

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Structure de Recherche : Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines

Discipline : Biologie

Spécialité : Biochimie-Pharmacologie-Pathologies Humaines-Santé

Présentée et soutenue le : 04/05/2018 par :

Abdelhakim BOUYAHYA

Le titre de la thèse

Etude ethnopharmacologique, caractérisation phytochimique et évaluation des propriétés antiproliférative, antioxydante, antibactérienne et antiparasitaire des plantes médicinales du Nord-Ouest du Maroc

JURY

Mr Youssef BAKRI	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Président
Mr Abdelaziz BENJOUAD	PES	Vice-Président, Université Internationale, Rebat	Examineur
Mr M'hammed ANEB	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Mr Mostafa EL GHOU	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Mr Moulay El Abbes FAOUZI	PES	Faculté de Médecine et Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat	Examineur
Mme Nadia DAKKA	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Directeur
Mr Jamal ABRINI	PES	Faculté des Sciences, Tétouan, Université Abdelmalek Essaadi, Tetouan	Co-directeur
Mme Naima IBA	PES	Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat	Rapporteur
Mr Abdennebi ELHASSANE	PES	Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat	Rapporteur

Année Universitaire : 2017/2018

DEDICACES

A la mémoire de mes grands parents

Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble et de vous exprimer tout mon respect. Puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa miséricorde et vous accueillir dans son vaste paradis...

A mes Chers Parents: Saïd et Fatíma

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Vos prières et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes Adorables Frères et Sœurs

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils et les douces paroles. Vos affection et vos soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts. Merci pour votre amour sans limite, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A ma grande famille

Mes tantes, Mes oncles ainsi que mes cousins et cousines. Je vous dédie cette thèse en témoignage de gratitude d'estime et d'attachement. Puisse dieu vous accorder santé, longue vie et prospérité.

A mes AMIS

En souvenir des moments merveilleux que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent. Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements, votre aide. J'ai trouvé en vous le refuge de mes chagrins et mes secrets. Avec toute mon affection et estime, je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie professionnelle que privée. Je prie Dieu pour que notre amitié et fraternité soient éternelles.

Avant propos

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Biochimie-Immunologie (Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines) au département de biologie de la Faculté des Sciences de Rabat, sous l'encadrement de Pr. Nadia DAKKA. Une partie de ce travail a été réalisée grâce à une collaboration fructueuse avec le Laboratoire de Biologie et Santé au département de Biologie à la Faculté des Sciences de Tétouan, Université Abdelmalek Essaadi sous l'encadrement de Pr. Jamal ABRINI. Le travail a été soutenu par le centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST).

*La première personne à qui je souhaite adresser mes chaleureux remerciements, Madame le Professeur **Nadia DAKKA**, Professeur d'Enseignement Supérieur et directrice du laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines, département de Biologie à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat (UM5/FSR) et Directrice de ma thèse pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour toute l'attention et la disponibilité dont elle a fait preuve durant ces années d'initiation à la recherche scientifique, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche malgré ses diverses préoccupations. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié le fait de me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. La confiance qu'elle m'a accordée ainsi que sa disponibilité, sa patience, son ouverture et sa bienveillance m'ont permis de progresser dans ce travail. Veuillez trouver Madame dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.*

*J'adresse également mes vifs remerciements à mon co-encadrant de thèse, Monsieur le Professeur **Jamal ABRINI**, Professeur de l'Enseignement Supérieur et directeur du Laboratoire de Biologie et Santé à la Faculté des*

Sciences de Tétouan, Université Abdelmalek Essaadi, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Votre collaboration et votre apport scientifique m'ont beaucoup aidé à la réalisation de ce travail. Je ne saurais jamais vous exprimer mes sincères remerciements d'avoir accepté d'évaluer et de juger ce travail, malgré vos occupations et vos programmes chargés. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

*A Monsieur le Professeur **Youssef BAKRI**, Professeur d'Enseignement Supérieure et Chef de Département de Biologie à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat (UM5/FSR). Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ma thèse mais aussi et surtout pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour votre rigueur, vos compétences scientifiques, votre soutien, votre aide précieuse, votre temps que vous avez m'accordé, votre générosité et votre extrême gentillesse étaient pour moi un très grand support pour la réalisation de ce travail. C'est grâce à vos suggestions, vos remarques et vos critiques constructives que ce travail a pu être effectué et sans votre présence, ce travail ne pourra avoir lieu. D'ailleurs c'est grâce à vos visions scientifiques décisives que plusieurs orientations et collaborations ont été rajoutées pour enrichir bien ce travail, ainsi vos approches méthodologiques et fondamentales majeures ont participé de manière irréfutable à la réalisation de ces travaux expérimentaux et la rédaction des articles et des revues scientifiques de qualité. Veuillez trouver Monsieur dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.*

*A Monsieur le Professeur **Abdelaziz BENJOUAD**, vice-président à la Recherche et Développement à l'université internationale et ancien Professeur d'Enseignement Supérieure à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat (UM5/FSR) professeur à la faculté des sciences de Rabat. Je suis particulièrement honorée de votre participation à ce jury de*

soutenance et d'avoir accepté aimablement de juger cette thèse en qualité d'examinateur. Veuillez trouver Monsieur dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

Je remercie profondément Madame la Professeur **Naïma IBA**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat (UM5/FSR), de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur et examinatrice de ce travail. Vous avez accepté de prendre de votre temps pour juger cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma très sincère considération.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur **M'hammed ANEB**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à la Faculté des Sciences de Rabat (UM5/FSR), pour la bienveillante attention qu'il a accordé à ce travail et pour la participation à ce jury. Veuillez trouver Monsieur dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect

Je remercie profondément Monsieur le Professeur **Mostafa EL GHOU**, Professeur d'Enseignement Supérieure à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V de Rabat (UM5/FSR), Qui me fait l'honneur d'avoir accepté de porter son jugement hautement qualifié sur mon travail. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma plus grande estime d'avoir accepté de siéger parmi le jury.

Ma reconnaissance est adressée également à Monsieur le Professeur **Moulay EL abbes FAOUZI**, Professeur d'Enseignement Supérieure à la faculté de Médecine, Université Mohammed V de Rabat (UM5/ FMP), de Rabat, d'avoir aimablement accepté d'évaluer ce travail et aussi de faire partie de mon jury de thèse. Veuillez trouver Monsieur dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

Mes sincères remerciements et profond gratitude sont adressés à Monsieur le Professeur **Abdennebi EL HASSANE**, Professeur de l'Enseignement Supérieur à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, Département de Biologie et Sciences pharmaceutiques de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur et membre de jury. Veuillez trouver

Monsieur dans ces mots l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements aux Professeurs **Ahmed TALBAOUI** et **Adnane EL HAMIDI** pour leurs aides précieuses et pour leurs extrêmes gentillesse.*

*Je remercie amplement le Professeur **Abdeslam ENNABILI** (FST de Fes) pour leur aide dans la partie botanique.*

*Et je n'oublierai surtout pas mon frère **Dr. Abdeslam ET-TOUYS** et **Dr. Hajiba FELLAH** pour leurs aides précieuses pour la réalisation de l'activité antiparasitaires.*

*Je remercie très sincèrement ma collègue **Asemian INES** Doctorante au Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines pour son aide à réaliser l'activité antiproliférative.*

*Je remercie vivement mon ami **Omar BELMEHDI** Doctorant au Laboratoire de Biologie et Santé pour son aide dans la partie l'extraction et pour l'étude de l'activité antioxydante.*

*Je remercie également mes collègues **Nadia BOUJIDA** et **SawlaJan CHARFI** Doctorantes au Laboratoire de Biologie et Santé pour son aide à réaliser l'activité antibactérienne.*

*Mes sincères remerciements sont adressés à mes collègues qui ont m'aidé dans la rédaction de ce manuscrit, je remercie plus particulièrement le Dr. **Ilame BOURAI**S et les Doctorantes **Fatima Ezzahrae GAOUGAOU** et **Mariem BENSAID**.*

Qu'il me soit aussi permis de remercier tous les enseignants du laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines pour leurs laides, leurs soutiens permanents et encouragement incessants.. Ainsi, les enseignants de la faculté des Sciences de Rabat qu'ils soient du département de Biologie et/ou de Chimie pour leurs collaborations scientifiques.

Qu'il me soit permis également de remercier tous les enseignants de la Faculté des Sciences de Tétouan qui ont participé à ma formation universitaire.

J'exprime mes sincères remerciements à tous mes collègues Doctorants: Aïcha, Mariam, Omar, Amina, Aya, Ibtissam, Houda et Youssra pour leurs aides précieuses et pour leurs extrêmes gentillesse.

Je ne peux pas vous citer tous, Etudiants - Chercheurs, Collègues et amis; je vous dois beaucoup, je ne l'oublie pas. A toutes et à tous, du fond du coeur, Merci. Pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments de reconnaissance.

RESUME

Pour se soigner, l'homme était dépendant de la nature et le sera pour toujours. Ainsi, les produits naturels extraits de plantes médicinales constituent une source essentielle des molécules bioactives. Le Maroc, par son climat original, est doté d'une flore riche et diversifiée qui n'est pas encore bien valorisée. Afin de contribuer à la valorisation phytochimique et pharmacologique de cette flore médicinale, le projet de thèse envisagé a pour objectifs l'étude ethnopharmacologique, la caractérisation phytochimique et l'évaluation des propriétés biologiques des plantes médicinales du Nord-Ouest du Maroc au niveau de la province d'Ouezzane. L'étude a révélé une remarquable diversité floristique dont 44 plantes sont utilisées traditionnellement pour le traitement de différentes pathologies. Parmi 44 plantes, 14 ont été sélectionnées, collectées et faites l'objet d'une étude phytopharmacologique. Les extraits ont révélé des teneurs importantes en polyphénols et en flavonoïdes, alors que les huiles essentielles sont très riches en terpénoïdes oxygéniques. Les produits extraits ont été testés pour leurs propriétés antiproliférative, antioxydante, antibactérienne et antiparasitaire. Nous avons montré une variabilité remarquable dans les résultats obtenus qui dépend de la composition chimique du produit testé, la méthode utilisée et aussi le système biologique étudié. L'huile essentielle d'*Origanum compactum* a montré la meilleure activité biologique, en particulier les effets antibactériens, ceci nous a conduit à déterminer leur mode d'action. Cette huile a affecté la perméabilité et l'intégrité membranaire des bactéries à Gram-, alors qu'elle a dérégulé le quorum sensing des bactéries à Gram+. Les résultats obtenus dans ce travail de thèse ont mis en évidence l'importance de l'approche écologique et ethnopharmacologique dans le criblage phytopharmacologique. Les huiles essentielles les plus actives pourraient être efficacement exploitées comme alternatives naturelles dans l'industrie agro-alimentaire. Les molécules actives pourraient être utilisées dans le domaine pharmaceutique et promouvoir des applications futures dans les thérapies anticancéreuse et anti-infectieuse.

Mots-clés : Plantes médicinales ; activité anticancéreuse ; activité antioxydante ; activité antibactérienne ; activité antileishmanienne ; Ouezzane.

ABSTRACT

To heal himself, man was dependent on nature and will be forever. Thus, natural products extracted from medicinal plants are an essential source of bioactive molecules. Morocco, with its original climate, has a rich and diversified flora that is not enough well valued. In order to contribute to the phytochemical and pharmacological valorization of this medicinal flora, the aim of this proposed thesis is the ethnopharmacological study, phytochemical characterization and evaluation of the biological properties of medicinal plants of North-western Morocco at the province of Ouezzane. The study revealed a remarkable floristic diversity, which 44 plants, 14 were selected, collected and subjected to a phytopharmacological study. The extracts revealed important contents of polyphenols and flavonoids, while the essential oils are very rich in oxygenated terpenoids. The extracted products were tested for their antiproliferative, antioxidant, antibacterial and antiparasitic properties. We showed a remarkable viability in the obtained results which depends on the chemical composition of the product tested, the method used as well as the biological system studied. The essential oil of *Origanum compactum* showed the best biological activity, especially the antibacterial effects, this led us to determine their mode of action. This oil affected the permeability and the integrity of cell membrane of Gram-bacteria, while it deregulated the quorum sensing of Gram + bacteria. The results obtained in this thesis work have highlighted the importance of the ecological and ethnopharmacological approach in phytopharmacological screening. The most active essential oils could be effectively exploited as natural alternatives in the agro-food industry applications. The active molecules could be used in the pharmaceutical field and promote future uses applications in anticancer and anti-infectious therapies.

