étude, trois plantes *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus* et *Thymus citriodorus* L. ont été choisis afin de valoriser leur potentiel thérapeutique. L'objectif de ce travail était d'adopter des bases scientifiques pour la validation de certaines propriétés biologiques attribuées à ces trois plantes médicinales, choisies sur la base de leur usage traditionnel. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés comme premier volet à l'identification des composants des huiles essentielles, et à l'évaluation de leurs activités antibactériennes et antioxydantes. Deuxième volet a été consacré au dosage de la teneur en composés phénoliques et à l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* L. Finalement, le troisième volet a été focalisé sur l'exploration de l'activité hépatoprotéctrice *in vivo* des extraits aqueux des trois espèces étudiées.

La composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles du *T. riatarum* par hydrodistillation, a révélé que les composés majoritaires des huiles sont le Thymol, Bornéol et α -Phéllandrène. Les huiles essentielles du *T. blecherianus* ont été analysées par GC-MS, les principaux constituants de cette huile sont le Carvacrol, le Bornyle et le Bornéol. Alors que les composants majoritaires des huiles du *T. citriodorus* sont le Terpinyl formiate, Géraniol, Isogéraniol, Cubéol, Tiglate de citronillile, Thmyol, Pulegone et Oxyde Caryophyllène.

Les trois huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne considérable vis-à-vis des souches bactériennes responsables des infections nosocomiales rencontrés dans les services de réanimation. Les huiles du *T. riatarum* donnent le meilleur effet. Cependant, d'une manière générale, toutes les huiles essentielles possèdent une activité antioxydante intéressante.

De plus, l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle et aqueux) du *T. riatarum*, *blecherianus* et *citriodorus* L a été estimé *in vitro* via l'utilisation de trois différents tests DPPH, FRAP, CAT. Les résultats ont montré que ces extraits

étudiés sont dotés d'un pouvoir antioxydant important ceci peut être expliqué par leur richesse en polyphénols et flavonoïdes.

L'activité hépatoprotectrice des extraits aqueux des trois espèces étudiées est évaluée *in vivo* contre la toxicité hépatotoxique provoquée par le CCl₄ sur les rats *Wistar*. Le prétraitement par les extraits aqueux avec la dose de 150 mg/kg des trois plantes a considérablement protégé les hépatocytes des rats. En effet, les paramètres biochimiques ont confirmé cet effet en comparant avec le groupe traité avec le Silymarine utilisé comme hépatoprotecteur standard.

Le présent travail prouve que les trois espèces de thym possèdent des propriétés biologiques et des activités pharmacologiques intéressantes. Cependant, des recherches complémentaires et approfondies sont à envisager. Il serait intéressant de mener une étude plus approfondie pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes. Une étude histologique serait très intéressante pour confirmer l'effet hépatoprotecteur des extraits étudiés.

Références Bibliographiques

- Abirami, A., Nagarani, G., Siddhuraju, P.-F. science and human, & 2015, U. (2015). Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food Science and Human Wellness*, 4, 35–41.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Pub. Corp.
- Adrar, N., Oukil, N., & Bedjou, F. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88, 112–119.
- Afnor. (2000). Huiles essentielles. Tome 2, Monographies Relatives aux Huiles Essentielles.
- Al-Harbi, N., Imam, F., Nadeem, A., & Al-Harbi, M. (2014). Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat is reversed by treatment with riboflavin. *Int Immunopharmacol*, 21, 383–388.
- Alagille, D., Odievre, M., & Gautier, M. (1975). Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental, and sexual development, and cardiac murmur. *The Journal of Pediatrics*, 86(1), 63–71.
- Alaoui-Jamali, C., Kasrati, A., & ... D. L.-. (2018). Étude comparative de l'activité insecticide des huiles essentielles des espèces de thymy originaires du Sud-Ouest marocain. *Phytothérapie*, 1–7.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2008). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551–562.
- Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., ... Chaouch, A. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytotherapie*, 6(6), 342–347.
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Aarab, L., ... Chaouch, A. (2011).

- Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 158(4), 513–523.
- Amzad, H., Zhari, I., Atiqur, R., & Kang, S. (2008). Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops and Products*, 27(3), 328–334.
- Aouam, I., Elatki, Y., Taroq, A., Elkamari, F., Lyoussi, B., & Abdellaoui, A. (2018). Phenolic contents and antioxidant capacities of various extracts of *thymus riatarum* from morocco. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(11).
- Appiah, S., Revitt, M., Jones, H., Vu, M., Simmonds, M., & Bell, C. (2017). Antiinflammatory and Hepatoprotective Medicinal Herbs as Potential Substitutes for Bear Bile. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 135, pp. 149–180).
- Arem, A., Ghrairi, F., Lahouar, L., Thouri, A., Saafi, E., Ayed, A., ... Achour, L. (2014). Hepatoprotective activity of date fruit extracts against dichloroacetic acid-induced liver damage in rats. *Journal of Functional Foods*, 9, 119–130.
- Argyropoulou, C., Daferera, D., Tarantilis, P. A., Fasseas, C., & Polissiou, M. (2007). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(12), 831–837.
- Asdadi, A., Hamdouch, A., Oukacha, A., & Moutaj, R. (2015). Study on chemical analysis, antioxidant and in vitro antifungal activities of essential oil from wild *Vitex agnus-castus* L. seeds growing in area of Argan Tree of Morocco against clinical strains of *Candida* responsible for nosocomial infections. *Journal de Mycologie Medicale*, 25, e118–e127.
- Aubert, J., Begriche, K., Knockaert, L., & Robin, M. (2011). Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and pathophysiological role. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 35, 630–637. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210740111001732>
- Ayoughi, F., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Naghdibadi, H. (2011). *Chemical Compositions*

of Essential Oils of Artemisia dracunculus L. and Endemic Matricaria chamomilla L. and an Evaluation of their Antioxidative Effects. J. Agr. Sci. Tech (Vol. 13).

- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, *21*(1), 33–42.
- Bagdat, R., Ipek, A., & Arslan, N. (2011). Yield and Quality Parameters of *Thymus x citriodorus* (Pers.) Schreb. (synonym *T. fragrantissimus*, *T. serpyllum citratus* and *T. serpyllum citriodorum*) Cultivated under Ankara Ecological Conditions. *Planta Medica*, *77*(12).
- Bajpai, V., Baek, K., & Kang, S. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Res Int*, *45*, 722–734.
- Bakour, M., Soulo, N., Hammas, N., El Fatemi, H., Aboulghazi, A., Taroq, A., ... Lyoussi, B. (2018). The antioxidant content and protective effect of argan oil and *Syzygium aromaticum* essential oil in hydrogen peroxide-induced biochemical and histological changes. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2).
- Barati, S., Baigi, G., Beigi, S., & Dehghani, M. (2013). The effects of *Thymus daenensis* extract on maintenance and growth of yogurt starter bacteria. *Research Journal*, *4* (2), 468–471.
- Belmalha, S., El Idrissi, M., Echchgadda, G., Amechrouq, A., Bachir, S. (2012). Chemical composition of the essential oils of three species of wild thyme from Morocco: *Thymus riatarum* humber et maire *Thymus leptobotrys* murb et *Thymus munbyanus* boiss. et reuter subsp. *ciliatus* (DESF.) greuter et burdet. *Physical and Chemical News*, (63), 122–128.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry Biochem*, *239*, 70–76.
- Benzyane, M., Aafi, A., Sbay, H., Antry, S. El, & Yassine, M. (2010). Les écosystèmes naturels marocains et les changements climatiques. *Edition Centre de Recherche*

Forestière, Collection Maroc Nature.

- Berregioua, A. (2016). *Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae medicinales du sud algérien : Moricandia arvensis et Zilla macroptera République Algérienne Démocratique et Populaire.*
- Berrghioua, A. (2016). *Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien.* Abou bakr belkaid -tlemcen.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J., & Sapirstein, H. (2005). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Wiley Online Library*, 82(4), 390–393.
- Bhar, H., & Balouk, A. (2011). Les plantes aromatiques et medecinales, Ces plantes odorantes qui soulagent la douleur. *L'espace Marocain*, 68(2), 20–27.
- Bhat, S., Nagasampagi, B., & Sivakumar, M. (2005). Chemistry of natural products. *Chemistry of Natural Products; Ed 1: NAROSA*, 115–252.
- Bhawna, S., & Kumar, S. (n.d.). *Hepatoprotective activity of some indigenous plants. International Journal of PharmTech Research CODEN (Vol. 1).*
- Bokhari, J., Khan, M. R., Shabbir, M., Rashid, U., Jan, S., & Zai, J. A. (2013). Evaluation of diverse antioxidant activities of Galium aparine. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102, 24–29.
- Boyd, B., Ford, C., Michael Koepke, C., Gary, K., & Horn, E. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*, 4–7.
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., & Rice-Evans, C. A. (1998). *Structural dependence of flavonoid interactions with Cu 2 + ions : implications for their antioxidant properties. Biochem. J (Vol. 330).*
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes medicinales (2e edition).* Lavoisier, Paris.

- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales* (3e édition). Lavoisier, Paris.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Éd. Tec & doc.
- Caillet, S., & Lacroix, M. (2007). *Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire*. (INRS-Institut Armand-Frappier, Ed.).
- Cardey, B. (2009). *Étude théorique des mécanismes d'oxydation de thiols en milieu d'intérêt biologique*. Université de Franche-Comté.
- Cardey, B. (2009). *Étude théorique des mécanismes d'oxydation de thiols en milieu d'intérêt biologique*.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy Downloaded from. *antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914.
- Chaintreau, A., Joulain, D., Marin, C., Schmidt, C., & Vey, M. (2003). GC-MS Quantitation of Fragrance Compounds Suspected to Cause Skin Reactions. 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6398–6403.
- Chambers, H. F. (1997). *Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications*. *Am Soc Microbiol* (Vol. 10).
- Chanthaphon, S., Chanthachum, S., & Hongpattarakere, T. (2008). *Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms*. *rdo.psu.ac.th*.
- Charles, D. (2013). Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. *Springer Science & Business Media*, 553.
- Chen, C.-J., Deng, A.-J., Liu, C., Shi, R., Qin, H.-L., & Wang, A.-P. (2011). molecules Hepatoprotective Activity of Cichorium endivia L. Extract and Its Chemical Constituents. *Molecules*, 16, 9049–9066.

- Chevallier, A. (2001). Encyclopedia of medicinal plants 2^{ème} éd. *Larousse*.
- Cohen, J., Horton, J., & Hobbs, H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*, 332(6037), 1519–1523.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Crozier, A., Clifford, M., & Ashihara, H. (2006). *Plant secondary metabolites : occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Pub.
- Cung, V.-D., Martins, S. L., Ribeiro, C. C., & Roucairol, C. (2002). Strategies for the Parallel Implementation of Metaheuristics (pp. 263–308).
- Dauqan, E. M. A., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (Thymus vulgaris L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(02), 17-022.
- Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L., & Dessì, M. A. (2003). Chemical composition and antioxidant activity of extracts from Daphne gnidium L. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(1), 65–70.
- Denny, E. (1991). Field distillation for herbaceous oils. *Denny Mckenzie Associates*.
- Desmares, C., Laurent, A., & Delerme, C. (2008). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps), France. *Agence Française de Sécurité Sanitaire Des Produits de Santé (Afssaps)*.
- Dey, P., Dutta, S., Sarkar, M., & Chaudhuri, T. (2015). Assessment of hepatoprotective potential of N. indicum leaf on haloalkane xenobiotic induced hepatic injury in Swiss albino mice. *Chemico-Biological Interactions*, 235, 37–46.
- Djoghlaflaf, A., & Webbe, J. (2009). Enhancing the adaptive capacity of biodiversity through implementation of the convention on biological diversity.
- Dohoo, I., Martin, W., & Stryhn., H. (2003). *Veterinary Epidemiologic Research*. AVC Inc.:

Charlottetown, Canada.

- Dong, S., Chen, Q.-L., Song, Y.-N., Sun, Y., Wei, B., Li, X.-Y., ... Su, S.-B. (2016). Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 41(4), 561–572.
- Dooley, J., Anna, S., Lock, K., Burroughs, E., & Heathcote, J. (2011). Gallstones and Benign Biliary Disease. *Chapter 12*.
- Dorosz, P., Vital, D., & Jeune, C. (2011). Guide pratique des médicaments - 30ème édition - Paris : Maloine, 1892.
- Dridi, E., Chetoui, A., & Zaoui, A. (2006). Prévalence de l'infection nosocomiale dans un hôpital régional tunisien. *Santé Publique*, 18(2), 187–194.
- Dufour, P., Muller, C., & Finck, C. (2011). Nutrition et cancer. *Nutrition Clinique Pratique*, 277–284.
- El-Hadary, A. E., Elsanhoty, R. M., & Ramadan, M. F. (2019). In vivo protective effect of Rosmarinus officinalis oil against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats. *PharmaNutrition*, 9, 100151.
- El-Jalel, L., Elkady, W., & Gonaid, M. (2018). Difference in chemical composition and antimicrobial activity of Thymus capitatus L. essential oil at different altitudes. *Futur J Pharm Sci*, 4, 156–160.
- El Bouzidi, L., Jamali, C. A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., & Abbad, A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan Thymus species. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 450–456.
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209–216.
- El Haib, A. (2011). *Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par*

transformations catalytiques. Université de Toulouse.

- Elgawish, R. A. R., Rahman, H. G. A., & Abdelrazek, H. M. A. (2015). Green tea extract attenuates CCl₄-induced hepatic injury in male hamsters via inhibition of lipid peroxidation and p53-mediated apoptosis. *Toxicology Reports*, 2, 1149–1156.
- Endrias, A. (2006). *Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à l'Hibiscus sabdariffa L. et à l'Artemisia annua.*
- Fadili, K., Amalich, S., N'dedianhou, S. K., Bouachrine, M., Mahjoubi, M., El Hilali, F., & Zair, T. (2015). *Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: Rosmarinus Officinalis et Thymus Satureioides [Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: Rosm. International Journal of Innovation and Scientific Research (Vol. 17).*
- Fadili, K., Zerkani, H., Amalich, S., & Zair, T. (2017). Etude phytochimique et evaluation de l'activite antioxydante des feuilles et des fruits du Capparis spinosa L. *American. J. Inn. Res. Ap.*, 5(2), 108–118.
- Fadli, M., Bolla, J. M., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., & Hassani, L. (2014). First evidence of antibacterial and synergistic effects of Thymus riatarum essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 61, 370–376.
- Farida, T., Salawu, O., Tijani, A., & Ejiofor, J. (2012). Pharmacological evaluation of Ipomoea asarifolia (Desr.) against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 642–646.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualite Chimique*, 108–115.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualite Chimique*, (11–12), 108–115.