Key words: medicinal plants ; anticancer activity ; antioxidant activity ; antibacterial activity ; antileishmanial activity ; Ouezzane Province.

Production scientifique

Ce projet de recherche a été soutenu par le Centre National pour la recherche Scientifique et Technique (CNRST) qui m'a attribué la bourse d'excellence d'Édition 2015. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet des publications et communications présentées ci-dessous.

Articles de recherche

- Bouyahya A**, Bakri Y, Abrini J, Dakka N, 2018. *In vitro* antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines. *European Journal of Integrative Medicine*. 18, 23-29.
- Bouyahya A**, Dakka N, Talbaoui A, El Moussaoui N, Abrini J, Bakri Y, 2018. Phenolic contents and antiradical capacity of vegetable oil from *Pistacia lentiscus* (L). *Journal of Materials and Environmental Sciences*. 9 : 1518-1524.
- Bouyahya A**, Bakri Y, Belmehdi O, Et-Touys A, Abrini J, Dakka N, 2017. Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases*, 7: 433-439.
- Bouyahya A**, Abrini J, Et-Touys A, Bakri Y, Dakka N, 2017. Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 13: 9-25.
- Bouyahya A**, Et-Touys A, Dakka N, Fellah H, Abrini J, Bakri Y, 2017. Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco. *Beni-Suef Univ J Bas & Appl Sci*. 7, 50-54.
- Bouyahya A**, Et-Touys A, Bakri Y, Ahmed T, Fellah H, Abrini J, Dakka N, 2017. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis*, 111: 41-49.
- Bouyahya A**, Dakka N, Talbaoui A, Et-Touys A, El-Boury H, Abrini J, Bakri Y, 2017. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). *Industrial Crops & Products*, 108: 729-737.
- Bouyahya A**, Et-Touys A, Abrini J, Talbaoui A, Fellah H, Bakri Y, Dakka N. *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Biocatalysis and Agriculture Biotechnology*. 12: 179-184.
- Bouyahya A**, Abrini J, Talbaoui A, Et-Touys A, Chatoui K, Harhar H, Bakri Y, Dakka N, 2017. Phytochemical Screening, Antiradical and Antibacterial Activities of *Cistus crispus* from Morocco. *Journal of Materials and Environmental Sciences*. 8: 1560-1566.
- Bouyahya A**, Abrini J, Bakri Y, Dakka N, 2017. Phytochemical Screening and Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities of *Origanum compactum* Extracts. *Phytothérapie*, DOI: 10.1007/s10298-017-1101-8.
- Bouyahya A**, Abrini J, Et-Touys A, Lagrouh F, Dakka N, Bakri Y, 2017. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of Moroccan honey samples. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-017-1122-3.
- Bouyahya A**, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, El Yahyaoui El Idrissi A, Abrini J, Dakka N, 2017. *In vitro* Screening of Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Four Moroccan Medicinal Plants. *Microbiology Research Journal International*, 18: 1-10.

- Bouyahya A**, El Moussaoui, Abrini J, Bakri Y, Dakka N, 2016. Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *British Biotechnology Journal*, 14: 1-10.
- Bouyahya A**, Abrini J, El-Baabou A, Bakri Y, Dakka N, 2016. Determination of phenol content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from North-West of Morocco. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7: 107-111.
- Bouyahya A**, Abrini J, Khay EL, Charfi S, Boujida N, EL Harsal A, Talbaoui A, ET-Touys A, Bakri Y, Dakka N, 2016. *In vitro* Antibacterial of Organic Extracts from North-West Moroccan Medicinal Plant *Myrtus communis* (L.). *British Biotechnology Journal*. 16: 1-9.

Revues de synthèse

- Bouyahya A**, Et-Touys A, Khouchlaa A, El-Baabou A, Benjouad A, Amzazi S, Dakka N, Y. Bakri Y, 2018. Ethnobotanical and Phytopharmacological Notes on *Inula viscosa*. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-017-1176-2
- Bouyahya A**, Dakka Nadia, Et-Touys A, Abrini J, Bakri Y, 2017. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific J of Trop Med*. 10, 729-743.
- Bouyahya A**, Guaouguaou FE, Dakka N, Bakri Y, 2017. Pharmacological activities and medicinal properties of endemic Moroccan medicinal plant *Origanum compactum* (Benth) and their compounds. *Asian Pac J Trop Dis*. 7 : 628-640.
- Bouyahya A**, Bakri Y, Khay EO, Edaoudi F, Talbaoui A, Et-Touys A, Abrini J, Dakka N, 2017. Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: A review. *Asian Pacific J Trop Dis*, 7: 57-64.
- Bouyahya A**, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, Charfi S, Abrini J, Dakka N, 2017. Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-017-1118-z.
- Bouyahya A**, Abrini J, Bakri Y, Dakka N, 2016. Essential oils as anticancer agents: news on mode of action. *Phytothérapie*. 14: DOI: 10.1007/s10298-016-1058-z.
- Bouyahya A**, Bensaid M, Bakri Y, Dakka N, 2016. Phytochemistry and Ethnopharmacology of *Ficus carica*. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 14: 1-12.
- Bouyahya A**. 2016). Alicaments: des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé ? *Annales des sciences de la santé*, 1: 1-3.

Publications en collaboration

- Laghmouchi Y, Belmehdi O, **Bouyahya A**, Skali Senhaji N, Abrini J, 2017. Effect of temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum compactum*. *Biocatalysis and Agriculture Biotechnology*, 10:156-160.
- Et-Touys A, **Bouyahya A**, F. Fellah, M. Mniouil, El Boury H, Dakka N, Abderrahim Sadak A, Bakri Y. Antileishmanial activity of medicinal plants from Africa: A review. *Asian Pac J Trop Dis*, 7: 826-840.
- Khouchlaa A, El-Mehyaoui A, **Bouyahya A**, Tijane M, 2017. Determination of phenol content and evaluation of in vitro litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract. *Phytothérapie*: DOI 10.1007/s10298-017-1106-3.
- Aneb M, Talbaoui A, **Bouyahya A**, EL Boury H, Amzazi S, Benjouad A, Dakka N, Bakri Y, 2016. *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *European Journal Medicinal Plants*, 16:1-13.

- Et-Touys A, Fellah H, Mniouil M, **Bouyahya A**, Dakka N, Abdennebi EH, Sadak A, Bakri Y, 2016. Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. Extracts from Morocco. *British Microbiology Research Journal*, 16:1-10.
- Khay EO, **Bouyahya A**, El Issaoui K, Zinebi S, Abrini J, 2016. Study of Synergy between *Mentha pulegium* Essential Oil, Honey and Bacteriocin-like Inhibitory Substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant. Biol.* 3, 29-35.
- El Ouasif L, **Bouyahya A**, Zniber R, El Ghoul M, Achour R, Chakchak H, Talbaoui A, El Boury H, Dakka N, Bakri Y, 2017. Novel 2-mercaptobenzimidazole derivatives: synthesis and evaluation of its antibacterial and antioxidant activities. *Mediterranean Journal of Chemistry*. 6: 77-87.
- El Yahyaoui El Idrissi A, Khouchlaa A, **Bouyahya A**, Chebat A, Soulaymani Bencheikh R, Talbaoui A, Bakri Y, Tijane M, 2017. Risk of intoxication of the plants more used in herbal medicine in Morocco. *World Journal of Pharmaceutical sciences*, 6: 1463-1475.
- Khouchlaa A, **Bouyahya A**, Ait Lahcen S, Youssef B, Nadia D, Tijane M, 2017. Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *zizyphus lotus* l. extracts. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 6: 1354-1367.

Articles acceptées pour publication

- Bouyahya A**, Guaouguaou FE, Dakka N, Bakri Y, 2018. Quorum sensing : une nouvelle cible anti-infectieuse des plantes médicinales. *Phytothérapie*.
- Bouyahya A**, Lagrouh F, Dakka N, Y. Bakri Y, 2018. Anti-dermatophytes activity of *Origanum compactum* essential oil at three developmental stages. *Phytothérapie*.
- Bouyahya A**, Bakri Y, Lagrouh F, Abrini J, Dakka N, 2018. *In vitro* antiproliferative and antidermatophyte activities of essential oils from three Moroccan medicinal plants, (*Journal of Biologically Active Products from Nature*).
- Otaifah YN, **Bouyahya A**, Harhar H, Talbaoui A, El Hajjaji S, 2018. Chemical composition of Yemeni Medicinal Plants essentials oils and their Antibacterial and Antioxidant Activities. *Phytothérapie*.
- El Yahyaoui El Idrissi A, Talbaoui A, **Bouyahya A**, Khouchlaa A, Bakri Y, Salah D, Tijane M, 2018. Ethnobotanical study on the Bereztem Plant (*Aristolochia longa*) used in the treatment of some diseases in the cities of Rabat, Sale and Temara (Morocco). *Journal of Materials and Environmental Sciences*.
- Belmehdi O, Douhri B, **Bouyahya A**, Laghmouchi Y, Skali Senhaji N, Abrini J, 2018. Phenolic content, antibacterial and antioxidant activities of Moroccan propolis (*Current Bioactive Compound*).

Articles Under Reviewer/ en préparations

- Bouyahya A**, Dakka N, Abrini J, Bakri Y, 2017. Essential oils of *Origanum compactum* induce membrane permeability, disturb cell membrane and suppress quorum sensing phenotype in *Bacillus subtilis* 6633 and *Escherichia coli* K12.
- Et-touys A, Mohamed Abdelahi MM, **Bouyahya A**, Bourais I, El Alem MM, Fellah H, Essassi EM, Benchidmi M, Bakri Y, 2018. Antileishmanial activity of new series of 6-nitroindazole derivatives.
- Et-Touys A, **Bouyahya A**, Bourais I, Dakka N, Bakri Y, 2018. Study of *in vitro* antioxidant, antiproliferative and antimicrobial properties of *Salvia clandestina* from Morocco.

- Tachallait H, **Bouyahya A**, Talha A, Bakri Y, Dakka N, Demange L, Benhida R, Bougrin K, 2018. Synthesis and antibacterial evaluation of novel triacetate uridine derivatives 1,2,3-triazoles-1,4-disubstituted.
- Marmouzi I, **Bouyahya A**, Kharbach M, El Alaoui C, El Jemli M. Review of *Silybum marianum* Ethnopharmacology, Chemistry and Clinical Evidence.
- Marmouzi I, Kharbach M, El Jemli M, **Bouyahya A**, Cherrah Y, Bouklouze A, Heyden YV, Faouzi ME, 2018. Chemical functionality in *Zizyphus Lotus* leaves and fruits and their antioxidant, antidiabetic and dermatoprotective activities.
- Berrani A, Marmouzi I, Kharbach M, **Bouyahya A**, El Hamdani M, El Jemli M, Lrhorfi A, Benassaoui H, Zouarhi M, Larbi OM, Faouzi ME, Rachid Bengueddour R. Polyphenolic compounds and functional antidiabetic, antioxidant and antimicrobial parts of *Anabasis aretioides*.

Communications

- Bouyahya A**, Bakri Y, Et-touys A, Ines A, Khouchlaa A, Talbaoui A, Abrini J, Dakka N (2016). Characterization of *in vitro* antibacterial, antileishmanial and anticancer properties of essential oils from Moroccan endemic medicinal plant *Origanum compactum* Benth. Colloque International «Substances Naturelles : Stress et métabolisme cellulaires», 15,16-12-2016. des Sciences et Techniques de l'Université Hassan 1^{er}, Maroc.
- Bouyahya A**, Bakri Y, Talbaoui A, Et-touys A, Khouchlaa A, Abrini J, Dakka N (2017). Evaluation of antioxidant, antibacterial, antileishmanial and antitumor properties of *Rosmarinus officinalis*, *Mentha pulegium* and *Lavandula stoechas* essential oils from the North-West of Morocco. 2^{ème} édition du Symposium « Santé-Environnement-Développement durable», Samedi 25 Février 2017 à la Faculté des Sciences – El Jadida-MAROC.
- Bouyahya A**, Et-Touys A, Ines A, Talbaoui A, Khay EO, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. Phytochemical screening and evaluation of pharmacological activity of *Centaurium erythraea* (Rafin). Les 5^{ème} Journées Nationales sur la Chimie Verte : Tétouan le 04 et 05 Novembre 2016.
- Bouyahya A**, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of aerial part of *Cistus crispus* (L.) extract In : 5^{ème} édition des Doctoriales de la faculté des sciences Rabat : Recherche scientifique Eco-Innovatrice : Acquisition du Savoir et Perfectionnement des Compétences. , 09-03-2016, Faculté des sciences, Rabat-Maroc.
- Bouyahya A**, Abrini J, Charfi S, Boujida N, Et-touys A, Bakri Y, Dakka N. Screening phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits organiques de *Centaurium erythraea* (Rafin) In : 2^{ème} Edition du Congrès International « Substances Naturelles et Développement Durable », 19, 20, 21-05-2016, Faculté des Sciences - Université Mohammed V de Rabat-Maroc.
- Khouchlaa A, Talbaoui A, El Yahyaoui El Idrissi A, **Bouyahya A**, Ait Lahcen S, Kahouadji A, Tijane M (2017). Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique de *Zizyphus lotus* L. sur les calculs rénaux. Colloque International «Substances Naturelles : Stress et métabolisme cellulaires», 15,16-12-2016. des Sciences et Techniques de l'Université Hassan 1^{er}, Maroc.
- Khouchlaa A, **Bouyahya A**, Tijane M. Essais in vitro de l'effet de *Zizyphus lotus* (L.) sur la cristallisation d'oxalate de calcium dans l'urine humaine. 2^{ème} édition du Symposium « Santé-Environnement-Développement durable», Samedi 25 Février 2017 à la Faculté des Sciences-El Jadida-MAROC.
- Khouchlaa A, Talbaoui A, Ait Lahcen, **Bouyahya A**, El Yahyaoui El Idrissi, Kahouadji A, Tijane M (2016). Evaluation de l'activité litholytique *in vitro* sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. La 5^{ème} Edition Internationale des Journées Jeunes Chercheurs de Chimie Thérapeutique et la Chimie Médicinale dans le Processus de <<DRUG DISCOVERY.

Belmehdi O, El Baaboua A, **Bouyahya A**, Haoujar I, Skali Senhaji N, Abnrini J (2018). Phenolic content and antioxidant activity of Moroccan propolis. JR19 : Journée de la Recherche de l'UAE, 9 et 10 mars 2018 à la Faculté Oussoul Eddine de Tétouan.

Belmehdi O, **Bouyahya A**, El Baaboua A, El Harsal A, Haoujar I, Skali Senhaji N, J. Abrini (2018). Isolation and screening of Moroccan biosurfactant producing micro-organisms from oil contaminated soil. "Conférence Internationale Technologie, Innovation et Systèmes d'Information". 17 et 18 Mars 2018, à l'ENSA de Tétouan.

Liste des abréviations

ADN	Acide desoxyribonucléique
AGE	Acide Gallique Equivalent
AHL	Acyl-Homosérine Lactone
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-Tri-Phosphat
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DMAPP	Dimethylallyldiphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
DNMT	DNA methyltransferase
DO	Densité Optique
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
INH	Institut National d'Hygiène
LB	Luria Bertoni
MEM	Modified Eagle Medium
MHA	Muller Hinton Agar
MLH1	Human MutL Homolog 1
MTT	Dimethylthiazoldiphenyl tetrazolium bromide
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAM	Plantes aromatiques et médicinales
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Plaque Count Agar
pH	Potentiel d'hydrogène
PML/RAR α	Promyelocytic Leukaemia/ Retinoic Acid Receptor Alpha
QE	Quercetin equivalent
QS	Quorum Sensing
RB	Retinoblastoma Protein
RD	Rhabdomyosarcome embryonnaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RSV	Rous Sarcoma Virus
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SVF	Sérum de Veau Fœtal
UFC	Unité Formatrice Colonie
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vero	Vervet origin

Liste des Figures

Figure 1: Unité de base d'isoprène.....	7
Figure 2: Biosynthèse des terpènes dans le chloroplaste et le cytosol	8
Figure 3: Structure générale du noyau des flavonoïde	11
Figure 4: Voies de signalisation de RAS.....	13
Figure 5: Voies d'activation <i>via</i> la protéine myc..	14
Figure 6: Maintien de l'intégrité cellulaire <i>via</i> la protéine P53	15
Figure 7: Voies de contrôle via la protéine RB.....	16
Figure 8: Caractéristiques générales des cellules cancéreuses et les cibles pharmacologiques. .	19
Figure 9: Inhibition enzymatique du récepteur par Gleevec.....	20
Figure 10: Modèle physiopathologique expliquant l'action de l'acide rétinoïque.....	21
Figure 11: Cibles épigénétique du cancer.....	23
Figure 12: Voie métabolique de l'oxygène et des ERO	31
Figure 13: Détoxification des oxydations provoquées par les ROS	36
Figure 14: Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	40
Figure 15: Quorum Sensing des bactéries à Gram-	42
Figure 16: Quorum Sensing des bactéries à Gram+	43
Figure 17: Mécanismes d'action des HE sur la cellule bactérienne.	45
Figure 18: Inhibition des signaux du QS par l'inhibition de la génération du signal de HLA.....	47
Figure 19: Mécanismes d'action anti-QS affectant la reception du signal.....	47
Figure 20: Carte de la province d'Ouezzane et ses zones étudiées	56
Figure 21: Protocole de préparation des extraits de plantes..	59
Figure 22: Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le réactif de Folin-Ciocalteu	61
Figure 23: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....	61
Figure 24: Evaluation de l'activité leishmanicide par le test MTT.	68
Figure 25: Daimètre d'inhibition exprimée dans la technique de diffusion en puits..	70
Figure 26: Schéma représentant la méthode de micro-dilution..	71

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Données Bibliographiques

Chapitre 1 : Plantes médicinales et phytothérapie.....	4
---	----------

1. Introduction.....	4
2. Plantes médicinales	4
3. Phytothérapie.....	5

Chapitre 2 : Métabolites secondaires des plantes médicinales.....	6
--	----------

1. Huiles essentielles.....	6
2. Composés phénoliques	9
3. Acides phénoliques.....	10
4. Flavonoïdes.....	10

Chapitre 3: Propriétés antitumorales des plantes médicinales.....	11
--	-----------

1. Généralité sur le cancer	11
--	-----------

1.1. Introduction	11
1.2. Mécanismes de l'oncogenèse	12
1.3. Caractéristiques générales des cellules cancéreuses.....	18
1.4. Thérapie ciblée du cancer.....	20

2. Activité anticancéreuse des plantes médicinales.....	23
--	-----------

2.1. Activité antitumorales des plantes médicinales du Maroc.....	23
2.2. Mécanismes d'action anticancéreux des plantes médicinales.....	24

Chapitre 4: Stress oxydant et antioxydants naturels	29
--	-----------

1. Stress oxydant	29
--------------------------------	-----------

1.1. Généralité	29
1.2. Dommages du stress oxydant.....	33
1.3. Systèmes de défense : Antioxydants	35

2. Activité antioxydante des substances naturelles	37
---	-----------

Chapitre 5 : Plantes médicinales aux propriétés antibactériennes.....	38
--	-----------

1. Maladies infectieuses d'origine bactérienne	38
---	-----------

1.1. Introduction	38
1.2. Résistance aux antibiotiques et réémergence des maladies infectieuses	39
1.3. Quorum sensing et pathogénécité bactérienne.....	41

2. Activité antibactérienne des plantes médicinales	43
--	-----------

2.1. Activité antibactérienne des plantes médicinales du Maroc	43
2.2. Action antibactérienne des huiles essentielles.....	44

Chapitre 6 : Propriétés antileishmanienne des plantes médicinales	48
1. Généralité sur la leishmaniose.....	48
1.1. Parasite.....	48
1.2. Vecteurs	49
1.3. Leishmaniose au Maroc.....	49
1.4. Physiopathologie de la leishmaniose.....	51
2. Activité antileishmanienne des plantes médicinales	52
Travaux Expérimentaux	
Objectifs.....	54
Matériel et méthodes.....	55
1. Etude ethnopharmacologique	55
1.1. Zone d'étude.....	55
1.2. Collecte des données	55
1.3. Identification des espèces de plantes médicinales.....	56
1.4. Analyse quantitative des données	56
2. Extraction et caractérisation phytochimique	57
2.1. Plantes récoltées et conditions optimales de cueillette	57
2.2. Préparation des huiles essentielles et des extraits organiques.....	57
2.3. Caractérisation phytochimique des extraits.....	58
2.4. Caractérisation chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).....	61
3. Etude de l'activité antiproliférative	62
3.1. Lignées cellulaires testées	62
3.2. Culture des cellules	62
3.3. Evaluation de l'activité cytotoxique par le test MTT	63
4. Etude de l'activité antioxydante	64
4. 1. Test de piégeage du radical DPPH	64
4. 2. Test du pouvoir réducteur	65
4. 3. Balayage du radical ABTS.....	65
5. Etude de l'activité antileishmanienne	66
5.1. Culture des leishmanies	66
5.2. Espèces utilisées.....	66
6. Etude de l'activité antibactérienne.....	67
6.1. Souches bactériennes testées	67
6.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	67

6.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits.....	69
6. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution	69
6. 5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	71
7. Mécanisme d'action antibactérien des huiles essentielles d'<i>Origanum compactum</i> ..	72
7. 1. Effet sur de la cinétique de croissance bactérienne	72
7. 2. Effet sur l'intégrité de la membrane cellulaire	72
7. 3. Effet sur la perméabilité de la membrane cellulaire.....	73
7. 4. Effet anti-quorum sensing.....	73
Résultats.....	74
Article 1: Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities	74
Article 2: <i>In vitro</i> antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines.....	76
Article 3: Anticancer and antidermatophyte activities of essential oils from three Moroccan medicinal plants	78
Article 4: Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco.....	79
Article 5: Phenolic extracts of <i>Centaurium erythraea</i> with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities	80
Article 6: Chemical composition of <i>Mentha pulegium</i> and <i>Rosmarinus officinalis</i> essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities.....	81
Article 7: <i>Lavandula stoechas</i> essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities	82
Article 8: Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (<i>Origanum compactum</i> Benth)	83
Article 9: Essential oils of <i>Origanum compactum</i> induce membrane permeability, disturb cell membrane and suppress quorum sensing phenotype in <i>Bacillus subtilis</i> 6633 and <i>Escherichia coli</i> K12.	85
Discussion des résultats	86
Chapitre 1: Phytothérapie dans la province d'Ouezzane	86
Chapitre 2 : Etude phytochimique	88
1. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.....	88
2. Composition chimique des huiles essentielles	89
Chapitre 3: Etude de l'activité antiproliférative.....	91
1. Fiabilité de l'approche utilisée	91
2. Activité antiproliférative des extraits	91

3. Activité antiproliférative des huiles essentielles.....	93
Chapitre 4: Etude de l'activité antioxydante.....	94
1. Mécanismes réactionnels et modes d'action des antioxydants.....	94
2. Fiabilité des méthodes utilisées pour estimer l'activité antioxydante.....	94
3. Corrélation entre la composition des huiles essentielles et l'activité antioxydante.....	95
4. Correlation entre les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits et l'activité.....	96
Chapitre 5 : Activité antileishmanienne	97
1. Activité antileishmanienne des huiles essentielles	97
2. Activité antileishmanienne des extraits	98
Chapitre 6 : Etude de l'activité antibactérienne	98
1. Fiabilité des méthodes utilisées pour d'évaluation de l'activité antibactérienne.....	98
2. Corrélation entre la composition des huiles essentielles et l'activité antibactérienne	100
3. Corrélation entre teneurs en polyphénols et flavonoides et l'activité antibactérienne...	100
4. Sensibilité des bactéries à Gram positives et à Gram négatives.....	101
5. Effets bactéricide et bactériostatique.....	101
Chapitre 7 : Action antibactérienne des huiles essentielles d'<i>O. compactum</i>.....	102
1. Choix des huiles essentielles.....	102
2. Choix des méthodes utilisées.....	102
3. Action des huiles essentielles d' <i>Origanum compactum</i>	103
4. Action antibactérienne contre <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	104
Discussion générale	106
Conclusions	114
Perspectives.....	116
Références Bibliographiques	118
Annexes	136

Introduction générale

Depuis son apparition sur terre, l'homme a subi différentes confrontations *vis-à-vis* de la nature. En effet, à travers des millions d'années, cette confrontation avec la nature *via* l'adaptation et la sélection naturelle a pu ressortir l'homme moderne, qui prendra par la suite, grâce au développement de l'intelligence, les décisions d'agir lui aussi sur la nature. Depuis cette époque, l'homme a commencé l'exploitation des produits naturels pour ses propres besoins y compris pour se défendre contre les pathologies afin de garder leur propre santé. En effet, même à l'époque de la théorie des humeurs des maladies, l'homme avait utilisé des préparations végétales pour combattre le mal ([Canha, 2016](#) ; [Mideo et al., 2011](#)). Par ailleurs, la formulation de multiples théories scientifiques vers le 19^{ème} siècle, en particulier la théorie microbienne avec Pasteur et la théorie cellulaire avec Verchaw, a remis en cause les étiologies liées avec certaines maladies. Ceci a pu rendre compte que les maladies sont de nature biologique (agents infectieux) ainsi que les possibilités de les traiter avec des agents anti-infectieux ([Chaisson, 2014](#)). A l'opposé de la théorie microbienne des maladies, Claud Bernard nous a montré par la suite comment un dérèglement à l'intérieur de l'organisme peut constituer un désordre donnant lieu à une maladie endogène. Il a aussi montré comment la curiosité scientifique d'un chercheur ne contribue pas seulement à la compréhension des désordres à *priori* mais aussi à l'établissement de l'ordre à *posteriori* ([Bernard, 1865](#)). En effet, La compréhension physiologique et biochimique des agents microbiens a constitué un réel changement de paradigme dans la lutte contre les maladies infectieuses justifiant ainsi les gains spectaculaires de longévité durant les 200 dernières années chez les pays occidentaux. Par ailleurs, la lutte contre les maladies résultantes d'un dysfonctionnement interne a connu un réel succès grâce à la compréhension de plus en plus approfondies des mécanismes vitaux-normaux.