- Fennane, M., Ibn-Tattou, M., A, O., & El Oulaidi, J. (2007). Flore pratique du Maroc. *Trav. Inst. Sci. Sér. Bot*, 2.
- Foda, M., Hassan, A., Al-Moghazy, M., Foda, M. I., El-Sayed, M. A., Hassan, A. A., ... El-Moghazy, M. M. (2010). *Effect of Spearmint Essential Oil On Chemical Composition and Sensory Properties of White Cheese Food science View project Study the effect of medicinal herbs on production of different dairy products View project Effect of Spearmint Essential Oil on Chemical Composition and Sensory Properties of White Cheese. Journal of American Science* (Vol. 6).
- Fritze, D., & Pukall, R. (2011). Culture media for Bacillus spp. and related genera relevant to foods In: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. *Royal Society of Chemistry*, 90–114.
- Fromenty, B. (2014). Aggravation des hépatopathies liées à l'obésité par les xénobiotiques. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 28(2), 95–101.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M., & Taghizadeh, M. (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898–904.
- Germanò, M. P., D'Angelo, V., Sanogo, R., Morabito, A., Pergolizzi, S., & De Pasquale, R. (2001). Hepatoprotective activity of Trichilia roka on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(11), 1569–1574.
- Ghasemi, P., Barani, M., Hamed, B., Ataei, K., & Karimi, A. (2013). Environment effect on diversity in quality and quantity of essential oil of different wild populations of Kerman thyme. *Genetika*, 45(2), 441–450.
- Ghasemi, P., Rahimi, E., & Moosavi, S. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against Listeria monocytogenes on chicken frankfurters Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against. *Actaagriculturae Slovenica*, 95(3), 219–223.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Hossayni, I., & Shirmardi, H.-A. (2013). Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountain fennel (*Zaravschanica membranacea*

- (Boiss.) M. Pimen.). *Industrial Crops and Products*, 50(50), 443–448.
- Ghelichnia, H. (2016). Essential Oil Composition of Three Species of Thymus Growing Wild in Mazandaran, Iran. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 49(2), 107–113.
- Girish, C., Koner, B., Jayanthi, S., KR, R., Rajesh, B., & Pradhan, S. (2009). *Hepatoprotective activity of six polyherbal formulations in paracetamol induced liver toxicity in mice. The Indian Journal of Medical Research.*
- Girish, C., & Pradhan, S. (2012). Hepatoprotective activities of picroliv, curcumin, and ellagic acid compared to silymarin on carbon-tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Journal of Pharmacology Pharmacother*, 3, 149–155.
- Girotti-Chanu, C. (2006). Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. *Thèse de Doctorat. Lyon, INSA.*
- Gite, V., Pokharkar, R., Chopade, V., & Takate, S. (2010). Hepato-protective activity of *Enicostemma axillare* in paracetamol induced hepato-toxicity in albino rats. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 1(2), 50–53.
- Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae): Thym (pp. 357–365).
- Goto, S., & Radak, Z. (2013, June 1). Implications of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *Journal of Sport and Health Science*. Elsevier.
- Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygenes et antioxydants. *Nutrition Clinique et Metabolisme*, 11(2), 115–120.
- Granier, B., & Jarlier, V. (1996). B-lactamines et bacilles a Gram negatif. *Feuillets de Biologie*, 212(13), 20.
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B., & Hamzehzarghani, H. (2009). Antifungal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences*, 6(5), 857.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med*, 18, 125–126.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853–860.
- Haraguchi, H., Saito, T., Ishikawa, H., Date, H., Kataoka, S., Tamura, Y., & Mizutani, K. (1996). Antiperoxidative components in *Thymus vulgaris*. *Planta Medica*, 62(3), 217–221.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical methods*, London. Chapman and Hall.
- Hayes, A. J., & Markovic, B. (2002). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 40(4), 535–543.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, 116(3), 714–721.
- Huang, Q., Zhang, S., Zheng, L., He, M., & Huang, R. (2012). Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*, 50, 713–718.
- Hugo, S., & Didier, P. (2005). Résultats de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales de 2004. *Swiss-Noso Infections Nosocomiales et Hygiène Hospitalière*, 12(1).
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P., & Mazumdar, J. (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *Food Sci Technol*, 44, 1199–1206.
- Hyun, T., Kim, H., & Kim, J. (2014). Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. *Ind Crops Prod*, 52, 611–613.
- Ismaili, H., Tortora, S., Sosa, S., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Loggia, R. Della, ... Aquino,

- R. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Thymus willdenowii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(12), 1645–1652.
- Javed, H., Erum, S., Tabassum, S., & Ameen, F. (2013). AN OVERVIEW ON MEDICINAL IMPORTANCE OF *THYMUS VULGARIS*. *Journal of Asian Scientific Research*.
- Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M.-F. (2008). Étude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160–164.
- Kamisan, F., Yahya, F., Ismail, N., & Din, S. (2013). Hepatoprotective activity of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaf in rats. *J Acupunct Meridian Stud*, 6, 52–55.
- Kanchana, N., & Sadiq, A. (2011). Hepatoprotective effect of *Plumbago zeylanica* on paracetamol induced liver toxicity in rats. *Int J Pharm Pharm Sc*, 3(1), 151–154.
- Kardeh, S., Ashkani-Esfahani, S., & Alizadeh, A. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur J Pharmacol*, 735, 150–168.
- Kholkhal, F. (2014). *Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de Thymus ciliatus ssp coloratus et ssp euciliatus*.
- KITAGAWA, S., FUJISAWA, H., & Sakurai, H. (1992). Scavenging effect of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry. *Chemi Pharm Bull*.
- Kizil, S., & Toncer, O. (2016). ESSENTIAL OIL AND MICROELEMENT COMPOSITION OF *THYMUS CITRIODORUS* L. AND *Lippia citriodora*. *Cercetări Agronomice În Moldova*, 2(166), 97–105.
- Kizil, S., & Tonçer, Ö. (2016). Essential oil and microelement composition of lemon verbena and lemon thyme essential oil and microelement composition of *thymus citriodorus* l. And *lippia citriodora* h.b.k. *Cercetări Agronomice În Moldova*, XLIX(2), 97–105.
- Koffi, N., Beugré, K., Guédé N, Z., Dossahoua, T., & Laurent, A.-A. (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (

- Agboville, Côte-d'ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1), 1–15.
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A. C., & Alwasel, S. H. (2017). International Journal of Food Properties Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Taylor & Francis*, 20(3), 514–525.
- Kondjoyan, N., & Berdagué, J. (1996). A compilation of relative retention indices for the analysis of aromatic compounds. *Laboratoire Flaveur, INRA, Clermont-Ferrand*.
- Korib, G. (2017). Activités antioxydantes des extraits méthanoliques de *Thymus ciliatus* ssp-*eu-ciliatus* (Thym).
- Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimr-knezevic, S. (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.*, 54, 65–72.
- Labiad, M. H., Harhar, H., Ghanimi, A., & Tabyaoui, M. (2017). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Moroccan *Thymus satureioides* Extracts. *JMES*, 8(6), 2132–2139.
- Lemsanni, M. (2016). *Les infections nosocomiales en réanimation pédiatrique*. UNIVERSITE CADI AYYAD.
- Lemsanni, M. (2019). Les infections nosocomiales en réanimation pédiatrique. *Université CADI AYYAD; 2016*.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Yan, G. (2007a). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, 105, 548–554.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Yan, G. (2007b). Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, 105, 548–554.

- Lutge, U., Kluge, M., & Bauer, G. (2002). Botanique 3ème Ed: Technique et documentation. *Lavoisier*, 211.
- Macheix, J.-J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XXème siècle? *Taylor & Francis*, 143(6), 473–479.
- Maksimović, Z., Stojanović, D., Šoštarić, I., Dajić, Z., & Ristić, M. (2008). Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(11), 2036–2041.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., & Maronpot, R. R. (2005). New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology*, 33(1), 27–34.
- Maoulainine, F., Elidrissi, N., Chkil, G., Abba, F., Soraa, N., Chabaa, L., ... Aboussad, A. (2014). Épidémiologie de l'infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatale marocain. *Arch Pediatr*, 21, 938–943.
- Mariani-Kurkdjian, P., & Bingen, É. (2012). Physiopathologie et virulence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines. *Reanimation*, 21, 268–279.
- Martin, P. (2014). Les familles des plantes à fleurs d'Europe: botanique systématique et utilitaire. *Presses Universitaires de Namur (Ed.)*, 221.
- Martinez-Cayuella, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77, 147–161.
- Mayer, F. (2012). *Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles: Etude de cas en maison de retraite. UNIVERSITE DE LORRAINE*.
- Mayon-White, R., Ducel, G., Kereselidze, T., & Tikomirov, E. (1988). An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. *Journal of Hospital Infection*, 11(SUPPL. A), 43–48.
- Mayuren, C., Reddy, V., & Priya, S. (2010). Protective effect of Livactine against CCl4 and paracetamol induced hepatotoxicity in adult Wistar rats. *North Am J Med Sci*, 2, 491–

495.

- Mello, S., Bittencourt, F., Fronza, N., Cunha, A., Neud, G., Rosana, C., & Vieira, W. (2014). LWT - Food Science and Technology Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 C, 59, 86–93.
- Miguel, M. G., Cruz, C., Faleiro, L., Simões, M. T. F., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2010). *Foeniculum vulgare* essential oils: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 5(2), 319–328.
- Mogode, D. J. (2005). *Etude phytochimique et pharmacologique de Cassia nigricans Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad*. Université de Bamako.
- Moniczewski, A., Gawlik, M., Smaga, I., Niedzielska, E., Krzek, J., Przegaliński, E., ... Filip, M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports*. Elsevier.
- Morales, R. (1997). Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area. *Lagascalia*, 19((1-2)), 249–262.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* (pp. 481–511). ASM Press.
- Murray, P. R., Holmes, B., & Aucken, H. M. (2010). *Citrobacter* , *Enterobacter* , *Klebsiella* , *Plesiomonas* , *Serratia* , and Other Members of the Enterobacteriaceae . In *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Nadji, S. A. (2010). Phylogenetic analysis of human bocavirus isolated from children with acute respiratory illnesses and gastroenteritis in Iran. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(8), 598–603.

- Nawaz, M., Ahmad, T., & Mushtaq, M. (2014). Hepatoprotective activity of *Thymus linearis* against paracetamol-and carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in albino mice. *Bdpsjournal.Org, Bangladesh(9)*, 230–234.
- Nickavar, B., & Esbati, N. (2012). Evaluation of the Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Three *Thymus* Species. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 5(3), 119–125.
- Nickavar, B., Mojab, F., & Dolat-Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. *Food Chemistry*, 90, 609–611.
- Nieto, G., Skibsted, L., Huvaere, K., & Skibsted, L. H. (2011). Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system Super calcium-Minerals from whey for customized foods View project Molecular Gastronomy View project Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *Springer*, 233(1), 11–18.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., ... Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183–190.
- Nkosi, C. Z., Opoku, A. R., & Terblanche, S. E. (2005). Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄-induced liver injury in low-protein fed rats. *Phytotherapy Research*, 19(4), 341–345.
- Omidbaigi, R., Sefidkon, F., & Hejazi, M. (2005). Essential oil composition of *Thymus* citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 237–238.
- OMS. World Health Organization. (2002). *OMS / Rapport sur la Santé dans le Monde 2002 - Réduire les risques et promouvoir une vie saine*. OMS. World Health Organization.
- Oualilalami, A. El, El-Akhal, F., Ouedrhiri, W., & ... F. C.-. (2013). *Thymus* essential oils (*Thymus vulgaris* and *Thymus Satureioidis*) from center of Maorocco: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medical*, 8 (31), 27–33.

- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315.
- Ozen, T., Demirtas, I., & Aksit, H. (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chemistry*, 124, 58–64.
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The Current State of Serum Biomarkers of Hepatotoxicity. *Toxicology*, 245, 194–205.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M., & Topçu, G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103, 623–630.
- Palá-Paúl, J., Pérez-Alonso, M., Velasco-Negueruel, A., Pala-paul, R., Sanz, J., & Conejero, F. (2001). Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 29, 663–672.
- Pascual, M., Slowing, K., & Sanchez, M. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Ethnopharmacology*, 76, 201–214.
- Pérez-Tortosa, V., López-Orenes, A., Martínez-Pérez, A., Ferrer, M., & Calderon, A. (2012). Antioxidant activity and rosmarinic acid changes in salicylic acid-treated *Thymus membranaceus* shoots. *Food Chemistry*, 130, 362–369.
- Peronny, S. (2005). *La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (Lemur catta)*. Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline *Eco-Ethologie*.
- Pibiri, M. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *EPFL*.
- Pisoschi, A. ., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.

- Pittet, D., Allegranzi, B., Storr, J., Nejad, S., Dziekan, G., Leotsakos, A., & Donaldson, L. (2008, April 1). Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders.
- Piyo, A., Udomsilp, J., Khang-Khun, P., & Thobunluepop, P. (2009). Asian Journal of Food and Agro-Industry Antifungal activity of essential oils from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and sweet fennel (*Ocimum gratissimum* Linn.): Alternative strategies to control pathogenic fungi in organic rice. *As. J. Food Ag-Ind*, 2–9.
- Popovici, C., & Saykova, I. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, 4, 26–39.
- Posadzki, P., Watson, L., & Ernst, E. (2013). Herb-drug interactions: An overview of systematic reviews. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 603–618.
- 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. *Analytical Biochemistry*, 269(5), 337–341.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Raedschelders, K., Ansley, D., & Chen, D. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 133, 230–255.
- Rajagopal, S., Manickam, P., Periyasamy, V., & Namasivayam, N. (2003). Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *The Journal of Nutritional*, 14, 252–258.
- Ramchoun, M., Harnafi, H., Alem, C., Büchele, B., Rouis, M., Atmani, F., & Amrani, S. (2012). Hypolipidemic and antioxidant effect of polyphenol-rich extracts from Moroccan thyme varieties. *E-SPEN Journal*, e119–e124.

- Ranawat, L., Bhatt, J., & Patel, J. (2010). Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *127*, 777–780.
- Rasooli, I., Fakoor, M., Yadegarinia, D., & Gachkar, L. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 135–140.
- Raymond, M. (2005). *L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant*. Université de Nantes.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., & Tantaoui-Elaraki, A. (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, *5*(2), 179–184.
- Rivera, L. (2006). *Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe*. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse.
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, *19*(7), 681–687.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., & Scaglianti, M. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, *91*, 621–632.
- Saito, S., Lin, Y., Tsai, M., Lin, C., & Murayama, Y. (2015). Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells. *The Kaohsiung Journal*, *31*, 279–286.
- Saleem, T., Chetty, C., Ramkanth, S., Rajan, V., Kumar, K., & Gauthaman, K. (2010). *Hepatoprotective Herbs-A Review*. *Int. J. Res. Pharm. Sci* (Vol. 1).
- Sarikurkcü, C., Ozer, M. S., Calli, N., & Popović-Djordjević, J. (2018). Essential oil

- composition and antioxidant activity of endemic *Marrubium parviflorum* subsp. *oligodon*. *Industrial Crops and Products*, 119(March), 209–213.
- Sasidharan, S., Aravindran, S., Latha, L., & Vijenthi, R. (2010). In vitro antioxidant activity and hepatoprotective effects of *Lentinula edodes* against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Molecules*, 190, 387–395.
- Schauenberg, P., & Paris, F. (1977). Guide to medicinal plants. National Library of Australia.
- Sebai, M., & Boudali, M. (2012). La Phytothérapie entre la confiance et méfiance. *Mémoire Professionnel*.
- Serragui, S., Derraji, S., Mahassine, F., & Cherrah, Y. (2013). *Résistance bactérienne : états des lieux au Maroc Bacterial resistance : state of play in Morocco* (Vol. 35).
- Shanmugasundaram, P., & Venkataraman, S. (2006). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 124–128.
- Sikkema, J., Bont, J. de, & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology*, 63–69.
- Sivaraj, R., Balakrishnan, A., M.Thenmozhi, & Venckatesh, R. (2011). Preliminary Phytochemical Analysis of *Aegle Marmelos*, *Ruta Graveolens*, *Opuntia Dellini*, *Euphorbia Royleana* and *Euphorbia Antiquorum*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(1), 132–136.
- Slinkard, K., & Singleton, V. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49–55.
- Smadja, J. (2009). Les huiles essentielles. Colloque GP3A - Tananarive 2-3 juillet.
- Smaga, I., Niedzielska, E., Gawlik, M., Moniczewski, A., J., K., E., P., ... M, F. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Reports*, 67, 569–580.

- Sofowora, A. (1993). Phytochemical screening of medicinal plants and traditional medicine in Africa. *Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria*, 150–156.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H., Daferera, D., & Tepe, B. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic. *Food Control*, 15, 627–634.
- Sokmen, A., & Gurel, E. (2001). Bitki Biyoteknolojisi “Plant biotechnology.” *Secondary Metabolite Production*, 211–261.
- Spichiger, R., Figeat-Hug, M., & Jeanmonod, D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (Ed.)*. Lausanne, 328.
- Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. (2002). Thyme - The genus Thyme L., 15, 330.
- Stahl-Biskup, E., & Holthuijzen, J. (1995). Essential oil and glycosidically bound volatiles of lemonscented thyme, *Thymus × citriodorus* (Pers.) Schreb. *Flavour and Fragrance Journal*, 10(3), 225–229.
- Subramanian, M., Balakrishnan, S., Chinnaiyan, S., Sekar, V., & Chandu, A. (2013). Hepatoprotective effect of leaves of *Morinda tinctoria* Roxb. against paracetamol induced liver damage in rats. *Drug Invent Today*, 5, 223–228.
- Sugamura, K., & Keaney, J. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Rad Biol Med*, 51, 978–992.
- Talbaoui, A., Jamaly, N., Aneb, M., Il Idrissi, A., Bouksaim, M., Gmouh, S., ... Bakri, Y. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(31), 4593–4600.
- Taleb-Toudert, K. (2015). caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien): évaluation de leurs effets sur la bruche de niébé.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2005).

- Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *J. Food Eng*, 66, 447–445.
- Tillmann, H. L. (2020). Hepatotoxicity, Drug-Induced Liver Injury. In *Reference Module in Biomedical Sciences* (Second, pp. 183–203). Elsevier.
- Timbrel, J. (2009). *Principles of Biochemical Toxicology* (4th ed.). London: Taylor and Francis Ltd.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., & Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153–161.
- Upadhyay, R. K., & Ahmad, S. (2010). Screening of Antibacterial Activity of Six Plant Essential Oils Against Pathogenic Bacterial Strains. *Asian Journal of Medical Sciences*, 2(3), 152–158.
- Vansant, G. (2004). Radicaux libres et antioxydants: principes de base. In *Symposium «Antioxydants et alimentation»*. Institut Danone.
- Vaubourdolle, M. (2013). Moniteur d'internat: 3ème édition; Tome 4: Médicaments. *Walters Climers.*, 183.
- Ventola, C. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P & T Journal*, 40(4), 277–283.
- Vercauteren, J. (2012). *Plan, schémas, formules du cours de pharmacognosie*.
- Villaño, D., Luisa Moyá, M., Villaño, D., Fernández-Pachón, M., Moyá, M., Troncoso, A., & García-Parrilla, M. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical Ministerio de Economía, Industria y Competitividad View project María-Soledad Fernández Pachón Universidad Pablo de Olavide Radical scavenging ability of polyphenolic compounds. *Talanta*, 71, 230–235.

- Vincenot, F., Saleh, M., & Prévost, G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *RFL Revue Francophone Des Laboratoires*, 2008(407), 61–69.
- Vincenot, F., Saleh, M., & Prévost, G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 61–69.
- Vrijens, F., GORDTS, B., DE LAET, C., DEVRIESE, S., VAN DE SANDE, S., HUYBRECHTS, M., ... HULSTAERT, F. (2009). Les infections nosocomiales en Belgique : volet I, étude nationale de prévalence. *NOSO-INFO*, 13(3).
- Ward, F., & Daly, M. (1999). Hepatic disease. *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 195–212.
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751–762.
- WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: a Summary First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care.* (2009).
- Wu, H., Chen, H., & Shiau, C. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9–10), 949–957.
- Wu, S., Wei, F., Li, H., Liu, X., Zhang, J., & Zhong yao, C. (2013). Chemical composition of essential oil from *Thymus citriodorus* and its toxic effect on liver cancer cells. *Journal of Chinese Medicinal Materials.*, 36(5), 756–759.
- Yang, R. Z., Park, S., Reagan, W. J., Goldstein, R., Zhong, S., Lawton, M., ... Gong, D. W. (2009). Alanine aminotransferase isoenzymes: Molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. *Hepatology*, 49(2), 598–607.
- Yayi, E., Gbenou, J., Ahoussi, L., & Moudachirou, M. (2004). *Ocimum. gratissimum* L., siège de variations chimiques complexes au cours du développement. *Chimie*, 7, 1013–

1018.

Zeghib, A., Laggoune, S., Kabouche, A., Semra, Z., Smati, F., Touzani, R., & Kabouche, Z. (n.d.). *Antibacterial Activity and Chemical Composition of Essential oil of Santolina rosmarinifolia L. (Asteraceae) from Algeria. Der Pharmacia Lettre, 2013, 5 (3):206-210.*

Zhao, Y., & Truhlar, D. (2006). A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *The Journal of Chemical Physics, 125(19).*

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry.*

Articles publiès



ICMES 2018

Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of *Thymus riatarum*

Imane AOUAM^a, Yassine EL ATKI^a, Mustapha TALEB^b, Amal TAROQ^a, Fatima EL KAMARI^a, , Badiaa LYOUSSI^a, Abdelfattah ABDELLAOUI^a

^a *Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco*

^b *Laboratory of Electrochemical Engineering, Modeling and Environmental, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco*

Abstract

The current study aimed to determine the total phenolic, total flavonoid content and antioxidant property of extracts of Moroccan endemic *Thymus riatarum*. Four solvent with varying polarities (water, methanol, ethanol and ethyl acetate) were used. The antioxidant activity was evaluated using three separate methods, inhibition of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assays and measurement of total antioxidant capacity. Total polyphenol content was measured using Folin-Ciocalteu assay. Total flavonoids contents were measured by the aluminum chloride colorimetric test.

The ethanol extract showed an important antioxidant activity by the two assays: DPPH free radical scavenging activity and total antioxidant capacity with value equal to 0.091 ± 0.02 mg/ml and 425.23 ± 2.05 mg AAE/g DW respectively, which was probably due to its high polyphenols content. The water extract had a higher reducing power than the other extracts with an IC_{50} value of 0.17 ± 0.025 mg/ml. The present study revealed that *Thymus riatarum* could be used as an excellent natural source of antioxidant components.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Peer-review under responsibility of the scientific committee of the International Conference on Materials and Environmental Science, ICMES 2018.

Keywords: Antioxidant activity; *Thymus riatarum*; DPPH; Total phenolic content; Flavonoids contents.

*Corresponding author. Tel: +212694210771

E-mail address: imaneaouam@hotmail.com

2214-7853 © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Peer-review under responsibility of the scientific committee of the International Conference on Materials and Environmental Science, ICMES 2018.

1. Introduction

The Lamiaceae is considered to be the largest family in the Mediterranean area and consists of about 7100 species worldwide [1]. Many species of the Lamiaceae family are considered of high importance because of their uses in traditional medicine, culinary and cosmetics [1]. One of the major genera belonging to family of Lamiaceae is *Thymus*.

The genus *Thymus* is represented in Morocco by twenty one species, twelve are endemic [2] and is distributed in the Mediterranean region [3]. Some of these species have been used for their preservative and medicinal properties [3] and have been added to foods (condiment and spice) [4] their oil and extracts has found applications in cosmetic, such us toothpastes, and deodorants [5]. It is known to have strong antibacterial [6], antioxidant [7], antifungal [8, 9] antispasmodic carminative [10], diuretic effects [11] and antiviral activities. [2]

In the past two decades, research has focused on Lamiaceae species to extract natural antioxidant that can replace synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT) that might have toxic, carcinogenic effects on human [12]. Furthermore, Lamiaceae species have been used for their antimicrobial properties. Micro-organisms are causative factors for the pathogenesis of various diseases as well as for the deterioration of food, cosmetic and pharmaceutical products. Besides, in the last years, the number of bacteria resistant to current antibiotics has increased dramatically [13], thus there is a great need for discovering new antimicrobial agents. Phenolics in Lamiaceae have been also studied by many institutions for their role as antioxidants compounds [14,15] that can replace synthetic antioxidants and as antimicrobial agents that can replace synthetic antibiotics.

In this context, the aim of this study was to evaluate for the first time the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of *Thymus riatarum* extracts, in order to explore new sources for natural antioxidants in food and pharmaceutical formulations.

2. Material and Methods

2.1. Reagents and standards

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), Butylated hydroxytoluene (BHT), aluminum chloride (AlCl_3), sodium phosphate, ammonium molybdate, iron III chloride (FeCl_3), potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), sodium nitrite (NaNO_2), ascorbic acid, gallic acid and Folin-Ciocalteu were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium carbonate (Na_2CO_3) was purchased from Prolabo (Paris, France). All the other chemicals and solvents used were of analytical grade.

2.2. Plant materials and preparation of extracts

Aerial parts of *Thymus riatarum* were collected in January 2016 in a winery located in hills in the region of Taza, 100 km from Fez city, Morocco. Identification was confirmed by Professor Amina Bari, botanist (Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez (Morocco). The plant material was dried for 7 to 10 days in the shade, and then stored in cloth bags at 5°C until extraction. 10 g of powder was macerated with 100 ml of solvent (water, methanol, ethanol and ethyl acetate) for 48 h. The resultant macerate was filtered and then concentrated to dryness under vacuum at 40°C using Rotary evaporator. The obtained extracts were kept in sterile sample tubes and stored in a refrigerator at 4°C .

2.3. Statistical analysis

Means of triplicate analysis were calculated and data was expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA statistical analysis followed by Tuckey-test was performed using the GraphPad Prism 5 (Microsoft Software) for comparison between the extracts. A difference was considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

2.4. Total phenolic content

Total phenolic content of the extract was determined by Folin-Ciocalteu method [16]. The 0.5 mL of a known dilution of the extract and 2 ml of 7% sodium carbonate solution were added to 2.5 mL of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2H of reaction at room temperature in

the dark. Gallic acid was used as standard for the construction of calibration curve. Total phenols contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram powder (mg GAE/g DW).

2.5. Total flavonoids contents

Total flavonoids contents of extracts were measured by the aluminium chloride colorimetric assay [17]. 1ml of sample or rutin standard solution was added into a 10 mL volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5% NaNO₂ was added, after five minutes 0.3 ml 10 % AlCl₃ was added to react for six min. After that, 2 ml IM NaOH was added and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as standard for the construction of calibration curve. Total flavonoids contents were expressed as mg rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW). All samples were analyzed in triplicate.

2.6. Antioxidant activity

2.6.1. DPPH radical scavenging activity

The DPPH method was introduced 50 years ago by Blois [18]. The ability extracts to scavenge the DPPH radical was measured using the method by Wu [19]. 0.1 ml of various concentrations of extracts or standard was added with 1.5 ml of ethanolic solution containing 0.1mmol of DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in dark. The percentage inhibition was calculated by the following equation:

$$I (\%) = (1 - (A_s / A_0)) * 100$$

Where A₀ is the absorbance of the negative control, and A_s is the absorbance of the sample. BHT served as positive control. The IC₅₀ values were calculated as the concentration of causing a 50% inhibition of DPPH radical.

2.6.2. Reducing power capacity

The reducing capacity of the tested extract was determined in accordance with the procedure of Oyaizu [20]. 100 µl of extract was mixed with 500 µl of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 500 µl of potassium ferricyanide [K₃F₆(CN)₆] 1%. The obtained solution was incubated at 50°C for 20 min. The mixture was acidified with 500 µl of Trichloroacetic (TCA) 10% which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2,5 ml) was mixed with 500 µl of distilled water and 100 µl of F₆Cl₃ (0, 1%), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercitine was used as standard. The results were expressed as IC₅₀ (mg/ml). IC₅₀ (concentration corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

2.6.3. Total antioxidant capacity

The assay was based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) and subsequent formation of a green phosphate/Mo (V) complex in acid pH [21]. A total volume of 25 µl oils dissolved in ethanol was added to 1 mL of reagent solution (0.6 mol/L sulphuric acid, 28 mmol/L sodium phosphate and 4 mmol/L ammonium molybdate). The mixtures were incubated at 95 °C for 90 min then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 695 nm (Jasco v-530). The total antioxidant activity was expressed as the number of equivalence of ascorbic acid (mg AAE/g DW).

3. Results and Discussion

3.1. Total phenolic (TPC) and total flavonoids (TF) contents

Table 1: Total phenolic and flavonoid contents of extracts from *T.riatarum*

Type of extracts	Total phenolic content (mg GAE/g DW)	Total flavonoid content (mg RE/g DW)
Ethanolic	135.8±1.632 ^a	120.6±1.316 ^b
Methanolic	113.2±1.521 ^b	100.3±1.132 ^c
Ethyl acetate	1.325±1.161 ^d	165.7±1.521 ^a
Aqueous	88.7±1.352 ^c	10.58±0.145 ^d

All the results were expressed as mean ± SD of three different trials. a–d Column wise values with same superscripts of this type indicate no significant difference (P<0.05). In each line, values followed by different letters are significantly different (P < 0.05).

The antioxidant activities of polyphenols were attributed to their redox properties, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors and singlet oxygen quenchers, as well as to their metal chelating abilities. Therefore, in the present study, the total amount of phenols and flavonoids of ethanol, methanol, ethyl acetate and water extracts of *T. riatarum* were calculated and results are given in Table 1. As we can clearly see, the ethanol extract are characterized by a higher content of phenols on respect to the other extracts (135.8±1.632 mg GAE/g DW), followed by methanol (113.2±1.521 mg GAE/g DW), water (88.7±1.352 mg GAE/g DW) and ethyl acetate value of (1.325±1.161 mg GAE/g DW). In comparison to previous research, these results of total phenols were found to be higher than those of *Thymus* species such as *T. caramanicus*, *T. satureioides* and *T. vulgaris* with values of 124.30 mg GAE/gDW [22], 48.43 mg GAE/gDW [23] and (165.1 mg GAE/gDW) [24] respectively.

In the other hand, the uppermost amounts of total flavonoid contents were found as 165.7±1.521 mg QE/g DW for ethyl acetate. Whereas minimum one was noticed for water (10.58±0.145 mg QE/g DW). While Tepe *et al.* reported that the aqueous extract of *T. satureioides*, *T. atlanticus*, and *T. zygis* had a greater flavonoid contents with values of 182.79 ± 3.23 mg QE/g DW, 155.11 ± 3.90 mg QE/g DW and 208.13 ± 4.20 mg QE/g DW respectively [25]. Moreover, *T. capitatus* showed a total flavonoid content value of (10.62±0.24 mg QE/g DW) [26]. Baharfar *et al.* recorded that the flavonoid contents value of *T. kotschyanus* ranged between 32.04 and 74.60 mgQE/gDW [27]. This difference in results depends on the type of solvent and the methods of extractions [28]. It was reported that the amount of phenol compounds in plants depend on biological factors and environmental conditions (temperature, water stress and salinity...). In other hand, a recent research by Pereira and Cardoso [29] summarized the polyphenolic compositions of various *Thymus* species. In addition, various experimental investigations have showed that many secondary metabolites such as polyphenol compounds extracted from medicinal and aromatic plants had a high antioxidant activity due to their hydroxyl groups and protected more efficiently against many diseases caused by free radical [30].

3.2. Antioxidant activity

The diversity of nature and the complexity of phytochemical compounds of plant extracts impose the development of many methods to evaluate the antioxidant activity and to estimate the effectiveness of these substances. Three methods have been used to measure the antioxidant activities of *T. riatarum* extracts: DPPH radical scavenging assays, Ferric reducing power and total antioxidant capacity.

3.2. 1. DPPH radical scavenging activity

The free radical scavenging activity was determined by the DPPH assay. This test aims to measure the capacity of the extracts to scavenge the stable radical DPPH formed in solution by donation of hydrogen atom or an electron. [25]

Table 1: DPPH radical scavenging activity and ferric reducing power capacity of *Thymus riatarum* extracts.

Type of extracts	DPPH (mg/ml)	FRAP (mg/ml)
Ethanolic	0.091±0.02 ^c	0.39±0.024 ^b
Methanolic	0.087±0.01 ^c	0.19±0.013 ^c
Ethyl acetate	0.670±0.03 ^b	0.43±0.035 ^a
Aqueous	1.025±0.02 ^a	0.17±0.025 ^c
BHT	0.119±0.002 ^c	-
Quercitine	-	0.03±0.006 ^d

Data are reported as mean values ± SD of three measurements. Means were significantly different when $P < 0.05$; values followed by different letters are significantly different.