Avec les progrès remarquables dans l'étiologie de différentes pathologies, plusieurs molécules d'origines diverses allant du milieu naturel à la biotechnologie en passant par la synthèse chimique ont été développées pour traiter ces pathologies quelles que soient exogènes ou endogènes. Par ailleurs, les substances naturelles extraites de plantes médicinales occupent une place majeure dans le développement des principes actifs (Taxol, Celiptium, Vinblastine, Navelbine,...) contre les différentes maladies telles que le cancer, le diabète, l'inflammation et les maladies infectieuses ([Da Silva et Meijer, 2012](#)). Cependant, la recherche de nouvelles substances dotées d'une propriété biologique est régie par le hasard, ceci rend compte de la nécessité de cribler pharmacologiquement un grand nombre de plantes médicinales pour tomber au hasard dans un extrait, une substance ou éventuellement un principe actif ([Lahlou, 2013](#)). Cette approche passe donc par des années de criblage ce qui rend la recherche dans ce

volet très colossal. D'ailleurs, grâce à cette approche que plusieurs molécules ont été découvertes et plus particulièrement celles isolées des plantes médicinales.

Aujourd'hui, plusieurs approches accélérant le processus de criblage de nouveaux agents naturels à visée thérapeutique voient le jour. En effet, l'approche ethnopharmacologique et chemiotaxonomique ont constitué un réel changement de paradigme, augmentant ainsi la chance de décortiquer de nouvelles molécules naturelles (Barbosa, 2008). L'approche ethnopharmacologique vise à sélectionner les plantes ayant des relations traditionnelles quasi-étroites avec les tradipraticiens, alors que l'approche de chemiotaxonomie vise à sélectionner les plantes auprès d'une région particulière dont son climat permet d'induire une diversité des métabolites secondaires (Guirado et Cuellar, 2008 ; Heinrich, 2001). Dans ce contexte, la situation géographique du Maroc lui confère une grande diversité bioclimatique et une richesse bioécologique remarquable (4500 espèces végétales). Certaines de ces espèces ont montré leur efficacité dans le domaine anti-inflammatoire, antibactérien ou anticancéreux, cependant une grande quantité de substances à activités biologiques dans notre pays reste toujours inconnue.

Dans les régions du nord du Maroc et d'ailleurs la région d'Ouezzane, les plantes médicinales constituent une source importante qui est malheureusement menacée par une exploitation intensive aussi bien par la population locale, pour des raisons socio-économiques, que par des fournisseurs nationaux et internationaux. Cette région est dotée d'un climat méditerranéen particulier et une diversité végétative importante qui pourrait lui conférer une variabilité chemiotaxonomique. De plus, la médecine traditionnelle à base de plantes médicinales dans cette région date depuis longtemps ce qui peut constituer un critère de sélection extrêmement efficace. Ceci nous a permis de présenter l'hypothèse supportant l'ensemble des objectifs de cette thèse à savoir : *L'utilisation phytothérapeutique des plantes médicinales par la population de la région d'Ouazzane, pour remédier aux différentes maladies, pourrait être justifiée par la présence des molécules bioactives telles que des polyphénols, des flavonoïdes et des terpénoides. Ces molécules pourraient exercer une diverse protection contre les ennemis de l'extérieur (microbes) et restaurer par des mécanismes spécifiques les désordres intérieurs (Stress oxydant et cancer).* Ceci pourrait constituer éventuellement une référence de base de recherche sur les principes actifs végétaux.

Pour atteindre les objectifs escomptés, nous avons réalisé une étude globale constituée d'une série de travaux de terrain et autres expérimentaux portés sur les analyses phytochimiques et pharmacologiques des produits de plantes médicinales étudiées. Ces travaux ont été conduits en collaboration entre deux laboratoires de recherche de deux universités différentes, ont pour but de valoriser les plantes médicinales de la région d'Ouezzane en étudiant leurs profils

phytochimiques et leurs activités biologiques à savoir les effets antioxydants, anticancéreux, antiparasitaires et antibactériens.

Au cours de ce travail on a mis l'accent sur les parties suivantes :

Dans la première partie nous avons réalisé une étude ethnopharmacologique des plantes médicinales de la région d'Ouazzane.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons, tout d'abord, récolté les plantes médicinales sélectionnées sur la base de l'étude ethnopharmacologique, puis on a procédé à l'extraction, et à la caractérisation phytochimique des extraits organiques et des huiles essentielles.

Dans la troisième partie nous avons criblé l'activité cytotoxique des huiles essentielles et des extraits sur des lignées cellulaires cancéreuses cultivées *in vitro*.

Dans la quatrième partie nous avons fait un screening de l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extraits en utilisant trois méthodes complémentaires *in vitro*.

Dans la cinquième partie nous avons testé l'activité antileishmanienne des huiles essentielles et des extraits organiques contre trois espèces de *Leishmania* cultivés *in vitro* en utilisant le test MTT.

Dans la sixième partie nous avons évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits organiques contre des souches à Gram+ et à Gram- en utilisant la méthode de diffusion en puits et la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

Dans la septième partie, nous avons examiné le mécanisme d'action antibactérien des huiles essentielles d'*Origanum compactum* contre *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

A la lumière des résultats obtenus, nous essaierons de proposer quelques perspectives de recherche.

Chapitre 1 : Plantes médicinales et phytothérapie

1. Introduction

L'homme dépend et dépendra toujours de la nature pour tous ses besoins : nourriture, bois de chauffage, bois de construction, fibres vestimentaires, parfums et arômes...mais aussi médicaments. Les plantes sont en effet depuis les temps immémoriaux la source de nombreux traitements, et elles n'ont pas fini de fournir de nouvelles molécules aux propriétés thérapeutiques diverses (Lahlou, 2013). Malgré les progrès remarquables de la recherche en biotechnologie, en biologie moléculaire, en génétique et en génomique, il ne faut surtout pas oublier que seuls 10% environ des quelques 400000 espèces végétales connues ont été à ce jour étudiées sur le plan phytochimique et pharmacologique. Les plantes qui peuvent contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents, ont un potentiel thérapeutique énorme (Anyinam, 1995).

A partir de simples observations empiriques, elles continuent à nous fournir de nouveaux médicaments ou de nouvelles molécules. Ces dernières années, plusieurs molécules importantes ont ainsi été isolées et sont devenues des remèdes efficaces. Citons par exemple l'artémisinine, isolée de l'armoise chinoise, pour ses propriétés antipaludéennes, le taxol, issu de l'if, pour ses propriétés anticancéreuses remarquables ; ou encore la galanthamine, un alcaloïde isolé de la perce-neige, qui est utilisé dans le traitement des formes légères à modérées de la maladie d'Alzheimer.

Les premiers documents faisant référence aux plantes médicinales, datant d'environ 2600 ans avant J.-C., ont été mis à jour en Mésopotamie. Ces documents en écriture cunéiforme, étaient rédigés sur des plaques de terre de cuite. Parmi les substances citées : l'huile de cèdre (*Cedrus* sp.), l'huile de cyprès (*Cupressus sempervirens*), la réglisse (*Glycyrrhiza Glabra*), la myrrhe (*Commiphora* sp.) et le jus de pavot (*papaver somniferum*). La légitimité des vertus de ces plantes est toujours d'actualité, et ces espèces ou leurs extraits respectifs sont utilisées contre toute une gamme de maladies : toux, grippe, infections parasitaires et inflammations, entre autres. La médecine égyptienne avait rapporté l'usage du khella (*Amni majus*) contre le vitiligo, une infection cutanée caractérisée par des plaques de dépigmentation (Khafagi et Dewedar, 2000). Récemment un médicament, le bêta-méthoxypsoralène, a été produit de cette plante pour traiter le psoriasis et d'autres maladies de la peau, ainsi que certains lymphomes.

2. Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont définies comme des drogues végétales au sens de la pharmacopée européenne (1433) dont au moins un organe (feuilles, fleurs, écorces...) ou partie d'organe possède des propriétés médicamenteuses. Elles peuvent être classées en deux catégories en

fonction de leur destination. Des plantes consommées et qui regroupent les plantes condimentaires et herboristeries qui sont de plus en plus transformées au niveau mondial (en biscuiterie, en fromagerie, en conserverie, en plats cuisinés à conservateurs additifs, etc.). Les plantes utilisées ou transformées par les industries pharmaceutiques, parfumeries, cosmétiques et agroalimentaires ([Heinrich, 2001](#)).

De point de vue pharmacognosique, il existe plusieurs modes de préparation de plantes pour leur utilisation médicinale. Ces différentes préparations ont tous les mêmes finalités : **1)** Rendre plus accessible et plus facile l'administration de la plante, **2)** Augmenter la concentration de certains principes actifs de la plante qui, par leur propriétés physicochimiques particulières, sont plus facilement dissous lorsqu'ils sont préparés d'une certaine façon et **3)** Favoriser la conservation de la ou des plantes, ou des préparations faites avec ces plantes ([Heinrich et al., 1998](#)). Par exemple, une décoction peut être conservée plus longtemps qu'une infusion car, la période d'ébullition étant plus longue, elle permet une stérilisation du liquide. Il faut signaler toutefois que chaque plante médicinale a un mode d'emploi particulier et que l'on doit impérativement savoir qu'il existe un mode de préparation idéal. Il suffit de le connaître et de savoir tirer profit des propriétés médicinales d'une plante ou de certaines de ses parties ([Kayani et al., 2014](#)).

3. Phytothérapie

La phytothérapie est une approche multidisciplinaire interconnectée par des études de l'ethnobotanique, de l'ethnopharmacologie, de l'ethnomédecine et de l'ethnopharmacie. L'ethnobotanique est l'étude des relations entre le taxa des plantes et leur utilisation thérapeutiques traditionnelles. Cette approche permet de collecter l'ensemble des informations sur la production des plantes, la préparation des remèdes, les allégations d'utilisation, le dosage et l'évaluation des drogues utilisés ([Barbosa, 2008](#)). L'ethnobotanique investit la relation entre l'homme et la plante dans toute sa complexité. Elle est basée sur des observations détaillées et l'étude d'utilisation des plantes dans une société, comprenant ainsi toutes les informations des croyances culturelles et des pratiques associées. Selon [Guirado et Cuellar \(2008\)](#), l'ethnobotanique est une approche qui étudie l'investigation des plantes sur la base de leurs utilisations traditionnelles par les différents peuples, créant ainsi une interface entre la médecine clinique moderne et la médecine ancienne. L'ethnopharmacologie est l'exploration scientifique multidisciplinaire des agents biologiques actifs employés traditionnellement et/ou observés par l'homme. Par ailleurs, plusieurs études ethnopharmacologiques cherchent la corrélation entre les activités pharmacologiques trouvées dans les différentes drogues traditionnelles avec les produits pharmaceutiques actifs. L'ethnopharmacologie, cependant, vise à associer les points de vues culturelles, biologiques et chimiques afin d'aboutir à une approche complémentaire

(Heinrich et al., 1998). Dans notre étude, nous avons montré les liens de causalité positive existant entre l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales et leurs propriétés biologiques *in vitro* en fonction des principes actifs identifiés.

L'ethnomédecine s'est référée à l'étude des maladies, leurs causes et les mesures thérapeutiques ciblées par les différentes sociétés. En effet, c'est un dialogue entre la nature et la thérapie ancienne utilisée pour combattre la maladie *via* l'étude des relations qu'existent entre le patient et le guérisseur, le patient et la société et finalement entre le patient et leurs références religieuses. Cette approche contribue en fait dans la connaissance de différentes techniques utilisées par les anciens peuples dans les traitements et les connaissances des maladies. D'un autre côté, une autre notion, l'ethnopharmacie, définie par Heinrich comme une science interdisciplinaire qui est reliée à l'étude des ressources pharmaceutiques en relation avec les déterminants culturels qui caractérise l'utilisation de ces ressources dans un groupe humain particulier (Heinrich, 2001). Elle comprend les études sur l'identification, la classification et la caractérisation cognitive du matériel de la plante dont la drogue sera extraite (ethnobiologie), préparation et dosage des drogues (ethnopharmaceutique), allégation des effets associés (ethnopharmacologie) et les aspects socio-médicales associés avec ces utilisations (ethnomédecine) (Pieroni et al., 2002).

Chapitre 2 : Métabolites secondaires des plantes médicinales

Le nombre des substances naturelles possédant des propriétés biologiques augmente constamment et les catégories des molécules sont représentées par plusieurs classes chimiques telles que les terpénoïdes, les flavonoïdes, les acides phénoliques et les alcaloïdes.

1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des composés organiques naturels complexes de structures organiques très variées (Duquéniois et al., 1968). Le terme « huiles » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielles » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice (Chemat et al., 2013). Les HE sont biosynthétisées par des plantes odorantes, dites aromatiques, comme métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices des HE bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (Lamiaceae) les poches sécrétrices (Myrtaceae) et les canaux sécréteurs (Apiaceae). Ces structures dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini se diffèrent selon l'organe végétal en question. Ces structures sont également impliquées dans le stockage des HE. L'extraction des HE se fait par différentes techniques, mais les plus utilisées sont celles de distillation (l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion), essentiellement à des fins commerciales (Burt et al., 2004). Elles peuvent être obtenues aussi par extraction à froid (Santoyo et al., 2005),

dioxyde de carbone supercritique, extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes (Kimbaris et al., 2006).

Généralement, les HE sont liquides à température ambiante, volatiles, inflammables, odorantes et leur densité est généralement inférieure à 1, à l'exception de cinnamome (cannelle), de clous de girofle et de sassafras. Elles sont incolores, sauf la tanise qui est bleue, la cannelle rouge brune et l'inule verte. Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les huiles végétales et dans la plupart des solvants organiques, tels que l'alcool et l'éther. Elles peuvent être oxydées rapidement et isomérisées par la lumière (Charpentier et al., 2008). A partir d'une unité de base principale (Figure 1), deux principales voies sont à la base de la synthèse des HE (Figure 2). La voie de l'acide mévalonique (MVA) qui a lieu dans le cytoplasme, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Croteau et al., 2000). La seconde voie est le phosphate déoxyxylulose ou le méthylérythritol (MEP) qui se déroule en niveau des plastides (Dubey et al., 2003 ; Bohlmann et al., 2008). Selon la voie empruntée, les constituants des HE appartiennent presque exclusivement à deux familles biosynthétiques distinctes : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes.

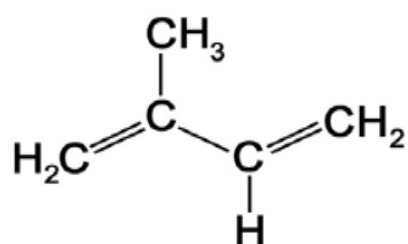


Figure 1: l'unité de base d'isoprène

Les monoterpènes (dix carbones) et les sesquiterpènes (15 carbones) sont des composés des HE qui représentent la majorité des membres de terpénoïdes ; quoique les constituants diterpéniques peuvent occasionnellement être observés. Le rôle exact que pourraient jouer les HE dans la plante n'a pas été encore bien élucidé et reste à définir, néanmoins certaines suggestions ont donné quelques éléments de réponse. En effet, il a été démontré que les HE attirent des animaux qui servent à la pollinisation et à la dispersion des graines (Isman, 2000), elles constituent un moyen de défense contre les organismes phytopathogènes (Rauha et al., 2000), et elles ont un effet allélopathique (De Feo et al., 2000).

1.1. Composition chimique des huiles essentielles

L'HE peut contenir approximativement 300 molécules ; cependant, la plupart des huiles comportent 20 à 60 molécules (Pengelly, 2004). Les composés trouvés dans les HE appartiennent à des classes chimiques variées. Les composés terpéniques sont prédominants mais les phénylpropanoïdes et les autres composés (composés nitriques et sulfuriques) se

retrouvent avec des fréquences plus faibles et en proportion similaire (Friedrich, 1976). Elles peuvent aussi contenir des composés azotés et sulfuriques (Griffin et al., 1999).

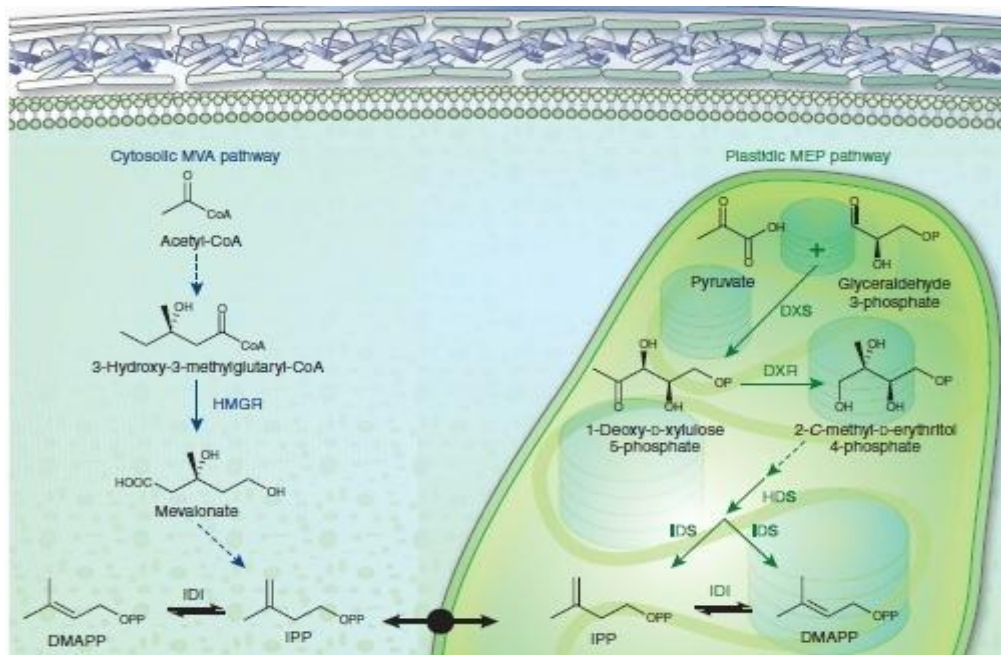


Figure 2: Biosynthèse des terpènes dans le chloroplaste et le cytosol (Bartram et al., 2006)

✓ Groupe des terpènes et terpénoïdes

C'est le groupe le plus important, près de 3 000 terpènes ont été décrits dans la littérature (Pinder, 1960 ; Connolly et Hill, 1991). Il comprend des monoterpènes (10 atomes de carbone dans la molécule), des sesquiterpènes (15 atomes de carbone), des diterpènes (20 atomes de carbone). Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de cinq atomes de carbone de formule générale $(C_5H_8)_n$. La molécule de base est l'isoprène (Ruzicka, 1953). Ce dernier, sous sa forme réactive, est l'isoprénolpyrophosphate (IPP), qui se transforme partiellement en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP). Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranylpyrophosphate (ou GPP), précurseur des monoterpènes en C10. Une deuxième molécule d'IPP, réagissant sur le GPP, fournit le farnésylpyrophosphate (ou FPP), précurseur des sesquiterpènes en C15 ; une troisième molécule d'IPP, réagissant sur le FPP, fournit le géranylgéranylpyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes en C20 ; et ainsi de suite, pour la formation des sesterpènes en C25, des triterpènes en C30 et des carotènes en C40 (Keszsei, 2008). Le point d'ébullition des terpènes augmente avec le nombre d'atomes de carbone dans la molécule ; les molécules de masse plus élevée sont moins volatiles. Nous verrons plus loin que le mode d'obtention des HE se fait le plus souvent par entraînement à la vapeur ou hydrodistillation. Aussi, les HE seront très riches en monoterpènes, beaucoup moins en diterpènes et encore moins en triterpènes.

✓ Groupe des phénylpropanoïdes

Ce groupe des dérivés du phénylpropane ($C_6H_5-CH_2-CH_2-CH_3$) est moins fréquent. La biosynthèse concerne le précurseur de cette série qui est l'acide shikimique (ou acide trihydroxy-3,4,5-cyclohexane-1-carboxylique) qui conduira aux dérivés de l'acide cinnamique $C_6H_5-CH=CH-COOH$. Ce deuxième groupe est constitué par : des aldéhydes (par exemple, le cinnamaldéhyde) et des dérivés méthoxylés, ainsi que des allylphénols (par exemple, l'eugénol), des propénylphénols (par exemple, l'anéthole) (Bakkali et al., 2008 ; Sangwan et al., 2001). Il existe aussi des lactones ou esters cycliques (par exemple, la coumarine) formés à partir de dérivés de l'acide cinnamique. Parfois, la chaîne aliphatique est réduite à un seul atome de carbone (par exemple, la vanilline).

✓ Composés nitriques et sulfuriques

Ces composés proviennent le plus souvent de la dégradation de molécules peu ou pas volatiles. Par exemple, l'oxydation des acides linoléique et linolénique conduit à des peroxydes instables qui, à leur tour, après dégradation, vont donner des alcools, des aldéhydes et des acides de masse moléculaire plus petite. Les acides organiques sont rarement présents dans les HE, ils réagissent avec les alcools pour former des esters. Les carotènes se décomposent en ionones. Les composés azotés qui contiennent du soufre sont rares dans les HE ; on les retrouve à l'état naturel dans les aliments torréfiés, grillés ou rôtis. Les concrètes renferment des molécules de masse moléculaire élevée (Halkier et al., 2006).

La présence de soufre, en particulier, confère un caractère d'odeur très forte (Boelens, 1996 ; Goeke, 2000). Les molécules contenant du soufre et du nitrogène sont des aglycones, des glycosinolates et des isothiocyanates. Les aglycones constituent la portion non sucrée d'un glycoside, et les glycosinolates sont des composés contenant du soufre ou du nitrogène, formés de glucose et l'un des acides aminés. En plus des isothiocyanates, des cyanates et des composés nitriques, d'autres molécules contenant le nitrogène peuvent occasionnellement être présentes dans les HE (Halkier et al., 2006).

2. Composés phénoliques

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des molécules synthétisées par les plantes. Ils appartiennent au métabolisme secondaire et participent à la défense contre les agressions environnementales. Ce sont des phytomicronutriments et généralement des pigments responsables des teintes des feuilles, des couleurs et des fruits. Les composés phénoliques forment le groupe le plus important des composés phytochimiques dans les plantes (Beta et al., 2005). Il s'agit d'une classe composée d'environ 8000 composés, tous ayant une chose en commun: la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique avec six carbones. Il

est divisé en au moins 10 classes différentes selon leur structure chimique de base, et peut aller de molécules simples telles que les acides phénoliques aux composés hautement polymérisés tels que les tanins (Lugasi et al., 2003). Les polyphénols peuvent donc réduire ou bloquer de nombreux mécanismes impliqués dans la genèse ou l'amplification de certaines pathologies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires (Lahlou, 2013).

3. Acides phénoliques

Un acide phénolique est un composé organique ayant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Dans les plantes, ces phénols acides se présentent souvent sous la forme d'esters d'alcools aliphatiques ou d'esters d'acide quininique, d'acide rosmarinique ou de glycosides (Lugasi et al., 2003). Les sites et le nombre des groupes hydroxyle du groupe phénolique ont une relation étroite avec la toxicité *vis-à-vis* des microorganismes: plus l'hydroxylation augmente plus la toxicité est importante (Lahlou, 2013).

4. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde se réfère à une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. De nos jours, plus de 4 000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et, par conséquent, tous possèdent le même squelette de base avec quinze atomes de carbone, composés de deux unités aromatiques, deux anneaux C_6 liés par une chaîne C_3 (Figure 3) (Heim et al., 2002). Structurellement, les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes de molécules en fonction du degré d'oxydation et de la nature du substituant porté sur le cycle. Différents groupes ont été identifiés à partir desquels six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés: flavones, isoflavones, flavonones, flavanols, flavonols et anthocyanidines (Heim et al., 2002 ; Heinrich et al., 2006). Leur biosynthèse est réalisée à partir d'un précurseur commun, 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Cette chalcone jaune est métabolisée, sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase, en flavonone (naringénine). Ceci est suivi de flavone synthase ou (2S) -flavanone-3-hydroxylase pour former la flavone (apigénine) ou le dihydroflavonol. Les deux enzymes se concentrent de différentes façons; La première introduit la double liaison entre les carbones C_2 et C_3 , tandis que la seconde catalyse l'hydroxylation du carbone C_3 . Le dihydroflavonol, en présence de flavonol synthase ou de dihydroflavonol-4-réductase, est métabolisé en flavonol (kaempferol) ou flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidol). Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ol et des anthocyanidols. Le pélagonidol, sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, est transformé en anthocyanoside (pélagonidol-3-glycoside). Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature du substituant (groupes hydroxyle, groupes méthoxyle et similaires) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne C_3 intermédiaire (Bruneton et al., 1999). Les flavonoïdes sont les pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et

des feuilles. Les flavonoïdes présentent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant de manière complexe avec les différentes hormones de croissance végétales (Begquist et al., 2005). Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexine, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre certaines infections causées par des champignons ou des bactéries. De plus, les flavonoïdes ont un intérêt thérapeutique important grâce à leurs diverses propriétés biologiques telles que les activités anti-cancéreuses, antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires et antioxydantes (Lahlou, 2013).

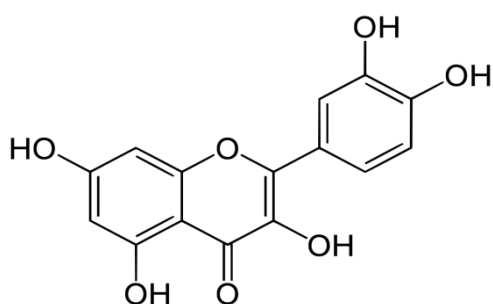


Figure 3: Structure générale du noyau des flavonoïde (Heim et al., 2002)

Chapitre 3: Propriétés antitumorales des plantes médicinales

1. Généralité sur le cancer

1.1. Introduction

Le cancer est une maladie complexe dont le terme générique recouvre différentes pathologies. Cette maladie a été tout le temps un mal mystérieux, multiformes et ses causes on été depuis longtemps inconnues, tandis que ses remèdes sont empiriques et radicaux (Galmarini et al., 2012). Dans ces dernières décennies, et grâce à la biologie moléculaire, des progrès décisifs dans la compréhension des mécanismes du cancer ont été décrits. Par une série de découvertes fondamentales, le cancer devient un dérèglement de notre vie normale et une maladie dont la cause profonde est endogène liée au dysfonctionnement des mécanismes même de la vie (Luengo et al., 2017). En effet, les mécanismes de toutes les cellules de notre corps sont pilotés par des gènes qui programment la différenciation, contrôlent la vitesse de leur division et décident même leur fins en organisant leur mort (Bourdeau, 2014). Quand des mutations se produisent dans ces gènes, le processus normal peut se dérégler. En effet, certains gènes dits oncogènes, dont leur fonction normale est de contrôler le rythme de division cellulaire, se mettent à donner des ordres accélérés conduisant à une multiplication indéfinie des cellules, à la croissance des tumeurs ou dans le cas des leucémies, à un nombre croissant de globules blancs anormaux. D'autres gènes dits anti-oncogènes dont leur mission normale est d'inhiber les divisions cellulaires, deviennent déficients, ce qui accélère encore la division cellulaire (Chin et

al., 1998). Une fois que la maladie amorcée, d'autres oncogènes participent à la propagation de la cancérisation ; ceux qui dans un processus normal contrôlent la vascularisation des organes favorisant ainsi celles des tumeurs en apportant le sang nécessaire à la croissance, et ceux qui gèrent le transport indispensable de certaines cellules d'une partie du corps à une autre, pour lutter contre les infections microbiennes par exemple, favorisent la migration des cellules cancéreuses conduisant ainsi à l'apparition des métastases (Khan et al., 2017). Certainement, la compréhension du cancer et de la vie sont deux faces pareilles. En effet, le cancer n'est pas seulement un processus hors de nous, causé par des agents exogènes seulement, mais il est principalement présent dans nos gènes susceptibles d'être mutés (Botta, 2006). Cela ne montre pas forcément que les agents externes ne puissent pas jouer un rôle dans le déclenchement de la maladie, car les agents chimiques et des rayonnements peuvent modifier les gènes provoquant les cancers. Certains virus, également en parasitant notre ADN, peuvent introduire des versions altérées dans nos gènes normaux et amorcer ainsi la cancérisation. C'est d'ailleurs la haute sensibilité de nos gènes aux agents externes qui a longtemps masqué la nature profonde du cancer conduisant des chercheurs à des fausses pistes exogènes (Fearon et Vogels, 1990). Du point de vue thérapeutique, les médecins n'arrivent pas à comprendre la nature profonde du cancer pour le combattre. Cependant, un cancérologue illustre son combat avec le cancer par une simple métaphore « quelqu'un qui ne comprend pas le fonctionnement du tube digestif ne doit pas refuser de manger ». Cette métaphore est pertinente, car la chimiothérapie était longtemps une sorte de cuisine avec la mise au point des traitements à base d'une ou plusieurs molécules donnant aux patients des espoirs de vivre même avec la maladie (Luengo et al., 2017 ; Galmarini et al., 2012). Aujourd'hui, la compréhension de plus en plus précise du dérèglement génétique et épigénétique induisant des cancers révolutionne la cancérologie en l'orientant vers la recherche de nouvelles molécules opérant sur des mécanismes élucidés pour cibler de façon spécifique telle ou telle étape du processus de cancérisation sans affecter les fonctionnements vitaux-normaux (Luengo et al., 2017). En effet, l'exploitation de molécules naturelles, même parfois de poisons, est un moyen très efficace comme thérapie innovatrice spécifique pour lutter contre le cancer. L'exemple le plus connu est celui de l'arsénique qui est utilisé en combinaison avec l'acide rétinoïque pour le traitement des leucémies (Tallman, 2008).

1.2. Mécanismes de l'oncogenèse

1.2.1. Oncogènes

Les oncogènes sont des gènes qui stimulent la division cellulaire. Ils ont souvent une origine cellulaire, mais aussi parfois ils ont une origine virale suite à une modification par des rétrovirus. Différentes modifications sont à l'origine des oncogènes cellulaires telles les mutations

ponctuelles ou amplification géniques qui peuvent activer les proto-oncogènes qui deviennent oncogènes.

Exemple 1 : protéine RAS

Le gène RAS est un véritable oncogène qui produit une protéine dotée d'une activité kinase accélérant ainsi la prolifération. En effet, la protéine RAS sert à relier entre les capteurs de prolifération sur les membranes cellulaires et les effecteurs dans le noyau (Figure 4). Dans la plupart des tumeurs digestifs, RAS présente une mutation ponctuelle de son site actif ; mutation qui rend la protéine constitutivement fonctionnelle (Jinesh et al., 2017). Ces mutations transmettent des ordres de prolifération même en absence des signaux de croissance provenant du milieu extérieur. Les mutagènes constituent donc un bon exemple des facteurs extrinsèques. En effet, on peut rendre cancéreuse des cellules normales avec de l'ADN extrait des cellules transformées avec des agents chimiques, ceux-ci démontre formellement les bases génétiques de la trnsformation tumorale (Jinesh et al., 2017).

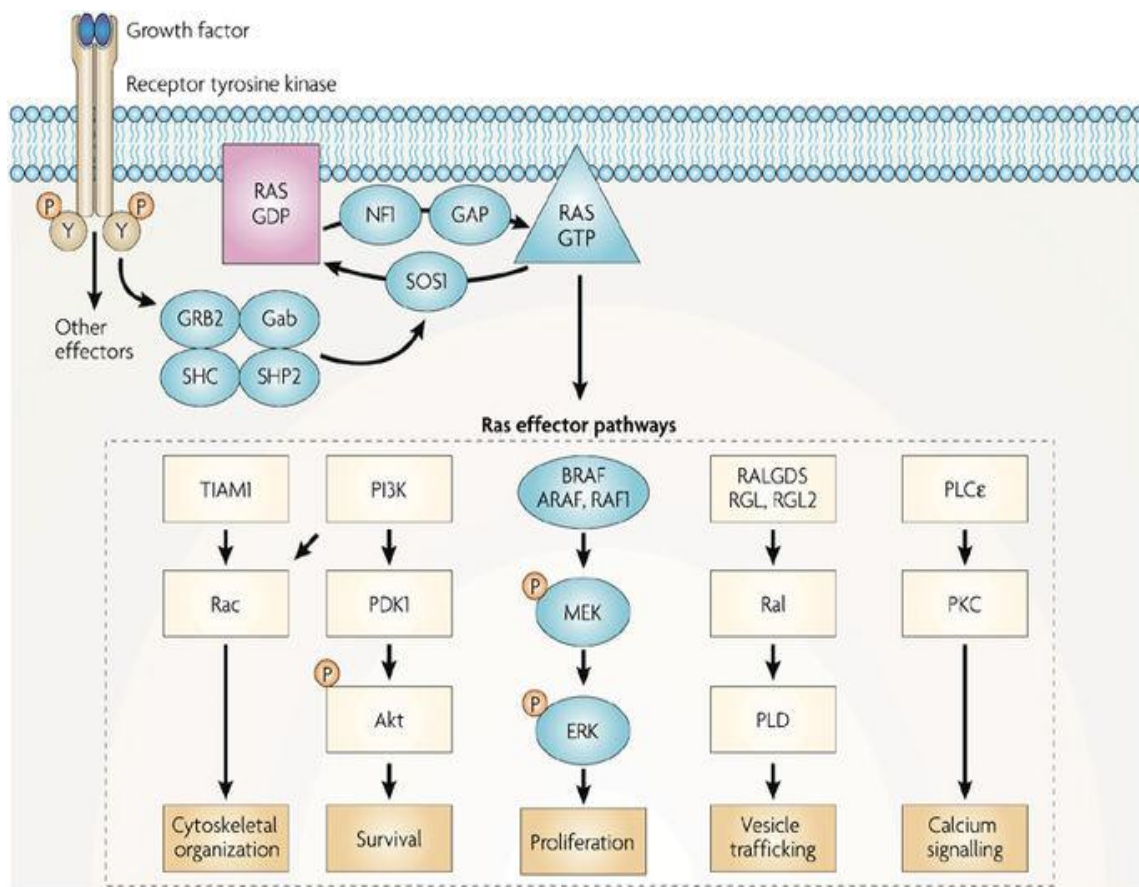


Figure 4: Voies de signalisation de RAS (Schubbert et al., 2007). L'activation de la voie RAS par des récepteurs membranaire active une série des voies de signalisation différentes. Ces voies de signalisation vont engendrer l'expression génétique de plusieurs proéitines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire.

Exemple 2 : Gène Myc

Le gène Myc code pour une protéine régulatrice de l'expression des gènes ; un facteur de transcription essentiellement pour la transformation tumorale (Figure 5). Il est muté dans de nombreux cancers ce qui rend la protéine hyperfonctionnelle accélérant ainsi la division cellulaire (Fallah et al., 2017). Le gène myc est muté par des carcinogènes chimiques qui induisent des remaniements chromosomiques, des translocations ou des amplifications sur Myc. Par ailleurs, le gène Myc est ciblé également par des rétrovirus constituant donc pour les oncologues une première intégration entre les deux voies de transformation virale et chimique, qui ont été *en priori* indépendantes (Fallah et al., 2017).