Table 2 summarized the DPPH free radical scavenging activity of *Thymus riatarum* extracts. As it is known, the lower IC_{50} value indicated the higher free radical scavenging activity of the plant extract. As shown in table 2, all extracts obtained from *T. riatarum* showed antioxidant activity in these assay with an IC_{50} ranged from 0.087 to 1.025 mg /ml for methanol and aqueous extracts, respectively. The methanolic and ethanolic extracts have a reduction power similar to that of the standard antioxidant. Based on these results, the methanolic extract of *T. riatarum* showed the highest activity than that founded by I. Ben El Hadj *et al.* ($IC_{50} = 0.011$ mg/ml) [31] and lowest than the activity of *T. caramanicus* reported by Safaei-Ghomi *et al.* ($IC_{50} = 0.043$ mg/ml) [21]. Previous research attested an important antioxidant activity of various extracts from *Thymus* species such as *T. praecox* [32] and *T. vulgaris* [33]. Moreover, the antioxidant activity of *T. riatarum* may be attributed mainly to the presence of phenolic components, especially thymol and carvacrol [34], and the strong radical scavenging activity of these compounds is well studied. [35]

3.2.2. Ferric reducing capacity

The present assay of reducing activity was based on the reduction of ferricyanide complex to the ferrous form in presence of antioxidant agents in the tested samples [36]. Table 2 depicts the results of reducing power assay compared to that of quercetin which is known as an efficient reducing agent.

The results showed a range for ferric reducing power from 0.17±0.025 to 0.43±0.035 mg/ml. The aqueous extract significantly contained the highest ferric reducing power (0.17±0.025 mg/ml) than the other extracts.

This high reducing ability of *T. riatarum* extracts demonstrates the good hydrogen and/or electron donor abilities of these extracts which probably owed to their antioxidant propriety. Hence, the quality of natural antioxidants is mainly based on the availability of phenolic compounds. Moreover, numerous reports had indicated that the *Thymus* species possessed the most effective capacity for ferric reducing power [37- 39].

3.2.3. Total antioxidant capacity

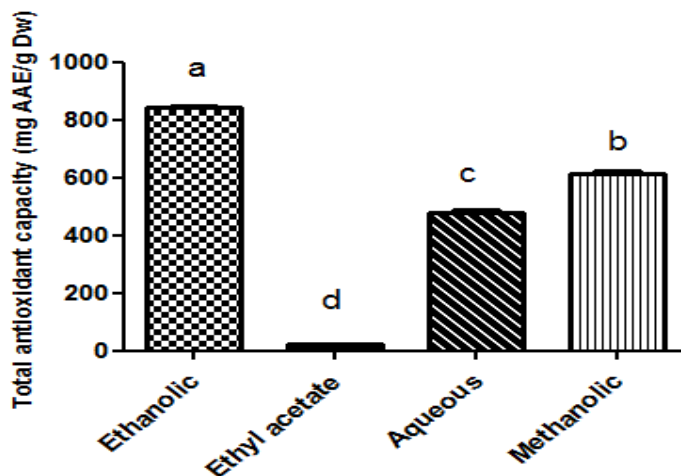


Figure 1: Total antioxidant capacity of different extracts from *Thymus riatarum*. Each value represents means ± SD (n=3). Different letters are significantly different (P < 0.05)

The total antioxidant capacity is a quantitative method was determined by the formation of phosphomolybdenum complexes [40]. This assay is based on the reduction of molybdate (VI) to molybdate (V) in the presence of the extract; the reaction of this method is accompanied by the formation of a phosphate product molybdate (V) and the appearance of a green color. The results of the studied extracts were expressed as ascorbic acid equivalents (mg AAE/g DW) (Figure 1). The ethanol extract significantly revealed the highest total antioxidant capacity (425.23±2.05 mg AAE/g DW) followed by methanol (368.1±1.23 mgAAE/gDW), then water (216.82±2.35 mg AAE/gDW) and ethyl acetate (12.36±0.54 mg AAE/gDW).

Our results are in accordance with those found for the same species by Aouam *et al.* with a value equal to 845.7±4.619 mg AAE/g DW for ethanol extract obtained by Soxhlet method [41]. Moreover, previous published papers demonstrated that extracts of *Thymus* species have strong ability to act as antioxidant [31,39,25]. In another study, they evaluated the ability of *T. vulgaris* oil to protect the laboratory animals from the toxic effects of AFs [42].

4. Conclusion

Summarizing all data here obtained, it can be concluded that *Thymus riatarum*, which is one of the endemic *Thymus* species in Morocco, examined in our study contain remarkable antioxidant potential and important phenolic and flavonoid contents. To the best of our knowledge, this is the first report on the antioxidant effect of *Thymus riatarum* extracts obtained by maceration method. Our study suggests that this medicinal plant may have a great relevance as healthy supplements in the prevention of various diseases in which free radicals are implicated. Besides the health aspect, this plant could also be good candidates for the development of natural antioxidant food additives.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest related with this manuscript.

Acknowledgments

The authors offer their sincere thanks the Regional Center of Interface, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez, Morocco, for providing the GC/MS.

References

- [1] R.M. Harley, S. Atkins, A.L. Budantsev, P.D. Cantino, B.J. Conn, R. Grayer, M.M. Harley, R. de Kok, T. Krestovskaja, R. Morales, A.J. Paton, O. Ryding, T. Upson. Labiatae. In: Kadereit, J.W. (Ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants, Lamiales*, vol. VII. Springer, Berlin, 2004, pp. 167–282
- [2] A. Benabid. *Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité*, Paris. 2015.
- [3] E. Stahl-Biskup & F. Saez. *Thyme*. London: Taylor & Francis 2002.
- [4] D.Y. Zhang, X.H. Yao, M.H. Duan, F.Y. Wei, G.H. Wu, L. Li. Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China. *Ind. Crops Prod.*, 77(2015) 772–779.
- [5] P. Costa, B. Medronho, S. Gonçalves, A. Romano. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. *Ind. Crops Prod.*, 70(2015) 341–346.
- [6] M.C. Rota, A. Herrera, R.M. Martinez, J.A. Sotomayor, M. Jordan. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hymenalis* essential oils. *J. Food control*. 19(2008) 681-687.
- [7] C. SariKurkcü, M. Sabih Ozer, M. Eskici, B. Tepe, S. Can, E. Mete. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and chem. toxicol.* 48(2010) 1801-1805.
- [8] M.J. Goncalves, M.T. Cruz, C. Cavaleiro, M.C. Lopes, L. Saguaro. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Ind. Crops Prod.* 32(2010) 70-75.
- [9] E. Pinto, C. PinaVaz, L. Salguaro, M.J. Gonçalves, S. Costa-de-Oliveira, C. Cavaleiro, A. Palmeira, A. Rodrigues, Martinez-de-O. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. medic microbiology*. 55(2006) 1367-1373.
- [10] T. Dob, D. Dahmane, T. Benabdelkader, C. Chelghoum. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int. J. Aromather.* 16(2006) 95–100
- [11] M. Hazzit, A. Baaliouamer, A.R. Verissimo, M.L. Faleiro, M.G. Miguel. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.* 116(2009) 714–721.
- [12] N. Göktürk Baydar, G. Gülcan Özkanb, S. YaS arc. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Chem.* 18(2007) 1131–1136.
- [13] U. Theuretzbacher. Resistance drives antibacterial drug development. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11(2011) 433–438.
- [14] P. Costa, S. Goncalves, P. Valentao, P.B. Andrade, N. Coelho, A. Romano. *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chem.* 135(2012) 1253–1260.
- [15] V. Goulas, A.M. Gomez-Caravaca, V. Exarchou, I.P. Gerathanassis, A. Segura-Carretero, A. Fernández Gutiérrez. Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT - Food Sci. Technol.* 46(2012) 104–109.
- [16] K. Slinkard, V. Singleton. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28(1977) 49–55.
- [17] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chem.* 64(1999) 555-59.
- [18] M.S. Blois. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(1958) 1199-1200.
- [19] C. Wu, H.M. Chen, C.Y. Shiou. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research internat.* 36(2003) 949-957.
- [20] M. Oyaizu. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nut.* 44(1986) 307-315
- [21] P. Pierto, M. Pineda, M. Aguilar. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex; specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269(1999) 337-341.
- [22] J. Safaei-Ghomi, A.H. Ebrahimabadi, Z. Djafari-Bidgoli, H. Batooli. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chem.* 115(2009) 1524–1528.
- [23] K. Fadili, S. Amalich, K.N. Dedianhoua, M. Bouachrine, M. Mahjoubi, F. EL Hilali, T. Zair. Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satreoides*. *Int J Inno Sci Res.* 17(1)(2015) 24-33.
- [24] E. Mancini, F. Senatore, D. Del Monte, L. De Martino, D. Grulova, M. Scognamiglio, M. Snoussi, V. De Feo. Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules.* 20(7)(2015) 12016-12028.
- [25] B. Tepe, M. Sokmen, H.A. Akpulat, D. Daferera, M. Polissiou, A. Sokmen. Antioxidative activity of the essential oils of *thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *J. Food Eng.* 66(2005) 447–454.

- [26] I. Jabri-Karoui, I. Bettaieb, K. Msaada, M. Hammami, Marzouk. Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *J.Funct Foods*. 4(2012) 661–669.
- [27] R. Baharfar, R. Azimi, M. Mohseni. Antioxidant and antibacterial activity of flavonoid-, polyphenol- and anthocyanin-rich extracts from *Thymus kotschyianus* boiss & hohen aerial parts. *J. Food Sc Tech*. 52(2015) 6777–6783.
- [28] R. Ksouri, W. Megdiche, H. Falleh, N. Trabelsi, M. Boulaaba, A. Smaoui, C. Abdelly. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*. 331(2008) 865–873.
- [29] O.R. Pereira, S.M. Cardoso. *Curr. Anal. Chem*. 9(2013) 382–396.
- [30] J. Vaya, S. Mahmood, A. Goldblum, M. Aviram, N. Volkova, A. Shaalan. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Photochemistry*. 62(2003) 89–99.
- [31] I. Ben El Hadj Ali, R. Bahri, M. Chaouachi, M. Boussaïda, F. Harzallah-Skhiri. Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. organs. *Ind. Crops Prod*. 62(2014) 188–195.
- [32] T. Ozen, I. Demirta, H. Aksit. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*. 124(2011) 58–64.
- [33] M.H.H. Roby, M.A. Sarhana, K.A.H. Selima, K.I. Khalel. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod*. 43(2013) 827–831.
- [34] I. Aouam, Y. El atki, A. Taroq, F. El kamari, B. El youssi, A. Abdellaoui. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of two moroccan thymus essential oils. *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 12(1)(2019) 447–451 In press.
- [35] T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, M. Milos. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 85(2004) 633–640.
- [36] A. Aktumsek, G. Zengin, G.O. Guler, Y.S. Cakmak, A. Duran. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chem. Toxicol*. 55(2013) 290–296.
- [37] H.N. Habashya, M.M. Abu Serieb, W.E. Attiaa, S.A.M. Abdelgaleilc. Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. *Journal of Functional Foods*. 40(2018) 317–328.
- [38] B. Tohidi, M. Rahimmalek, A. Arzani. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chem*. 220(2017) 153–161.
- [39] T. Khouya, M. Ramchoun, A. Hmidani, S. Amrani, H. Harnafi, M. Benlyas, Y. Filali Zegzouti, C. Alem. Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. (2015) 636–644.
- [40] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269(1999) 337–341.
- [41] I. Aouam, Y. El atki, A. Taroq, F. El kamari, B. El youssi, A. Abdellaoui. Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Various Extracts of *Thymus Riatarum* from Morocco, *J. pharm. sc. res*. 10(11) (2018) 2689–2692.
- [42] A.A. El-Nekeety, S.R. Mohamed, A.S. Hathout, N.S. Hassan, S.E. Aly, M.A. Abdel-Wahhab. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol* 57(2011) 984–991.

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL, AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF TWO MOROCCAN *THYMUS* ESSENTIAL OILS

IMANE AOUAM*, YASSINE EL ATKI, AMAL TAROQ, FATIMA EL KAMARI, ABDEFATTAH ABDELLAOUI

Department of Biology, Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco. Email: imaneaouam@hotmail.com

Received: 24 October 2018, Revised and Accepted: 04 December 2018

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study is to investigate chemical constituents of *Thymus riatarum* and *Thymus blecherianus* essential oils (EOs) as well as to evaluate, for the first time, their antioxidant effect and antibacterial activity against six bacterial strains responsible for nosocomial infections.

Methods: The chemical composition of EOs was analyzed using gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry, the antibacterial capacity of the two thymus species was evaluated against six bacteria species: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Citrobacter* sp. using disk diffusion method and microdilution assay. Finally, the antioxidant activity was measured by four different test systems of assay, namely free radical scavenging activities, ferric reducing/antioxidant power assays, total phenolic, and flavonoid contents.

Results: A total of 15 compounds representing 99.6% of *T. riatarum* oil were identified with thymol (28.8%), borneol (20.0%), and α -phellandrene (13.0%) as the main constituents. Eleven components of *T. blecherianus* were identified representing 98.2% of the total oil composition; the most abundant constituents were as follows: Carvacrol (45.9%), bornyl acetate (20.1%), and borneol (15.7%). Strong antibacterial activity of the two EOs was identified against all bacterial strains tested. Concerning the antioxidant results, *T. riatarum* EO exhibited higher antioxidant activity than *T. blecherianus* in the three assays with an IC_{50} value equal to 5.75 ± 0.06 mg/ml, which was probably due to its high content of polyphenols (28.95 ± 0.13 mg GAE/g DW). Total flavonoid content was found equal for the two EOs.

Conclusion: EO of *T. riatarum* and *T. blecherianus* from Morocco can be exploited as a natural antibacterial and antioxidant new potential sources.

Keywords: *Thymus riatarum*, *Thymus blecherianus*, Antibacterial activity, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Ferric reducing/antioxidant power, polyphenol, Flavonoids.

© 2019 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i1.30377>

INTRODUCTION

Herbs and species are natural plant products which have been used for thousands of years for flavoring, food preservation, and as a source of traditional medicines [1]. Therefore, the demand of aromatic plants is increasing through the world for their content of phytochemicals that can alleviate illness, antimicrobial, and antioxidant [2-6]. Antioxidant effect of plant essential oils (EOs) has been used as food preservation, natural therapies, functional food to promote health, and reduce oxidative stress and has a major role in the treatment of many human chronic diseases related to degenerative disorders, cardiovascular, diabetes, cancer, arthritis, and cancer, by acting as free radical scavengers [7-9]. In the other hand, the resistance of antibiotic provokes an increasing interest in evaluating the antimicrobial effects of plant secondary metabolites against many pathogens, to identify and evaluate natural products to assure consumers a safe, wholesome, and nutritious food supply [10].

The genus *Thymus* (Family Lamiaceae) comprises about 215 species of herbaceous perennials and subshrubs [11]. While the Mediterranean region has been recognized as the center of this genus [13], twenty one species of thyme have been identified in Morocco, twelve are endemic [12]. Some of these species have been used for their preservative and medicinal properties [2] and have been added to foods (condiment and spice) [14] their EOs has found applications in cosmetic, such as toothpastes and deodorants [15]. Previous studies have demonstrated that *Thymus* species have strong insecticide, antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and

antispasmodic activity [11,16,17]. Different reports have shown that thymol and carvacrol are the main components of thymus EOs which are responsible for their high biological activities [18-21]. Among this genus, *Thymus blecherianus* and *Riatarum* locally called "zaatar" are the most important species from medicinal and aromatic properties and used worldwide for its antimicrobial activities.

To the best of our knowledge, there are no reports about antioxidant properties and antibacterial activity against bacteria responsible for nosocomial infections for the two thymus species (*Blecherianus* and *Riatarum*). Therefore, the objective of the present study is to investigate the chemical constituents of *T. riatarum* and *T. blecherianus* EOs as well as to evaluate, for the first time, their antioxidant and antibacterial activities.

METHODS

Plant material

Fresh leaves of *T. blecherianus* and *T. riatarum* were collected in Morocco at flowering stage (Mars 2016) from the region of Taza. They were identified by Professor Amina Bari, botanist Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez (Morocco). The leaves were dried for 7-10 days in the shade and then stored in cloth bags at 5°C until extraction.

Preparation and analysis of EO

Dried shoot was hydro-distilled for 3 h with 500 ml of water using a Clevenger-type apparatus, according to the European

Pharmacopoeia [22]. The EOs obtained were dried over anhydrous sodium sulfate and stored in a refrigerator at 4°C before analysis. The oil yield was based on dry weight of the simple.

Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS)

The EOs compounds were analyzed on a Thermo Fischer capillary gas chromatograph directly coupled to a mass spectrometer system (model GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 210729), HP-5MS nonpolar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, 0.25 μm film thickness). The temperature was maintained at 40°C for 2 min, then increased at a programmed rate of 2°C per min to a final temperature of 260°C, which was maintained for 10 min; injector temperature 250°C. The helium was used as carrier gas at a flow rate of 1ml per min. Each sample was run in hexane with a dilution ratio of 10:100. Compounds were identified by matching their MS and retention index with those reported in literature [23]. The injected specimen volume was 1 μl of diluted oil; split injection technique; ionization energy 70eV in the electronic ionization mode; ion source temperature 200°C, scan mass range m/z 40–650; and interface line temperature 300°C. The EO components were identified by comparing their retention times and mass fragmentations with NIST-MS and literature comparison [24].

Bacterial strains

Five Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumani*, and *Citrobacter* sp.) and one Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*). These bacterial strains which are responsible for nosocomial infections were isolated in a hospital environment from clinical patients in reanimation service (CHU, Morocco).

Antibacterial activity assessment

The antibacterial power of *T. riatarum* and *T. blecherianus* EOs was determined using the agar disk diffusion procedure was adapted from a method used earlier [25]. Each microorganism stock was suspended in Mueller-Hinton (MH) broth and incubated at 37°C for 18–24 h. The overnight cultures were diluted and adjusted to get a density of 1–5 × 10⁶ CFU/ml (0.5 McFarland turbidity standards). They were flood-inoculated onto the surface of MH agar plates and 6 mm diameter, sterile filter discs of Whatman paper N°3, impregnated with 15 μg/disc of the EO and were delivered onto the inoculated agar MH. All plates were incubated for 18 h at 37°C. Antibacterial effect was tested by measuring the zones of inhibition. The antibiotic standards used were imipenem, ampicillin, pristinamycin, and ceftriaxone [26–28]. The tests were carried out in triplicates.

Determination of minimal inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using a microdilution assay in 96-well plates according to the experiment of the National Committee for Clinical Laboratory Standards [29] with some modification; the different concentrations of thymus EO are prepared in a suspension containing 0.2% agar in sterile distillate water to disperse the compounds without adding solvent or detergent [30]. They are carried out by successive dilutions 1/2 ranging from 20 to 0.039 mg/ml. The concentrations obtained in the well were between 5 and 0.0097 mg/ml. The bacterial suspensions were prepared in the same manner described previously and diluted in MH broth and plated in 96 well plates at a density of 1–5 × 10⁶ CFU/ml. Thymus EO was added at different concentrations at the corresponding wells to determine MIC values. Finally, all plates were incubated at 37°C for 18–24 h, bacterial growth was visually by adding to each well 20 μl of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride aqueous solution (1%), with additional incubation for 1 h. MIC was the lowest concentration that does not produce red color [31].

Antioxidant activity

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

The DPPH test was introduced 50 years ago by Blois [32]. The ability of EOs to scavenge the DPPH radical was measured using the method described by Wu *et al.* [33]. 0.1 ml of EOs or standard was added with 1.5 ml of an ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH. After 30 min

of incubation time at room temperature in the dark, the absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530). The inhibition percentage was calculated by the following equation:

$$I (\%) = (1 - (A_s/A_0)) * 100$$

Where A₀ and A_s were the absorbances of the negative control and the sample, respectively. Butylated hydroxytoluene (BHT) served as positive control. The IC₅₀ values were defined as the concentration of causing a 50% inhibition of DPPH radical.

Reducing power capacity

The reducing capacity of the tested EOs was determined in accordance with the procedure of Oyaizu [34]. 100 μl of EO was mixed with 500 μl of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 500 μl of potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] 1%. The obtained solution was incubated for 20 min at 50°C. The mixture was acidified with 500 μl of trichloroacetic 10%, which was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500 μl of distilled water, and 100 μl of FeCl₃ (0, 1%) and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercetin was used as a standard. The results were expressed as IC₅₀ (mg/ml). IC₅₀ (concentration corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

Total phenolic content (TPC)

TPC of the volatile extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method [35]. The 0.5 ml of a known dilution of the EO and 2 ml of 7% sodium carbonate solution were added to 2.5 ml of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2H of reaction at room temperature in the dark. Gallic acid was used as a standard for the construction of a calibration curve. Total phenols contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of EO (mg GAE/g EO).

Total flavonoids contents (TFC)

TFC of volatile extracts were measured by the aluminum chloride colorimetric assay [36]. 1ml of sample or rutin standard solution was added into a 10 ml volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5% NaNO₂ was added, after 5 min, 0.3 ml 10% AlCl₃ was added to react for 6 min. After that, 2 ml NaOH (1M) was added, and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed, and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as a standard for the construction of the calibration curve. TFC were expressed as milligrams of rutin equivalents per gram of EO (mg RE/g EO). All samples were analyzed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

EOs composition

The EO obtained from leaves of *T. blecherianus* and *T. riatarum* was yellow in color with a yield of 2% and 0.5% (v/w), on dry weight basis, respectively. The obtained yield is higher than the results of studies of the same species with a yield of 1.75% and 0.26% for *T. blecherianus* and *T. riatarum*, respectively [37,38].

The analysis of two EOs was carried out using GC and GC-MS (Table 1). 15 compounds constitute 99.6% of the total *T. riatarum* EO. The main compounds identified were thymol (28.8%), borneol (20.0%), and α-phellandrene (13%). A different composition has been reported recently for the same species, with the main compounds were borneol (41.67%), terpinene-4-ol (8.65%), and trans-caryophyllene (7.59%) [38]. Another study of this EO demonstrated that the major constituents were carvacrol (22.3%), p-cymene (17.5%), and α-terpinene (10.3%) [39]. Furthermore, Belmalha *et al.* revealed also the chemical composition of *T. riatarum* with 33 compounds identified (87.71%); borneol (31.3%) as the most abundant compound [40].

Regarding the EO compositions of *T. blecherianus* characterized by 11 compounds amounted to 98.2%. The oil was dominated by carvacrol (45.9%) followed by bornyl acetate (20.1%) and borneol (15.7%).

Amarti et al. revealed a different chemical composition for the same species, which the main constituents are α -terpinene (42.20%) and thymol (23.90%) [37]. The difference in the composition of EOs of the same species was attributed to various factors such as climate conditions, geographical location, harvesting period, and distillation method [41].

Antibacterial activity

The antibacterial effect of the EOs of *T. blecherianus* and *T. riaratum* was tested against six bacteria strains: *E. coli*; *P. aeruginosa*; *K. pneumonia*; *S. aureus*; *A. baumannii*, and *Citrobacter* sp. responsible for nosocomial infections in Center Hospital University of Fez Morocco.

The results from the antibacterial activity tested by diffusion in agar disc method are summarized in Table 2. All bacterial strains were susceptible to *Thymus* EOs studied. According to our results (Table 2), the two EOs were generally more effective against Gram-positive than Gram-negative bacteria; the higher antibacterial effect of EOs of *T. blecherianus* and *T. riaratum* was observed against *S. aureus* strain with 20.1±0.1 mm for *T. blecherianus* and 21±0.5 mm for *T. riaratum*. However, the lowest inhibition was showed against *A. baumannii* and *Citrobacter* sp. respectively. On the other hand, the antibacterial effect of two thymus EOs showed stronger activity when compared to all standard antibiotics used as positive controls except IMP.

The antibacterial activity evaluation using the microdilution method (Table 2) showed that *T. blecherianus* and *T. riaratum* EOs are efficient at various concentrations ranging from 0.019 to 0.156 mg/ml. As presented in Table 2, the highest effective concentration was 0.019 mg/ml against *S. aureus* for two EOs and also against *K. pneumonia* for only *T. riaratum*.

Our results are highest than those reported by El Bouzidi et al. about the effective activity of wild and cultivated EO of *T. maroccanus* against

S. aureus with MIC = 0.46 and 0.96 mg/ml, respectively [17]. Rota et al. showed an increased sensitivity of *S. aureus* for the Thymol chemotype of *Thymus zygis* ssp. *Gracilis* [42]. However, Kaloustian et al. found that *E. coli* is more susceptible than *S. aureus* to Thyme [43]. Previous studies are also demonstrated that *T. riaratum* and *T. numidicus* EO exhibited a significant antibacterial activity which *S. aureus* showed higher inhibition [38,44]. This great antibacterial activity of thyme EO can be explained by the presence of carvacrol and thymol [45,46], it is possible that other minor constituents are also contributing to the activity, as well as the synergistic impact of their combination in EO [47].

Antioxidant activity

DPPH radical scavenging activity

The antioxidant effect was often tested by the DPPH scavenging activity assay. Table 3 depicts DPPH results of *T. blecherianus* and *riatarum* EOs. As can be seen, *T. riaratum* had the greatest radical scavenging capacity with an IC₅₀ value of 5.75±0.06 mg/ml followed by *T. blecherianus* (IC₅₀= 6.87±0.3 mg/ml). However, when compared to the pure reference antioxidant BHT (0.11±0.002 mg/ml), all the tested EOs showed a significantly lower antioxidant activity (p<0.05). *T. blecherianus* EOs showed the lowest activity than that founded by Amarti et al. (IC₅₀ = 77.8 µg/ml) [48], and also lowest than *T. serpyllum*, *Thymus algeriensis*, and *Thymus vulgaris* with IC₅₀= 0.96 µg/ml, IC₅₀ = 1.64 µg/ml, and IC₅₀ = 4.80 µg/ml, respectively, reported by Nikolić et al. [49].

Recently, the demand for natural antioxidants for food conservation is one of the important trends in the food industry. Synthetic antioxidants such as BHT are toxic and carcinogenic [50]. This is why the use of EOs as natural antioxidants has attracted increasing interest in recent decades.

Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) capacity

The reducing power capacity is a useful method for measuring antioxidant activities [51]. In this assay, hydroxyl radicals are generated by the reaction of Fe²⁺ and H₂O₂, and the antioxidant agents reduce the generation of hydroxyl radicals by chelating Fe²⁺ [52]. The results of this activity (Table 3) showed that the EOs of the two plants have a comparable reducing capacity against the ferric ion; 14.73±0.25 mg/ml for *T. blecherianus* and 11.86±0.15 mg/ml for *T. riaratum* which is lowest than *T. serpyllum* and *T. algeriensis* EO (IC₅₀ = 0.66 µg/ml and 0.68 µg/ml, respectively) [49] and lowest than wild and cultivated *T. maroccanus* with IC₅₀ = 139.31±1.08 and 149.41±1.13 µg/ml, respectively [17]. Tohidi et al. demonstrated that the reducing ability of the *Thymus* species was observed to increase with increasing EO concentration [53]. Previous studies have also reported the antioxidant activity of EOs from different *Thymus* species [48,49]. The antioxidant activity of *Thymus* oils is often attributed to the presence of thymol, carvacrol, phenolic acids, and flavonoids [54].

TPC and TFC

It is generally demonstrated that the antioxidant activity of plant EOs is correlated with the TPC and TFC [51]. Therefore, to determine the antioxidant activity of *T. blecherianus* and *Riatarum* EOs, we analyzed the TPC and TFC of each test sample and results are presented in Table 4.

Table 1: Volatile compounds (%) of EOs of studied *Thymus* spices

Component	RI	Tr (%)	Tb (%)
a- thujene	930	2.6	1.4
α -pinene	943	7.3	0.9
Camphene	957	2.1	1.3
α -Phellandrene	1003	13.0	0.6
2-carene	1007	0.8	-
3-carene	1020	1.2	3.1
Borneol	1170	20.0	15.7
Bornyl acetate	1289	4.9	20.1
Thymol	1297	28.8	5.0
Carvacrol	1305	2.3	45.9
Acethyl thymol	1357	4.6	-
Eugenol	1375	7.7	3.1
Longifolene	1403	1.1	-
Caryophyllene	1420	1.7	1.1
Caryophyllene oxide	1457	1.5	-
Total		99.6	98.2

RI: Retention index, Tr: *Thymus riaratum*, Tb: *Thymus blecherianus*, EOs: Essential oils

Table 2: Antimicrobial activity of *Thymus blecherianus* and *Thymus riaratum* EOs using disk diffusion assay and antibiotic standards

Bacterial species	<i>Thymus blecherianus</i> EOs (15 µl/disc)		<i>Thymus riaratum</i> EOs (15 µl/disc)		Antibiotic standards
	DD (mm)	CMI (mg/ml)	DD (mm)	CMI (mg/ml)	DD (mm)
<i>Escherichia coli</i>	12±0.2	0.156	15±0.8	0.078	18 (IMP), 5 (AMP), 0 (CEC), 12 (PT)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14.3±0.8	0.078	18±0.6	0.019	30 (IMP), 0 (AMP), 12 (CEC), 10 (PT)
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.1±0.1	0.019	21±0.5	0.019	39 (IMP), 0 (AMP), 10 (CEC), 16 (PT)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16±0.5	0.078	17.6±0.8	0.039	28 (IMP), 8 (AMP), 0 (CEC), 10 (PT)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	10.6±0.7	0.156	14.3±0.1	0.078	22 (IMP), 0 (AMP), 5 (CEC), 6 (PT)
<i>Citrobacter</i> sp.	12±0.5	0.078	15.5±0.9	0.078	17 (IMP), 8 (AMP), 15 (CEC), 8 (PT)

MIC: Minimum inhibitory concentration, DD: Disk diffusion assay, diameter of inhibition zone including disk diameter of 6 mm., EOs: Essential oils

Table 3: DPPH radical scavenging activity and ferric reducing power capacity of different EO from *Thymus blecherianus* and *Thymus riatarum*

	DPPH IC ₅₀ (mg/ml)	FRAP IC ₅₀ (mg/ml)
<i>Thymus blecherianus</i>	6.87±0.30 ^a	14.73±0.25 ^a
<i>Thymus riatarum</i>	5.75±0.06 ^b	11.86±0.15 ^b
BHT	0.11±0.002 ^c	-
Quercetin	-	0.03±0.006 ^c

All the results were expressed as mean±SD of three different trials. In each line, values followed by different letters are significantly different (p<0.05). FRAP: Ferric reducing/antioxidant power, DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, BHT: Butylated hydroxytoluene, EOs: Essential oils

Table 4: Total phenolic and flavonoid contents of EO from *Thymus riatarum* and *Thymus blecherianus*

EO	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg RE/g)
<i>Thymus blecherianus</i>	17.63±0.06 ^a	24.17±0.21 ^a
<i>Thymus riatarum</i>	28.95±0.13 ^b	24.20±0.23 ^a

Data are reported as mean values±SD of three measurements. Means were significantly different when p<0.05; values followed by different letters are significantly different, TPC: Total phenolic content, TFC: Total flavonoid content, EOs: Essential oils

TPC was determined in comparison with standard gallic acid, and the results were expressed in terms of mg GAE/g of sample. As we can see, *T. riatarum* demonstrated the highest phenolic content (28.95±0.13 mg GAE/g EO).

On the other hand, TFC results were expressed in terms of mg RE/g weight extract. As shown in Table 4, the total flavonoid content has been found equal for the two spices of thyme.

The results of total phenols in our study were found to be higher than the values reported in literature for *Thymus* species such as *T. capitatus* (15.06±0.73 mg GAE/g) obtained by Jabri-Karoui et al. [55], *T. vulgaris* (8.55 mg QE/g) reported by Tohidi et al. [53], and *T. daenensis* subsp. *Daenensis celak* ranged from 18.82 to 18.97 (mg GAE/g) obtained by Alizadeh et al. [56]. However, our total phenolic results are lowest than *T. numidicus* with 98.66±3.17 mg EAG/g reported by Ali et al. [57] and *T. satureioides* (69.05±0.01 mg/g GAE) reported by Wang et al. [58]. The observed antioxidant potential should be addressed to the phenolic oil constituents such as thymol and carvacrol [59].

Concerning TFC, *T. capitatus* showed a flavonoid content value of 10.62±0.24 mg QE/g [55]. Baharfar et al. recorded that the flavonoid contents value of *T. kotschyanus* ranged from 32.04 to 74.60 mgQE/g [60]. It has reported that flavonoids have an interesting role in scavenging reactive oxygen species, which can counteract lipid oxidation *in vitro* and improve the body's antioxidant enzyme activity, and decrease peroxide formation *in vivo* [61].