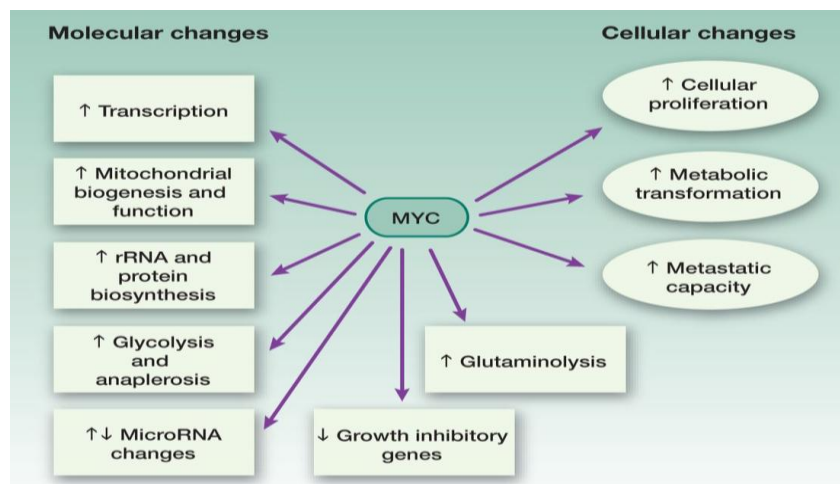


Figure 5: Voies d'activation via la protéine myc (Miller et al., 2012). Le gène myc code pour un facteur de transcription capable d'induire l'expression génique des protéines impliquées dans plusieurs fonctions biologiques telles que la survie, la différenciation, la régulation métabolique.

1.2.2. Anti-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur

Les anti-oncogènes ou gènes suppresseurs des tumeurs sont des gènes qui inhibent à la prolifération cellulaire orientant ainsi la cellule vers la mort cellulaire programmée ou la sénescence. Ces gènes interviennent lors de la division cellulaire symétrique et asymétrique (chez les cellules souches).

Exemple 1 : protéine P53

C'est le chef d'orchestre de différents types de stress quel que soit génotoxique, oxydant ou nutritionnel. Ce facteur de transcription intègre les signaux de différents capteurs de l'état de la cellule et active des gènes qui vont aiguiller la cellule vers la vie ou vers la mort (Figure 6). La protéine P53 peut également induire la sénescence, un arrêt irréversible de la croissance, impliquée dans le vieillissement physiologique (Laptenko et Prives, 2017). Le gène est l'un des gènes majeurs du cancer, il est en fait perdu, muté ou inactivé dans près de la moitié des

tumeurs. Les mutations se localisant sur quelques acides aminés qui sont en contact direct avec l'ADN. La protéine P53 a également un rôle essentiel aussi dans le contrôle du métabolisme. En effet beaucoup de cellules cancéreuses captent avidement les sucres, ils ne les dégradent pas complètement, réutilisant les métabolites pour reconstruire des briques des acides nucléiques ou des acides aminés (Bansaasd et Vousden, 2007).

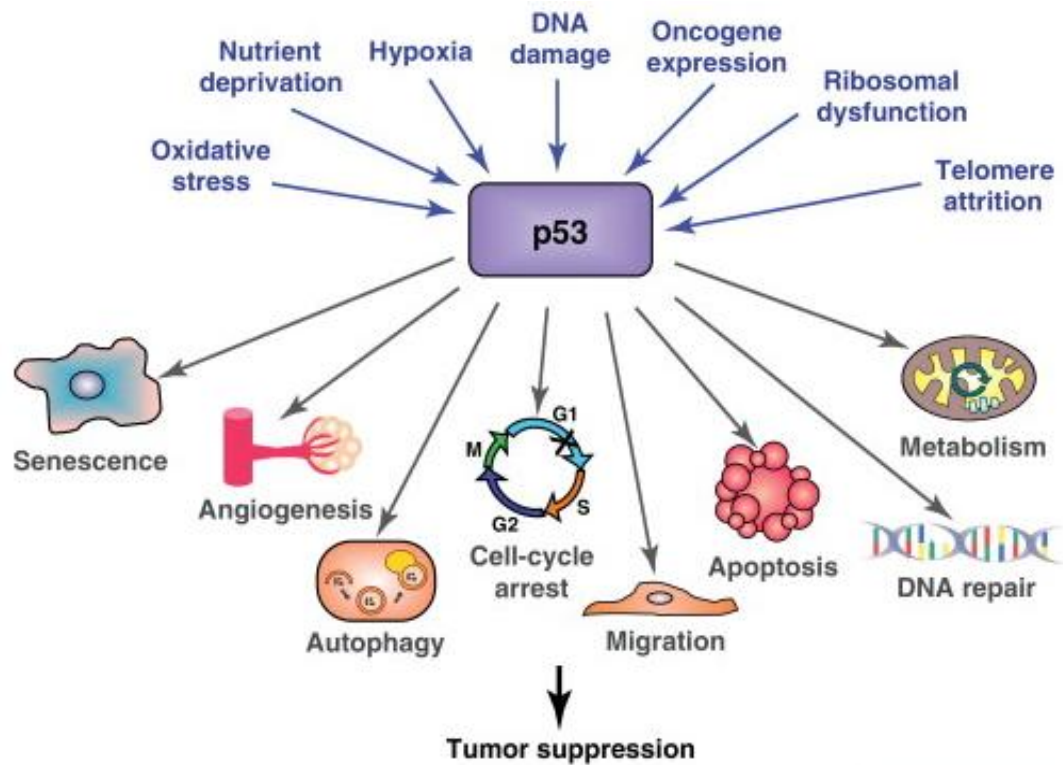


Figure 6: Maintien de l'intégrité cellulaire via la protéine P53 (Bansaasd et Vousden, 2007). La protéine P53 est un facteur de transcription qui intègre les signaux de différents stress extrinsèques et/ou intrinsèques tels que les dommages d'ADN, stress oxydant, expression des oncogènes et l'hypoxie. Grâce à sa capacité de se lier à des nombreux promoteurs, la protéine P53 répond aux différents types de stress par l'activation spécifique des plusieurs réponses biologiques telles l'induction de la sénescence, de l'apoptose, de l'autophagie, la réparation de l'ADN, l'inhibition de l'angiogénèse, du cycle cellulaire et des métastases.

Exemple 2 : protéine RB

La protéine du rétinoblastome (pRB) (Retinoblastoma Protein) fonctionne au centre de la régulation du cycle cellulaire (Figure 7) (Lin et al., 1996 ; Chin et al., 1998). En effet, elle constitue un lien de régulation entre le cycle cellulaire et les facteurs de transcription des gènes nécessaires à sa progression de la phase G1 à la phase S. L'état de phosphorylation de RB régule la progression du cycle cellulaire (Vélez-Cruz et Johnson, 2017). En effet, la protéine RB contient des sites potentiels de phosphorylation exposés sur la sérine et la thréonine et l'inhibition de cette phosphorylation entraîne un arrêt de la division cellulaire. Généralement, la protéine RB est hypophosphorylée dans la phase quiescente G0/G1, hyperphosphorylée à la fin de la phase G1 et déphosphorylée pendant la mitose. La stimulation mitogénique des cellules active la synthèse

des cyclines de type D, qui s'associe pour former un complexe binaire avec des cyclines dépendantes des kinases (CDK) (Vélez-Cruz et Johnson, 2017).

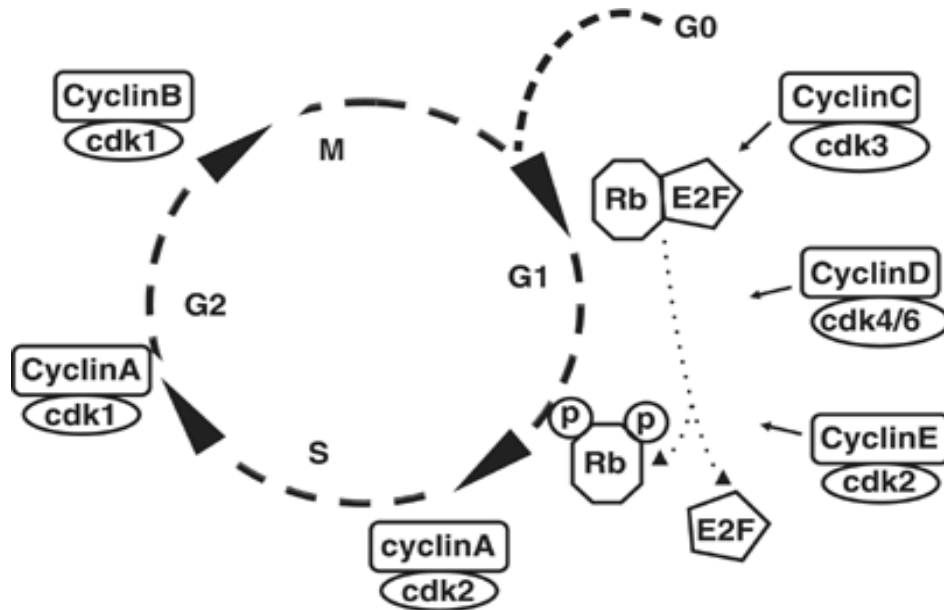


Figure 7: Voie de contrôle via la protéine RB (Giancinti et Giordano, 2006). La protéine RB fonctionne au centre de la prolifération cellulaire. L'état de phosphorylation de RB régule la progression du cycle cellulaire. Au cours du début G1, la protéine RB est hypophosphorylée ce qui permet sa liaison avec le facteur de transcription E2F induisant ainsi sa séquestration. La séquestration de E2F inhibe le déclenchement de la progression du cycle cellulaire du point de contrôle G1 à la phase S. Après le point de contrôle G1, la protéine RB devient hyperphosphorylée, libérant E2F et le cycle cellulaire peut ainsi avancer en phase S.

✓ Inactivation des antioncogènes

Contrairement aux mutations activatrices des oncogènes, les anti-oncogènes tels que Rb et P53 sont des cibles privilégiées des mutations inactivatrices qui rendent la protéine non fonctionnelle. Par ailleurs, certains virus oncogènes tels que ceux de la famille de *Papilloma* (virus responsables des verrues ou des cancers du col utérin) possèdent des protéines qui inactivent Rb et/ou P53, ce qui leur permet de provoquer la prolifération cellulaire et de bloquer la sénescence résultant de cette mise en cycle brutale et inappropriée (Spurgeon et Lambert, 2017). De plus, d'autres mécanismes inactivant les fonctions des antioncogènes sont liés à l'inhibition de leur expressions via des mécanismes épigénétiques. En effet, la distinction épigénétique d'un gène de réparation de l'ADN (MLH1 : *Human MutL Homolog 1*) est directement impliquée dans l'instabilité génétique à l'origine d'une forme de cancer du côlon (Chen, 2017 ; Gelsomino et al., 2016). De plus, des mutations touchant les régulateurs des voies épigénétiques telles l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT 1), enzyme qui recopie les patrons de

méthylation de l'ADN après sa réplication, sont directement impliquées dans l'initiation des leucémies myéloïdes (Kar et al., 2012).

1.2.3. Coopération oncogénique

La transformation tumorale commence avec des événements déclenchants tels que des mutations initiatrices qui vont donner naissance au premier clone qui sera limité très souvent par l'activation de P53 ; il y a donc une bouffée de prolifération suivie d'une induction de la sénescence. L'exemple le plus représentatif est l'induction de division par la mutation activatrice de RAS et l'arrêt de prolifération et induction de sénescence par P53. Ce clone peut passer plusieurs années, c'est le temps nécessaire pour avoir une deuxième mutation, les cellules vont passer alors à une deuxième expansion clonale qui s'accompagne très souvent par un taux de mutation très élevé et par une instabilité génétique frappante, induite par la perte de P53. Les clones parallèles transformés vont ainsi évoluer, ce qui induit le passage d'une situation monoclonale à une autre oligoclonale (Ferraiuolo et al., 2016). L'exemple de RSV (*Rous Sarcoma Virus*) est un excellent modèle dans la biologie du cancer, puisqu'il présente un type monoclonal. Cependant, dans la vraie histoire de transformation tumorale, les événements de transformation sont séquentiels et surviennent les uns après les autres dans un modèle oligoclonal, et ceci a causé des réels problèmes dans la récurrence ou les traitements imparfaits. Aujourd'hui, les preuves d'une transformation multi-étapes sont confirmées par l'analyse d'ADN virale induisant la tumeur. En effet, contrairement aux rétrovirus à ARN monocaténaux, qui transduisent des séquences transformantes (c'est-à-dire des oncogènes) du génome de l'hôte, les virus tumoraux à ADN codent pour des multiples protéines transformantes par la production d'ARNm *via* l'épissage alternatif. Cette observation a discerné biochimiquement l'immortalisation et la transformation comme étapes discrètes dans le développement de la tumeur (De Paoli et Carbone, 2015). Plusieurs de ces virus ont été impliqués de manière étiologique dans le cancer humain, y compris le virus Epstein-Barr (EBV) dans le carcinome nasopharyngé et le lymphome de Burkitt ou le papillomavirus humain (VPH) dans le carcinome cervical (Alberts et al., 1994 ; Weinberg, 1989).