CONCLUSION

Our study can be considered as the first report on the antibacterial effect against nosocomial bacteria species and antioxidant capacity basing on free radical scavenging activity (DPPH), FRAP, TPC, and TFC of *T. riatarum* and *Blecherianus*. The tested EOs demonstrated a strong antibacterial and antioxidant activities which are conferred by high thymol and/or carvacrol content. Thus, this study suggests the possibility of using the oils of these *Thymus* species as natural antioxidant and food preservatives, as well as pharmaceutical and natural therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors offer their sincere thanks to the Regional Center of Interface, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez, Morocco, for providing the GC/MS.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All the authors have contributed equally.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

REFERENCES

- Dong H, Zhang Q, Li L, Liu J, Shen L, Li H, Qin H. Antioxidant activity and chemical compositions of essential oil and ethanol extract of *Chuanminshen violaceum*. Ind Crop Prod 2015;76:290-7.
- Saumya S, Basha P. *In vitro* evaluation of free radical scavenging activities of *Panax ginseng* and *Lagerstroemia speciosa*: A comparative analysis. Int J Pharm Pharm Sci 2010;3:165-9.
- Prasanth NV, Dilip C, Dev KT, Augustine L, Saraswathi R. Evaluation of *in-vitro* cytotoxic and antioxidant activities of *Ipomoea batatas*. Int J Pharm Pharm Sci 2010;2:91-2.
- Aharwal RP, Kumar S, Thakur Y, Deshmukh L, Sandhu SS. Evaluation of antibacterial activity of endophytic fungi *Aspergillus japonicus* isolated from *Tridax procumbens* L. Asian J Pharm Clin Res 2018;11:212.
- Benyagoub E, Nabbou N, Razni D, Moghtet S. Antibacterial activity of '*Anastatica hierochuntica* l.' against some bacterial strains responsible for women's uro-genital infection. Asian J Pharm Clin Res 2018;11:222.
- El-hagrassi AM, Abdallah WE, Osman AF, Abdelshafeek KA. Phytochemical study of bioactive constituents from *Satureja montana* l. growing in Egypt and their antimicrobial and antioxidant activities. Asian J Pharm Clin Res 2018;11:142.
- Srinivasan K. Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. Food Rev Int 2005;21:167-88.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:44-84.
- Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. Ind Crops Prod 2017;107:305-11.
- Bajpai VK, Al-Reza SM, Choi UK, Lee JH, Kang SC. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* miki ex hu. Food Chem Toxicol 2009;47:1876-83.
- Stahl-Biskup E, Sáez F. Thyme-the Genus Thyme. Vol. 15. London: CRC Press Book; 2002. p. 330.
- Benabid A. Evaluation et Préservation de la Biodiversité. Flore Ecosystèmes du Maroc, Paris: Ibis Press; 2015.
- Ghasemi P, Barani M, Hamed B, Ataei K, Karimi A. Environment effect on diversity in quality and quantity of essential oil of different wild populations of Kerman thyme. Genetika 2013;45:441-50.
- Zhang DY, Yao XH, Duan MH, Wei FY, Wu GH, Li L. Variation of essential oil content and antioxidant activity of *Lonicera* species in different sites of China. Ind Crops Prod 2015;77:772-9.
- Costa P, Medronho B, Gonçalves S, Romano A. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three *Lamiaceae* species. Ind Crops Prod 2015;70:341-6.
- Aouam I, Elatki Y, Tarog A, Elkamari F, Elyoussi B, Abdellaoui A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Thymus citriodorus* L. Growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Int J Pharm Sci Rev Res 2018;51:72-5.
- El Bouzidi L, Jamali CA, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmut H, Leach D, Abbad A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *thymus* species. Ind Crops Prod 2013;43:450-6.
- Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A, McClements DJ. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of thymus daenensis essential oil against E. Coli. Food Chem 2016;194:410-5.
- Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fernández-López J. Chemical characterization and antibacterial activity

- of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from Southeast of Spain. Food Control 2012;27:294-9.
20. El Ouariachi EM, Hamdani I, Bouyanzer A, Hammouti B, Majidi L, Costa J, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of *Thymus broussonetii* Boiss. and *Thymus algeriensis* Boiss. from Morocco. Asian Pac J Trop Dis 2014;4:281-6.
 21. Russo M, Suraci F, Postorino S, Serra D, Roccotelli A, Agosteo GE. Essential oil chemical composition and antifungal effects on *Sclerotium cepivorum* of *Thymus capitatus* wild populations from Calabria, Southern Italy. Braz J Pharmacogn 2013;23:239-48.
 22. Maisonneuve SA. European Pharmacopoeia. Vol. 3. France: Sainte-Ruffine Counc; 1975. p. 68.
 23. Joulain D, König WA. The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. Hamburg: Verlag; 1998.
 24. Adams RP. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Carol Stream, IL: Allured Pub Corp; 2007.
 25. Gary L, Furtado A. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: Significance of the intermediate category. J Clin Microbiol 1980;14:550-3.
 26. Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pac J Trop Biomed 2015;5:458-61.
 27. Mharti FZ, Lyoussi B, Abdellaoui A. Antibacterial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* used in Moroccan folkloric medicine. Nat Prod Commun 2011;6:1505-6.
 28. El Kamari F, Taroq A, El Atki Y, Aouam I, Lyoussi B, Abdellaoui A. Chemical Composition of essential oils from *Vitex Agnus-Castus* L. growing in Morocco and its *in vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. Asian J Pharm Clin Res 2018;11:365-8.
 29. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 9th International Supplement; 1999.
 30. Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. J Essent Oil Res 1993;5:179-84.
 31. Mello S, Luciano FB, Fronza N, Cunha A Jr., Scheuermann GN, Vieira CR. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh *Tuscan sausage* stored at 7°C. LWT Food Sci Technol 2014;59:86-93.
 32. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958;181:1199-200.
 33. Wu HC, Chen HM, Shiao CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber australis*). Food Res Int 2003;36:949-57.
 34. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J Nutr 1986;44:307-16.
 35. Slinkard VL. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. Am Soc Enologists 1977;28:49-55.
 36. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem 1999;64:555-9.
 37. Amarti F, Satrani B, Aafi A, Ghanmi M, Farah A, Aberchane M, et al. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. Phytothérapie 2008;6:342-7.
 38. Fadli M, Bolla JM, Mezrioui NE, Pagès JM, Hassani L. First evidence of antibacterial and synergistic effects of *Thymus riatarum* essential oil with conventional antibiotics. Ind Crops Prod 2014;61:370-6.
 39. Iglesias J, Vila R, Cañigueral S, Bellakhdar J, Idrissi A. Analysis of the essential oil of *Thymus riatarum*. J Essent Oil Res 1991;3:43-4.
 40. Belmalha S, El Idrissi M, Echchgadda G, Amechrouq A, Bachir S. Chemical composition of the essential oils of three species of wild *Thyme* from Morocco: *Thymus riatarum* Humbert et Maire, *Thymus leptobotrys* Murb. et *Thymus munbyanus* Boiss. et Reuter subsp. *Ciliatus* (Desf.) Greuter et Burdet. Phys Chem News 2012;63:122-8.
 41. Argyropoulou C, Daferera D, Tarantilis PA, Fasseas C, Polissiou M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (*Verbenaceae*) at two developmental stages. Biochem Syst Ecol 2007;35:831-7.
 42. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food Control 2008;19:681-7.
 43. Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF. Étude de six huiles essentielles : Composition chimique et activité antibactérienne. Phytothérapie 2008;6:160-4.
 44. Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. Ind Crops Prod 2016;88:112-9.
 45. El-Jalel LF, Elkady WM, Gonaid MH, El-Gareeb KA. Difference in chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. essential oil at different altitudes. Futur J Pharm Sci 2018;4:156-160.
 46. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Sarker DS, Moore JE, Rao JR, et al. Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. LWT Food Sci Technol 2011;44:1199-206.
 47. Pirbalouti AG, Hossayni I, Shirmardi HA. Essential oil variation, antioxidant and antibacterial activity of mountain fennel (*Zaravschanica membranacea* (Boiss.) M. Pimen.). Ind Crops Prod 2013;50:443-8.
 48. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Aafi A, Farah A, Aarab L, et al. Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. Acta Bot Gall 2001;158:513-23.
 49. Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira CF, Calhelha RC, Fernandes A, Marković T, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Ind Crops Prod 2014;52:183-90.
 50. Safer AM, al-Nughamish AJ. Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive, butylated hydroxytoluene (BHT), in rats: An electron microscopical study. Histochem J 1999;14:391-406.
 51. Hyun TK, Kim HC, Kim JS. Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. Ind Crops Prod 2014;52:611-6.
 52. Bokhari J, Khan MR, Shabbir M, Rashid U, Jan S, Zai JA, et al. Evaluation of diverse antioxidant activities of galium aparine. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2013;102:24-9.
 53. Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. Food Chem 2017;220:153-61.
 54. Nickavar B, Esbati N. Evaluation of the antioxidant capacity and phenolic content of three *Thymus* species. J Acupunct Meridian Stud 2012;5:119-25.
 55. Jabri-Karoui I, Bettaieb I, Msaada K, Hammami M, Marzouk B. Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. J Funct Foods 2012;4:661-9.
 56. Alizadeh A, Alizadeh O, Amari G, Zare M. Essential oil composition, total phenolic content, antioxidant activity and antifungal properties of Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. As influenced by ontogenetical variation. J Essent Oil Bearing Plants 2013;16:59-70.
 57. Ali IB, Bahri R, Chaouachi M, Boussaïd M, Harzallah-Skhiri F. Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. Organs. Ind Crops Prod 2014;62:188-95.
 58. Wang HF, Yih KH, Yang CH, Huang KF. Anti-oxidant activity and major chemical component analyses of twenty-six commercially available essential oils. J Food Drug Anal 2017;25:881-9.
 59. Hazzit M, Baaliouamer A, Verissimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chem 2009;116:714-21.
 60. Baharfar R, Azimi R, Mohseni M. Antioxidant and antibacterial activity of flavonoid-, polyphenol- and anthocyanin-rich extracts from *Thymus kotschyanus* Boiss and Amp; hohem aerial parts. J Food Sci Technol 2015;52:6777-83.
 61. Nakao K, Murata K, Itoh K, Hanamoto Y, Masuda M, Moriyama K, et al. Anti-hyperuricemia effects of extracts of immature *Citrus unshiu* fruit. J Tradit Med 2011;28:10-5.

Research Article



Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential oil of *Thymus citriodorus* L. growing wild in Morocco: Preventive Approach against Nosocomial Infections

Imane Aouam^{*1}, Yassine El Atki¹, Amal Taroq¹, Fatima El Kamari¹, Bouchra Oumokhtar², Badia Lyoussi¹, Abdelfattah Abdellaoui¹
¹Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences DharMahraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P1796, Atlas, Fez, Morocco.

²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, 200 Route de Sidi Harazem, Fez, Morocco.

***Corresponding author's E-mail:** imaneouam@hotmail.com

Received: 30-05-2018; **Revised:** 22-06-2018; **Accepted:** 12-07-2018.

ABSTRACT

In order to elucidate the chemical character of lemon thyme that grows wild in Morocco (*Thymus citriodorus* L.), chromatography (GC) and (GC–MS) was used to analyze the Hydro-distilled essential oil from this Moroccan *Thymus* specie. Forty three components representing 95.4% of the total oil composition were identified. The yield of essential oil was 1% and the predominant components were as follows: terpinyl formate (10.4%), geraniol (8.7%), isogeraniol (7.2%), cubenol (7%), citronellyl tiglate (6.4%), Thymol (5.3%), pulegone (4.8%) and Caryophyllene oxide (4%). Antibacterial activity of the oil was tested against five bacterial strains responsible of Nosocomial Infection: *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumonia*; *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter sp* through using disc diffusion method. Results showed that the essential oil from *Thymus citriodorus* exhibited the higher activity against all bacterial strains tested. Therefore, the essential oil extracted from lemon thyme can be used to clean the environment of polyvalent reanimation and Anesthesia service.

Keywords: *Thymus citriodorus*, Essential oils, Chemical composition, Antibacterial activity, Nosocomial infection.

INTRODUCTION

The genus *Thymus* (family Lamiaceae) is widely distributed in the Mediterranean region.¹ There are twenty one species of this genus in Morocco, twelve are endemic.² Some of these species have been used as infusions, powders and decoctions for their preservative and medicinal properties³ and have been added to foods⁴; their oil is applied in cosmetic such as deodorants and toothpastes.⁵

The previous studies reported that *Thymus* species have strong antibacterial^{6,7}, antifungal⁸, antioxidant^{9,10}, anticancer¹¹, antispasmodic and antiviral activities.³

Until recently, essential oils have been studied most from the viewpoint of their flavour and fragrance chemistry only for flavouring foods, drinks and other goods. Actually, however, the essential oils of plants have been of great interest as sources of natural products and biologically active compounds because of their relatively safe status, their wide acceptance by consumers, and their exploitation for potential multi-purpose functional use.¹²

However, a number of Essential Oil (EO) components have been identified as effective antibacterial against multiple microorganisms^{13,14,15} and numerous publications have presented data on the composition of the various EOs.¹⁶ The essential oils from different *Thymus* species are characterised by their high content of monoterpenes especially phenolic compounds (thymol and carvacrol) and other more or less biologically active compounds

(eugenol, p-cymene, γ-terpinene, linalool, geraniol and bornéol).^{17,18,19,3}

Furthermore, the *Thymus* essential oils are being regarded as the most potent antimicrobial plant agents because of their highest activity, especially pathogens resistant to antibiotic.^{17,13,20}

The objectives of the present study was to determine, for the first time, the chemical composition of the leaf essential oil of *Thymus citriodorus* from Morocco, as well as to evaluate its antibacterial activity against five bacterial strains responsible of Nosocomial Infections encountered in the University Centre Hospital of Fez (Morocco).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Fresh leaves of *Thymus citriodorus* were collected in Morocco at flowering stage (Mars 2014) from the region of Berkin. They were identified by Professor Amina Bari, botanist (Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez (Morocco)).

Preparation and analysis of essential oil

Air-dried leaves were subjected to hydrodistillation for 3 h with 500 ml distilled water using a Clevenger-type apparatus, according to the European Pharmacopoeia.²¹ Essential oil yields of *T. citriodorus* were 1% (v/w) respectively. The oils obtained was collected and dried over anhydrous sodium sulfate and stored in a



refrigerator at 4-5°C prior to analysis. Oil yield was based on dry weight of the simple.

GC and GC-MS analysis

The isolated oil was diluted with hexane (dilution ratio 10:100), and 1 mL was sampled for the gas chromatographic analysis. Trace gas chromatograph (GC) (ULTRA S/N 20062969, Thermo Fischer), gas chromatograph equipped with HP-5MS non polar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, film thickness 0.25 mm) was used. Operating conditions: oven temperature program from 50 °C (2 min) to 280 °C at 5 °C/min and the final temperature kept for 10 min; 2"split mode" ratio 1:20; carrier gas Azoth (N), flow rate 1 mL/min; temperature of injector and detector (flame ionization detector) were fixed at 250 °C and 280 °C, respectively.

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

The volatile constituents were analysed on a Thermo Fischer capillary gas chromatograph directly coupled to a mass spectrometer system (model GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 210729), HP-5MS non polar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, 0.25 µm film thickness). The oven temperature was maintained at 40°C for 2 min, then increased at a programmed rate of 2°C/min to a final temperature of 260°C, which was maintained for 10 min; injector temperature 250°C. The carrier gas was helium at a flow rate of 1ml/min. Samples were run in *n*-hexane with a dilution ratio of 10:100. Compounds were identified by matching their MS and retention index with those reported in the literature.²² The volume of injected specimen was 1µl of diluted oil; split injection technique; ionization energy 70eV in the electronic ionization mode; ion source temperature 200°C, scan mass range *m/z* 40-650, and interface line temperature 300°C. The essential oil components were identified by comparing their retention times and mass fragmentations with the NIST-MS and by literature comparison.²³

Antimicrobial activity assessment

The microorganisms tested were *the Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumonia*; *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter sp.* These were isolated in a hospital environment from clinical patients in reanimation service (CHU, Morocco). For the susceptibility screening test, an agar-disc-diffusion procedure was adapted from a method used earlier.²⁴ Each microorganism stock was suspended in Mueller-Hinton (MH) broth and incubated at 37°C for 18–24 h. The overnight cultures were diluted and adjusted in order to get a density of 10⁸ CFU/ml (0.5 McFarland turbidity standards). They were flood-inoculated onto the surface of MH agar plates and 6 mm diameter, sterile filter discs of Whatman paper N₃, impregnated with 15 µg/disc of the essential oil were delivered onto the inoculated agar MH. The plates were incubated for 18 h at 35°C. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the

zones of inhibition. The antibody standards used were Imipenem, Ampicillin, Kanamycin and Ceftriaxone.^{25, 26} The tests were carried out in triplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Essential oils composition

Table 1: Chemical composition of the essential oil from leaves of *Thymus citriodorus* (%).

Compounds	%	RI
3-Carene	0.4	917
m-Mentha-4,8-diene	2.7	923
Terpinyl propionate	2.2	929
2,3-bornanediol	0.6	932
1R-à-Pinene	0.4	937
Isopulegyl acetate	1.9	941
p-mentha-1,4-diene	0.3	954
Squalene	1.6	960
Terpinene	0.3	970
Phorbol	0.9	974
terpinyl formate	10.4	984
Camphidine	1.3	987
p-menth-4-en-3-one	2.8	1004
isogeraniol	7.2	1012
Pulegone	1.0	1014
Humulene	0.8	1016
á-Guaiene	0.3	1024
citronellyl tiglate	6.4	1027
Pulegone	4.8	1033
Geraniol	8.7	1036
Caryophyllene	3.0	1063
A-terpenyl ester	0.3	1073
Eudesma-4,11-diene	0.4	1075
Longifolene	3.9	1086
Himachala-2,4-diene	1.6	1089
Himachala-3(12),4-diene	1.4	1093
Isoledene	0.6	1094
Di-epi-à-cedrene	0.5	1096
Patchoulene	1.7	1199
Muuralene	0.92	1100
A-santol acetate	0.2	1102
A-cedrene oxide	5.3	1102
Thymol	7.0	1108
Cubenol	0.5	1111
Ç-Himachalene	0.3	1113
Neoisolongifolene,8-bromo	3.2	1115
Calarene epoxide	4.0	1118
Caryophyllene oxide	0.5	1121



Egiglobulol	0.9	1122
Spathulenol	0.9	1125
Farnesyl bromide	1.2	1128
Calarene epoxide	0.4	1132
Ledene oxide	0.5	1134
A-terpenyl ester	0.3	1073
Eudesma-4,11-diene	0.4	1075
Longifolene	3.9	1086
Himachala-2,4-diene	1.6	1089
Himachala-3(12),4-diene	1.4	1093
Isolatedene	0.6	1094
Di-epi-à-cedrene	0.5	1096
Patchoulene	1.7	1099
Muuralene	0.9	1100
A-santol acetate	2.0	1102

Abbreviations: Retention index (RI); Area (%).

The chemical compositions and yields of essential oils from leaves of *Thymus citriodorus* reported in Table 1. The Essential oils of this genus from Morocco, which has not been investigated before, were yellow in color and were obtained in a yield of 1% (v/w), on dry weight basis. KIZIL et al. reported that the essential oil of *Thymus citriodorus* in turkey was 0.9%.²⁷ In other studies, Bagdat et al. indicated that the yield of essential oil from *T. x citriodorus* was identified between 1.30 and 1.43%.²⁸

The GC-MS analyses led to the identification of Forty three compounds constituting 95.4% of the total essential oils of *T.citriodorus*. Table 1 depicts the identified compounds and their percentages as well as their RI values. The major constituents identified were terpinyl formate (10.4%), geraniol (8.7%), isogeraniol (7.2%), cubenol (7%), citronellyl tiglate (6.4%), Thymol (5.3%) pulegone (4.8%) and Caryophyllene oxide (4%). A different composition of essential oil of China *T. citriodorus* in which the main components were borneol (28.82%), thymol (14.43%), 3, 7-dimethyl-1, 6-octadiene-3-ol (8.26%), 1-methyl-4-[alpha-hydroxy-isopropyl] cyclohexene (8.23%) and terpenes camphor (5.1%)²⁹ and to the essential oils of Turkey *T. citriodorus* in which the major constituents were *trans* geraniol (30.07%), *trans*-citral (15.06%), *cis*-citral (11.71%), and *cis*- geraniol (7.65%).²⁷ However, the main constituents of the essential oil of *Thymus citriodorus* from Iran were geraniol (54.4%), geraniol (13.9%), neral (10.1%), nerol (5.2%), 3-octanone (3.3%) and borneol (3.2%).³⁰ Stahl-Biskup and Holthuijzen indicated previously for the same species that geraniol was the main compound (more than 60%), geranyl acetate (1.0%), geranyl butyrate (0.8%), nerol (2.8%), and citronellol (0.3%).³¹ Bagdat et al. also founded that the main component of *Thymus citriodorus* essential oil was geraniol (from twenty-one constituents).²⁸

The differences between the results of our study and those of other studies highlight the impact that geographical and ecological factors can have on the qualitative and quantitative characteristics of the essential oils produced. In addition, other factors, such as the developmental stage of the plant and growing conditions, can influence the essential oil composition³² and that geraniol can be characterize the Essential Oils of *Thymus citriodorus*.^{30, 31}

Antimicrobial activity

Table 2: Antimicrobial activity of *Thymus citriodorus* essential oils using disc diffusion assay.

Bacterial species	Inhibition zone (mm)	
	Essential oils (15µl/disc)	Antibiotic standards
<i>Escherichia coli</i>	32±0.76	40(IMP), 0(AMP), 15(CT),15(K)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16±0.57	34(IMP), 0(AMP), 12(CT),10(K)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10±0.5	16(IMP), 0(AMP) , 10(CT),18(K)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12±0.8	44(IMP), 0(AMP), 0(CT),8(K)
<i>Citrobacter sp</i>	28±0.86	35(IMP), 0(AMP) 15(CT),10(K)

Abbreviations Standard antibiotic disks: Imipenem IMP, Ampicillin AMP, Ceftriaxone CT, Kanamycin K.

The antibacterial activity of the essential oils of *T. citriodorus* was assayed in vitro following the diffusion in agar disc method using five bacteria strains *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumonia*; *Staphylococcus aureus* and *Citrobacter sp* responsible for nosocomial infections in Centre Hospital University of Fez Morocco. Table 2 shows the microbial growth inhibition achieved by the Eos assayed. As can be seen, strong activities were observed against *Escherichia coli* and *Citrobacter sp* with an inhibition zone of 32 and 28 mm respectively. Antibacterial activities were also observed against *Klebsiella pneumonia* (16 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm) and *Staphylococcus aureus* (10 mm). All strans were resistant to Ampicillin and sensible to Imipenem (Table 2). This later drug is typically used for the treatment of hospitalised patients with Nosocomial Infection in order to avoid bacterial resistance.

CONCLUSION

In this study, we report for the first time antimicrobial activity of essential oil of Moroccan *Thymus citriodorus*. Based on the results obtained, it is possible to conclude that the *Thymus citriodorus* essential oil has a stronger antibacterial activity than standard antibiotics used us controls such as Ampicillin and Ceftriaxone. The performance of the essential oil, on different strains bacterial, can lead to a thorough study and prospects for their application as a phytomedicine and food preservation agent.

REFERENCES

- Ghasemi PA, Barani M, Hamed B, Ataei KM, Karimi A. Environment effect on diversity in quality and quantity of essential oil of different wild populations of Kerman thyme. *Genetika*, 45, 2013, 441–450.
- Benabid A. Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité, Paris, 2015.
- Stahl-Biskup E, Saez F. Thyme. London: Taylor & Francis 2002.
- Zhang DY, Yao XH, Duan MH, Wei FY, Wu GH, Li L. China. *Industrial Crops and Products*, 77, 2015, 772–779.
- Costa P, Medronho B, Gonçalves S, Romano A. *Industrial Crops and Products*, 70, 2015, 341–346.
- Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor JA, Jordan MJ. *Food control* 19, 2008 681-687.
- Gianni S, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M and Bruni R, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food Chemistry*, 91 (4), 2005, 621–632.
- Pinto E, PinaVaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. *Journal of medical microbiology*, 55, 2006, 1367-1373.
- SariKurkcü C, Sabih Ozer M, Eskici M, Tepe B, Can S., Mete E. *Food and chemical toxicology*, 48, 2010, 1801- 1805.
- Pereira OR, Macias RIR, Perez MJ, Marin JGG, Cardoso SM . Protective effects of phenolic constituents from *Cytisus multiflorus*, *Lamium album* L. and *Thymus citriodorus* on liver cells. *Journal of functional foods*, 5, 2013, 1170-1179.
- S. Wu, FX. Wei, HZ. Li, XG. Liu, JH. Zhang, JX. Liu, Chemical composition of essential oil from *Thymus citriodorus* and its toxic effect on liver cancer cells, *Zhong Yao Cai*. 36(5), 2013,756-9
- Ormancey X, Sisalli S, Coutiere P. Formulation of essential oils in functional perfumery. *Parfums, Cosmétiques, Actualites*, 157, 2001, 30–40.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 2004, 223– 253.
- Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flav Frag J*, 27, 2012, 13-39.
- Pirbalouti AG, Mirbagheri H, Hamed B, Rahimi R. Antibacterial activity of the essential oils of myrtle leaves against *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 2014, 5505-509.
- Bauer K, Garbe D, Surburg H. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, 2001, 293.
- El Bouzidi L, Jamali Alaoui C, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmuth H, Leach D, Abbad A. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Ind. Crops Prod*, 43, 2013, 450–456.
- Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM, Hassani L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection-bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 2012, 464–471.
- Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine* 17, 2010, 1057–1060.
- Hudaib M, Aburjai T. Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour Frag. J.* 22, 2007, 322–327.
- Maisonneuve SA. *European pharmacopoeia*. Sainte-Ruffine: Council of Europe; 3, 1975, 68.
- Joulain D, König WA. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E. B. Verlag Hamburg, Hamburg. 1998.
- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2001, 455.
- Vuddhakul V, Bhoopong P, Hayeebilana F. Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiology*, 24, 2007, 413–418.
- Mharti FZ, Lyoussi B, Abdellaoui A. Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* Used in Moroccan Folkloric Medicine. *Natural product communications*, 6, 2011, 1505-1506.
- Jallal Z, ELAtki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. Growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical biomedicine*, 5(6), 2015, 458–461.
- Kizil S, Toncer O. Determination of essential oil and microelement composition *Thymus citriodorus* and *Lippia citriodora*. 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-MESMAP, Cyprus (Abstract), 2013.
- Bagdat RB, İpek A, Arslan N. Yield and quality parameters of *Thymus × citriodorus* (Pers.) Schreb. (synonym *T. fragrantissimus*, *T. serpyllum citratus* and *T. serpyllum citriodorum*) cultivated under Ankara ecological conditions. *Planta Medica Proceeding Book*, 2011, 1298, Antalya, Turkey.
- Wu S, Wei FX, Li HZ, Liu XG, Zhang JH, Liu JX. Chemical composition of essential oil from *Thymus citriodorus* and its toxic effect on liver cancer cells, *Journal of Chinese Medicinal Materials*. 36 (5), 2013, 756-9.
- Omidbaigi R, Sefidkon F, Hejazi M. Essential oil composition of *Thymus citriodorus* L. cultivated in Iran. *Flavour and fragrance journal*, 20(2), 2005, 237-238.
- Stahl BE, Holthuijzen J. Essential oil and glycosidically bound volatiles of lemon scented thyme, *Thymus × citriodorus* (Pers.) Schreb. *Flavour and Fragrance Journal*, 10 (3), 1995, 225–229.
- Argyropoulou C, Daferera D, Tarantilis PA, Fasseas C, Polissiou M. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochem Syst Ecol*, 35(12), 2007, 831-837.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, (2005), 621–632.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.



Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Various Extracts of *Thymus Riatarum* from Morocco

Aouam I^{1*}, El atki Y¹, Taroq A¹, El kamari F¹, Lyoussi B¹, Abdellaoui A¹.

^(a)Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco

Abstract

Thymus riatarum (Family Lamiaceae) is endemic Moroccan species used at numerous medicinal and culinary effects. The objective of the current study is to determine, for the first time, antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic content of four extracts (water, methanol, ethanol, and ethyl acetate) of *Thymus riatarum* aerial parts from Morocco. The antioxidant properties were evaluated in vitro using five separate methods, inhibition of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), measurement of total antioxidant capacity, ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assays, Total phenolic, and total flavonoid contents. The ethanol extract was able to reduce the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) with an IC₅₀ value equal to 0.11±0.016 mg/ml and showed an important total antioxidant, which was probably due to its high polyphenols content (328.5±3.216 mg GAE/g DW). The reducing power of water extract was found superior than those of synthetic antioxidants (0.150±0.013 mg/ml). However, flavonoids were determined at the highest level in ethyl acetate extract. These findings suggest that *Thymus riatarum* may be a new potential source as a natural antioxidant and recommended for further food applications.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH, Flavonoids contents, FRAP, *Thymus riatarum*, Total phenolic content.

INTRODUCTION

Various plants have used as both traditional medicine and food throughout the world. Therefore, investigation of natural antioxidant has been a major research interest for the past two decades as many studies interest institutions have been screening plant materials for possible antioxidant properties [1].

Oxidative stress is important from a biomedical point of view because it caused a variety of human chronic diseases, such as diabetes, allergies, cardiovascular, neurodegenerative and inflammatory diseases.

The Mediterranean region can be described as the center of the genus *Thymus* (family Lamiaceae) [2]. This genus is represented in Morocco by twenty one species, twelve are endemic [3]. Some of these species have been used for their preservative and medicinal properties [2] and have been added to foods (condiment and spice) [4] their oil and extracts has found applications in cosmetic, such us toothpastes, and deodorants [5]. It is reported in the previous research that *Thymus* species have strong antibacterial [6], antioxidant [7], antifungal [8, 9] antispasmodic carminative [10], diuretic effects [11] and antiviral activities [2]. In the present paper, we report the results of a study aimed to evaluate the antioxidant activities of methanol, ethanol, aqueous and ethyl acetate extracts of *Thymus riatarum*. These activities were determined by using five in vitro assays: inhibition of free radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), measurement of total antioxidant capacity, ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assays, Total phenolic, and flavonoid. To the best of our knowledge, the antioxidant activities of *Thymus riatarum* extracts have not been carried out.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and standards

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), Butylated hydroxytoluene (BHT), aluminum chloride (AlCl₃), sodium phosphate, ammonium molybdate, iron III chloride (FeCl₃), potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆), sodium nitrite (NaNO₂), ascorbic acid, gallic acid and Folin-Ciocalteu were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium carbonate (Na₂CO₃) was purchased from Prolabo (Paris, France). All the other chemicals and solvents used were of analytical grade.

Plant materials

Aerial parts of *Thymus riatarum* were collected in January 2016 in a winery located in hills in the region of Taza, 100 km from Fez city, Morocco. They were identified by Professor Amina Bari, botanist (Department of Biological Sciences, Faculty of Science,

Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez (Morocco). The plant material was dried for 7 to 10 days in the shade, and then stored in cloth bags at 5°C until extraction.

Preparation of extracts

Plant material was powdered (5g) and extracted with 100 ml of solvent (water, methanol, ethanol, and ethyl acetate) for 8 h using a Soxhlet extractor. Afterwards, all the resulting extracts were filtered and evaporated under reduced pressure at 40°C using rotary evaporator. The obtained extracts were kept in sterile sample tubes and stored in a refrigerator at 4°C.

Statistical analysis

Means of triplicate analysis were calculated and data was expressed as mean ± SD. One-way ANOVA statistical analysis followed by Tuckey-test was performed using the GraphPad Prism 5 (Microsoft Software) for comparison between the extracts. A difference was considered to be statistically significant when P < 0.05.

Total phenolic content

Total phenolic content of the extract was determined by Folin-Ciocalteu method [12]. The 0.5 ml of a known dilution of the extract and 2 ml of 7% sodium carbonate solution was added to 2.5 ml of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2H of reaction at room temperature in the dark. Gallic acid was used as standard for the construction of calibration curve. Total phenols contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram powder (mg GAE/g DW).

Total flavonoids contents

Total flavonoids contents of extracts were measured by the aluminium chloride colorimetric assay [13]. 1 ml of sample or rutin standard solution was added into a 10 ml volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5% NaNO₂ was added, after five minutes 0.3 ml 10 % AlCl₃ was added to react for six min. After that, 2 ml NaOH was added and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as standard for the construction of calibration curve. Total flavonoids contents were expressed as mg rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW). All samples were analyzed in triplicate.

Antioxidant activity

DPPH radical scavenging activity

The DPPH method was introduced 50 years ago by Blois [14]. The ability extracts to scavenge the DPPH radical was measured

using the method by Wu et al. [15]. 0.1 ml of various concentrations of extracts or standard was added to 1.5 ml of ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in dark. The percentage inhibition was calculated by the following equation:

$$I (\%) = (1 - (A_s / A_0)) * 100$$

Where A₀ is the absorbance of the negative control, and A_s is the absorbance of the sample. BHT served as positive control. The IC₅₀ values were calculated as the concentration of causing a 50 % inhibition of DPPH radical.

Reducing power capacity

The reducing capacity of the tested extract was determined in accordance with the procedure of Oyaizu [16]. 100 µl of extract was mixed with 500 µl of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 500 µl of potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] 1%. The obtained solution was incubated at 50 °C for 20 min. The mixture was acidified with 500 µl of Trichloroacetic (TCA) 10 % which was then centrifuged at 3000rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500 µl of distilled water and 100 µl of FeCl₃ (0.1 %), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercitine was used as standard. The results were expressed as IC₅₀ (mg/ml). IC₅₀ (concentration corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

Total antioxidant capacity

The assay was based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) and subsequent formation of a green phosphate/Mo (V) complex in acid pH [17]. A total volume of 25 µl oils dissolved in ethanol was added to 1 ml of reagent solution (0.6 mol/l sulphuric acid, 28 mmol/l sodium phosphate and 4 mmol/l ammonium molybdate). The mixtures were incubated at 95 °C for 90 min then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 695 nm (Jasco v-530). The total antioxidant activity was expressed as the number of equivalence of ascorbic acid (mg AAE/g DW).

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic (TPC) and total flavonoids (TF) contents

Table 1: Total phenolic and flavonoid contents of extracts from *T.riatarum*

Type of extracts	Total phenolic content (mg GAE/g DW)	Total flavonoid content (mg RE/g DW)
Ethanolic	328.5±3.216 ^a	212.3±1.528 ^b
Methanolic	291.2±1.767 ^b	192±1.732 ^c
Ethyl acetate	3.850±0.196 ^d	349.7±1.155 ^a
Aqueous	170.9±1.863 ^c	13.78±0.347 ^d

All the results were expressed as mean ± SD of three different trials. a – d Column wise values with same superscripts of this type indicate no significant difference (P<0.05). In each line, values followed by different letters are significantly different (P < 0.05).

Phenolic compounds are considered to be the major contributors to the antioxidant capacity of plants. Among the four extracts of *Thymus riatarum* (Table 1), the ethanol significantly demonstrated the highest phenolic content (328.25 ± 3.216 mg GAE/g DW), followed by methanol (291.2 ± 1.767 mg GAE/g DW), water (170.9 ± 1.863 mg GAE/g DW) and ethyl acetate value of (3.850 ± 0.196 mg GAE/g DW).

The total flavonoid contents significantly varied among the studied extracts (Table 1). The uppermost amounts were observed for ethyl acetate (349.7 ± 1.155 mg QE/g DW). Whereas minimum one was noticed for water (13.78±0.347 mg QE/g DW). This level of total phenols was found to be higher than the values reported in the literature for *Thymus* species such as *T. spathulifolius* (141 mg GAE/g of a methanol extract, obtained by

Sokmen et al. [18], *T. serpyllum* (113 mg/g of an ethanol extract, reported by Mata et al. [19], *T. vulgaris* harvested in Iran (5.82±0.42 mg gallic acid (GAE)/g) reported by [20], *Thymus caramanicus* (124.30 mg GAE/g) reported by Safaei-Ghomi et al. [21], *T. saturoioides* collected from Morocco (48.43 mg eqAG/g) reported by [22] and in Italy, *T. vulgaris* (165.1 mg GAE/g) reported by Mancini et al. [23]. While *T.capitatus* showed a total flavonoid content value of (10.62±0.24 mg QE/g DW) [24]. Baharfar et al. [25] recorded that the flavonoid contents value of *T. kotschyanus* ranged from 32.04–74.60 mg QE/g DW. Other research demonstrated that the aqueous extract of *T. saturoioides*, *T. atlanticus*, and *T. zygis* had a greater flavonoid contents (182.79 ± 3.23 mg QE/g DW) (155.11 ± 3.90 mg QE/g DW) and (208.13 ± 4.20 mg QE/g DW) respectively [35]. This difference in results depends on the type of solvent and the methods of extractions [26]. Previous studies have shown that the amount of phenol compounds in plants depend also on biological factors and environmental conditions (temperature, water stress and salinity). In other hand, a recent research by Pereira and Cardoso [27] summarized the polyphenolic compositions of various *Thymus* species. In addition, various experimental investigations have shown that many secondary metabolites such as polyphenol compounds extracted from medicinal and aromatic plants had a high antioxidant activity due to their hydroxyl groups and protected more efficiently against many diseases caused by free radical [28].

DPPH radical scavenging activity

Table 1: DPPH radical scavenging activity and ferric reducing power capacity of different extracts from *Thymus riatarum*.

Type of extracts	DPPH (mg/ml)	FRAP (mg/ml)
Ethanolic	0.110±0.016 ^c	0.312±0.017 ^b
Methanolic	0.085±0.010 ^c	0.179±0.013 ^c
Ethyl acetate	0.766±0.028 ^b	0.639±0.053 ^a
Aqueous	1.079±0.016 ^a	0.150±0.013 ^c
BHT	0.119±0.002 ^c	-
Quercitine	-	0.03±0.006 ^d

Data are reported as mean values ± SD of three measurements. Means were significantly different when P<0.05; values followed by different letters are significantly different.

Table 2 depicts DPPH radical scavenging activities of extracts of *Thymus riatarum*. The lowest IC₅₀ values indicated the highest free radical scavenging activity of the extract. As shown in Table 2, all extracts obtained from *Thymus riatarum* showed antioxidant activity in this assay with an IC₅₀ ranged from 0.085 to 1.079 mg /ml for methanol and aqueous extracts, respectively. The IC₅₀ value of methanolic (0.085 ± 0.010 mg/ml) and ethanolic extracts (0.110 ± 0.016 mg/ml), were significantly similar to that BHT, positive control, (0.119 ± 0.002 mg/ml). This antioxidant propriety may be attributed to the presence of certain compounds in our extracts with hydrogen donating ability. The methanolic extract of *T.riatarum* showed higher activity than that founded by Ben El Hadj Ali [29] (IC₅₀ = 0.011 mg/ml) and lower than the IC₅₀ value of *Thymus caramanicus* reported by Safaei-Ghomi [21] (IC₅₀ = 0.043 mg/ml). In addition, previous research attested an important antioxidant activity of various extracts from *Thymus* species such as *T. praecox* [30] and *T. vulgaris* [31].

Ferric reducing capacity

The ferric reducing power assay does not involve free radicals, but involves reduction of the ferricyanide to ferrocyanide, by the reducing agent [17]. This capacity is compared to that of quercetin. The results (Table 2) showed a range for FRAP

antioxidant capacity from 0.150 ± 0.013 to 0.639 ± 0.053 mg/ml. The aqueous extract significantly contained the highest ferric reducing power (0.150 ± 0.013 mg/ml) than the other extracts. This strong ferric reducing power of *T. riatarum* extracts demonstrate the good hydrogen and/or electron donor abilities of these extracts which probably owed to their antioxidant propriety. Previous studies had indicated that the Thymus species possessed the most effective capacity for ferric reducing power [32- 34].

Total antioxidant capacity

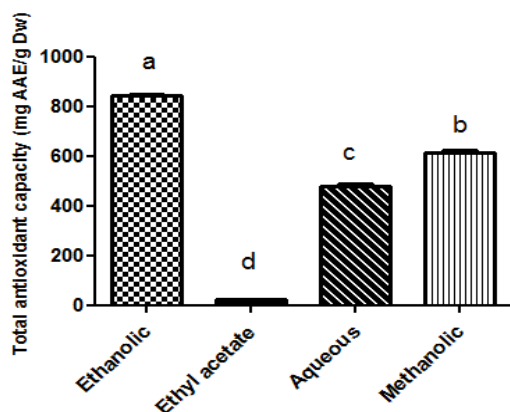


Figure 1: Total antioxidant capacity of different extracts from *Thymus riatarum*. Each value represents means \pm SD (n=3). Different letters are significantly different (P < 0.05)

The total antioxidant propriety was evaluated by the formation of phosphomolybdenum complexes. This assay is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the extract; the reaction of this method is accompanied by the appearance of a green color. The results of the studied extracts were expressed as ascorbic acid equivalents (mg AAE/g DW) (Figure 1). The ethanol significantly revealed the highest total antioxidant capacity (845.7 ± 4.619 mg AAE/g DW) followed by methanol (615.3 ± 16.80 mg AAE/g DW), then water (479 ± 6.928 mg AAE/g DW) and ethyl acetate (22.67 ± 0.5777 mg AAE/g DW). Previous published papers demonstrated that extracts of Thymus spices have strong ability to act as antioxidant [29,34,35]. In another study, they evaluated the ability of *T. vulgaris* oil to protect the laboratory animals from the toxic effects of AFs [36].

CONCLUSION

The present study is the first characterization of the antioxidant capacities of *Thymus riatarum* extracts. All investigated extracts showed remarkable antioxidant potential and important phenolic and flavonoid contents of this Moroccan thymus. Thus, the present study suggests this plant can be a source of natural antioxidants. It may be used in many fields, such as cosmetics, pharmaceutical fields and natural food preservatives, which is very well justified by the present work.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest related with this manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors offer their sincere thanks the Regional Center of Interface, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fez, Morocco, for providing the GC/MS.

REFERENCES

- [1] Sokmen A, Gurel E, M. Babaoglu, E. Gurel, and S. Ozcan. Bitki Bioteknolojisi "Plant biotechnology" (Eds.), *Sekonder Metabolit Uretimi (Secondary metabolite production)*. Selcuk University Press, Konya, 2001, 211–261.
- [2] Stahl-Biskup E & Saez F. *Thyme*. London: Taylor & Francis 2002.
- [3] Benabid A. *Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité*, Paris. 2015.
- [4] Zhang DY, Yao XH, Duan MH, Wei FY, Wu GH, Li L. Variation of essential oil content and antioxidant activity of Lonicera species in different sites of China. *Ind. Crops Prod.*, 2015, 77, 772–779
- [5] Costae P, Medronho B, Gonçalves S, Romano A. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. *Ind. Crops Prod.*, 2015, 70, 341–346.
- [6] Rota MC, Herrera A, Martinez RM, Sotomayor JA, Jordan M. Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. *J. Food control*. 2008, 19, 681-687.
- [7] SariKurkcu C, Sabih Ozer M, Eskici M, Tepe B, Can S, Mete E . Essential oil composition and antioxidant activity of Thymus longicaulis C. Presl subsp. longicaulis var. longicaulis. *Food and chem. toxicol*. 2010, 48, 1801-1805.
- [8] Goncalves MJ, Cruz MT, Cavaleiro C , Lopes MC , Saguaro L. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of Thymus zygis subsp. sylvestris. *Ind. Crops Prod*. 2010, 32, 70-75.
- [9] Pinto E, PinaVaz C, Salguaro L., Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S , Cavaleiro C, Palmeira A , Rodrigues A , Martinez-de-Oliveira. Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. *J. medic microbiology*. 2006, 55, 1367-1373.
- [10] Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of Thymus algeriensis Boiss. et Reut. *Int. J. Aromather*. 2006, 16, 95–100
- [11] Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food Chem*. 2009, 116, 714–721.
- [12] Slinkard K, Singleton V, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult*. 1977, 28, 49–55.
- [13] Zhishen J, Mengcheng.T, and Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chem*. 1999, 64, 555-59.
- [14] Blois MS, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958, 181, 1199-1200.
- [15] Wu C, Chen HM, & Shiou CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). *Food research internat*. 2003, 36, 949-957
- [16] Oyaizu M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. *Jpn. J. Nut*. 1986, 44, 307-315
- [17] Pierto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex; specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*. 1999, 269, 337-341
- [18] Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*. 2004, 15(8), 627–634.
- [19] Mata AT, Proenca C, Ferreira AR, Serralheiro MLN, Nogueira JMF, Araujo MEM. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem*. 2007, 103(3), 778–786.
- [20] Eghdami A, Eizadi M, Sadeghi F. Polyphenolic content and antioxidant activity of hydroalcoholic and alcoholic extract of Thymus vulgaris. *J Bio Env Sci (JBES)*. 2013, 94-101
- [21] Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of Thymus caramanicus Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chem*. 2009, 115, 1524–1528.
- [22] Fadili K, Amalich S, Dedianhoua KN, Bouachrine M, Mahjoubi M, EL Hilali F, Zair T. Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: Rosmarinus officinalis and Thymus satuireioides. *Int J Inno Sci Res*. 2015, 17(1), 24-33.

- [23] Mancini E, Senatore F, Del Monte D, De Martino L, Grulova D, Scognamiglio M, Snoussi M, De Feo V. Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules*. 2015, 20(7), 12016-12028.
- [24] Jabri-Karoui I, Bettaieb I, Msaada K, Hammami M, & Marzouk. Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. *J.Funct Foods*. 2012, 4, 661–669
- [25] Baharfar R, Azimi R, & Mohseni M. Antioxidant and antibacterial activity of flavonoid-, polyphenol- and anthocyanin-rich extracts from *Thymus kotschyanus* boiss & hohen aerial parts. *J. Food Sc Tech*. 2015, 52, 6777–6783.
- [26] Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdely C., Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*. 2008, 331, 865–873.
- [27] Pereira OR, Cardoso SM, *Curr. Anal. Chem*. 2013, 9, 382–396.
- [28] Vaya J, Mahmood S, Goldblum A, Aviram M, Volkova N, Shaalan A, et al. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Photochemistry*. 2003, 62, 89-99.
- [29] Ben El Hadj Ali I, Bahri R, Chaouachi M, Boussaïda M, Harzallah-Skhiri F. Phenolic content, antioxidant and allelopathic activities of various extracts of *Thymus numidicus* Poir. organs. *Ind. Crops Prod*. 2014, 62, 188–195
- [30] Ozen T, Demirta I, Aksit. H. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*. 2011, 124, 58–64.
- [31] Roby MHH, Sarhana MA, Selima KAH, Khalel KI. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod*. 2013, 43, 827–831.
- [32] Habashya HN, Abu Serieb MM, Attia WE, Abdelgaleilc SAM. Chemical characterization, antioxidant and anti-inflammatory properties of Greek *Thymus vulgaris* extracts and their possible synergism with Egyptian *Chlorella vulgaris*. *Journal of Functional Foods*. 2018, 40, 317–328
- [33] Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chem*. 2017, 220, 153–161
- [34] Khouya T, Ramchoun M, Hmidani A, Amrani S, Harnafi H, Benlyas M, Filali Zegzouti Y, Alem C. Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, 636-644.
- [35] Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Antioxidative activity of the essential oils of *thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *J. Food Eng*. 2005, 66, 447–454.
- [36] El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hathout AS, Hassan NS, Aly SE, Abdel-Wahhab MA, Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats, *Toxicol*. 2011, 57, 984–991.