Le paradigme de la coopération entre les oncogènes cellulaires a été établi aujourd'hui par la démonstration que RAS et MYC coopèrent dans la transformation complète des fibroblastes primitifs d'embryons de rat, alors qu'aucun des deux gènes ne se transforme par lui-même. L'activation combinatoire de RAS et Myc transforme les cellules *in vitro* avec un temps très réduit par rapport au temps de transformation en utilisant RAS ou Myc seuls (Enomoto et al., 2015).

La protéine RAS a semblé conférer des propriétés de transformation de phénotype, alors que MYC a provoqué l'immortalisation. La coopération fonctionnelle entre les oncogènes compétents

en matière de transformation et d'immortalisation a été confirmée dans plusieurs milieux cellulaires *in vitro* et la synergie en transformation a été soutenue par des preuves *in vivo* générées dans des études de souris transgéniques (Enomoto et al., 2015). D'autres oncogènes ont été remplacés par la fonction RAS ou MYC. Les oncoprotéines induisant l'immortalisation se situent typiquement dans le noyau, tandis que celles qui confèrent des propriétés de transformation morphologique représentent des protéines cytosoliques ou membranaires. La catégorie des protéines du noyau comprend des facteurs de transcription ou des molécules directement affectant le mécanisme de régulation du cycle cellulaire. Les oncogènes qui sont capables de transformer la morphologie cellulaire codent pour des protéines contrôlant les cascades de signalisation associées aux récepteurs (De Paoli et Carbone, 2015). La coopération entre le RAS et le mutant P53 a fourni des preuves mécanistiques précoces de synergie dans la transformation néoplasique d'un oncogène activé et d'un suppresseur inactivé, car l'expression du gène mutant P53 a minimisé la fonction de P53 normal (Hunter, 1991 ; Weinberg, 1989).

Par ailleurs, les cancérrogènes chimiques dans les modèles expérimentaux animaux provoquent l'activation des proto-oncogènes. Le type de mutation observé est compatible avec l'effet mutagène connu du composé chimique. Bien que l'activation de l'oncogène représente l'événement mutagène initiateur, il n'est guère suffisant pour le développement de la tumeur (De Paoli et Carbone, 2015). Ceci a été vérifié expérimentalement dans le modèle en deux étapes de la carcinogenèse cutanée de la souris, dans lequel la progression de la tumeur s'effectue par un traitement avec un ester de phorbol après l'initiation par le mutagène. Dans d'autres modèles, cela se traduit par des conditions physiologiques particulières de l'organisme coïncidant avec l'induction tumorale par des agents cancérrogènes chimiques uniques (Hunter, 1991).

1.3. Caractéristiques générales des cellules cancéreuses

- **Autosuffisance des signaux de croissance** : Contrairement aux cellules qui dépendent des signaux de croissance pour leur passage de l'état inactif à celui de prolifération, les cellules cancéreuses ont la capacité à synthétiser des facteurs de croissance auxquelles elles sont sensibles (Figure 8). Elles mettent en place une boucle d'auto-stimulation pour la sécrétion de facteurs de croissance. Les cellules cancéreuses ont acquis alors une indépendance face aux signaux extérieurs (Hanahan et Weinberg, 2011).

- **Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs** : Les signaux anti-prolifératifs sont transmis à la cellule normale par des récepteurs membranaires et proviennent de la cellule même, des cellules voisines ou encore de la matrice extracellulaire. Alors que les cellules cancéreuses ont le pouvoir de s'attaquer directement aux constituants moléculaires qui contrôlent le cycle cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2011).

- **Prolifération illimitée** : Les cellules cancéreuses sont immortelles, le nombre de réplication qui traduit l'âge des cellules normales est mesuré par le nombre de répétition situées à l'extrémité des chromosomes dans des domaines appelés télomères. Chaque cycle de réplication de l'ADN cellulaire conduit à la perte d'une répétition. Cette érosion des télomères conduit ainsi à la sénescence dépendante de P53 (Figure 8). Les télomères peuvent être restaurés par une enzyme ; la télomérase fortement exprimée dans les cellules souches normales. Dans le cancer, des mutations qui provoquent constitutivement l'activation de cette télomérase dès les premiers stades de la transformation. Ainsi avant la transformation la cellule commence par devenir immortelle (Hanahan et Weinberg, 2011).

- **Angiogenèse** : Les cellules tumorales ont la capacité d'induire la formation des vaisseaux sanguins pour apporter leur nutrition. L'angiogenèse est stimulée par un facteur essentiel VEGF qui induit la prolifération des cellules endothéliales pour vasculariser la tumeur (Bretagne et al., 2016).

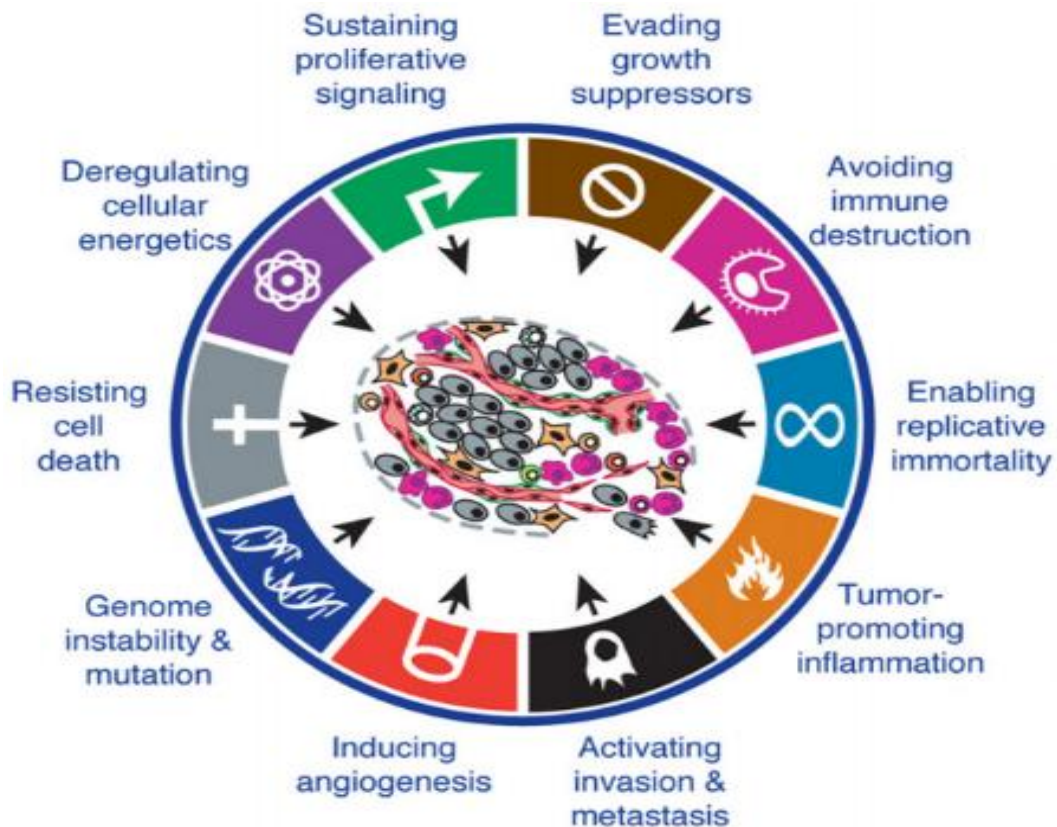


Figure 8: Caractéristiques générales des cellules cancéreuses et les cibles pharmacologiques possibles (Hanahan et Weinberg, 2011).

1.4.5. Diffusion métastatique

La formation de métastases est la dernière étape dans le processus de cancérisation. Les cellules malignes ont la capacité de s'échapper de la tumeur primaire et envahir des nouveaux tissus, afin de développer une nouvelle tumeur. Ces cellules capables de faire la rupture des jonctions cellulaires telles que les cadhérines et les intégrines (Pascucci et al., 2016).

1.4.6. Instabilité génomique et épigénomique

Les cellules tumorales accumulent des mutations séquentielles ce qui induit l'instabilité génétique. De plus, les marques épigénétiques sont totalement perturbées chez les cellules tumorales donnant à ce qu'on appelle des situations métastables ([Hanahan et Weinberg, 2011](#)).

1.4. Thérapie ciblée du cancer

La thérapie ciblée du cancer vise à cibler de manière très spécifique telle ou telle étape du processus de cancérisation. En effet, la compréhension des mécanismes de transformation tumorale a connu un réel changement de paradigme. Par le déchiffrement des voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse, plusieurs pistes de la thérapeutique ciblée voient le jour telles que la thérapie ciblée enzymatique, immunologique, transcriptionnelle et épigénétique.

1.4.1. Thérapie enzymatique

La prolifération cellulaire est déclenchée par des signaux qui activent la division cellulaire. Les cascades de signalisation font intervenir l'activation biochimique. Les enzymes impliquées telles que les tyrosines kinases sont des cibles majeures pour la thérapie enzymatique cancéreuse. En effet, plusieurs inhibiteurs des tyrosines kinases ont été développés dans des dernières années. Par exemple, l'imatinib ou Gleevec® (2-phenylanimopyrimidine) inhibe la protéine kinase par la compétition sur l'ATP ce qui inactive la phosphorylation du complexe BCR-ABL (complexe oncogénique impliqué dans la leucémie) inhibant ainsi la prolifération cellulaire chez la leucémie myéloproliférative chronique ([Figure 9](#)). Cette thérapie enzymatique induit la disparition totale des cellules leucémiques et donc parvient à une guérison de la maladie ([Branford et al., 2009](#)).

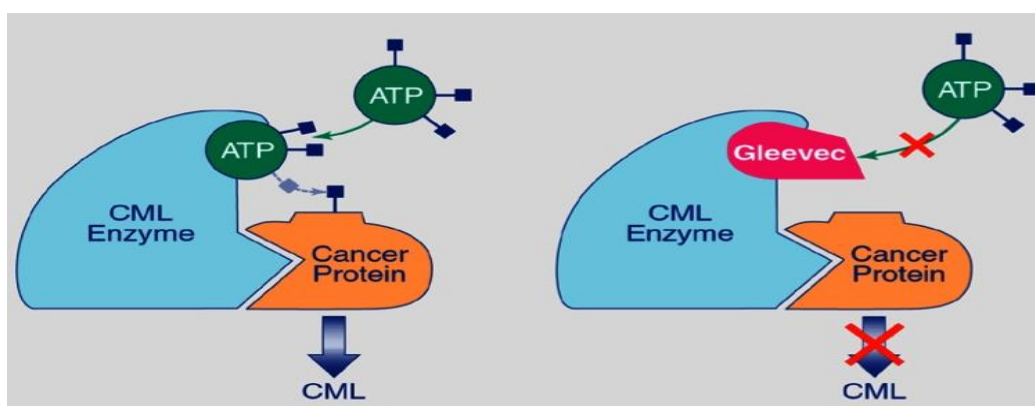


Figure 9: Inhibition enzymatique du récepteur par Gleevec ([Goodman et Gerson, 2013](#)).

1.4.2. Thérapie transcriptionnelle

La thérapie transcriptionnelle ciblée est un moyen de réactiver ou bien réprimer la transcription des facteurs induisant la transformation tumorale. Plusieurs molécules ont été développées pour modifier l'expression génique dans les cellules tumorales. Le cancer auquel la thérapie

transcriptionnelle a été bien développée est la leucémie chronique ([Bourdeau et Ferbeyre, 2014](#)). Cette maladie est liée à un produit de translocation qui donne lieu à une protéine de fusion PML/RARα (*Promyelocytic Leukaemia/ Retinoic Acid Receptor Alpha*); un véritable oncogène qui réprime plusieurs facteurs de transcription qui ne sont pas liés à l'acide rétinoïde. Cette répression ectopique de beaucoup de gènes va conduire au blocage de la différenciation cellulaire et l'induction de l'autorenouvellement. La combinaison entre l'acide rétinoïde et l'arsenic a connu un réel succès de guérison pour la leucémie chronique. Le complexe acide rétinoïde et arsenic réactive l'expression des gènes de différenciation et libère le domaine PML ([Figure 10](#)). Ceci permet de recruter le facteur de transcription P53 *via* des mécanismes épigénétiques, ce qui conduit les cellules tumorales à la sénescence dépendante de P53 ([Bourdeau et Ferbeyre, 2014](#)).

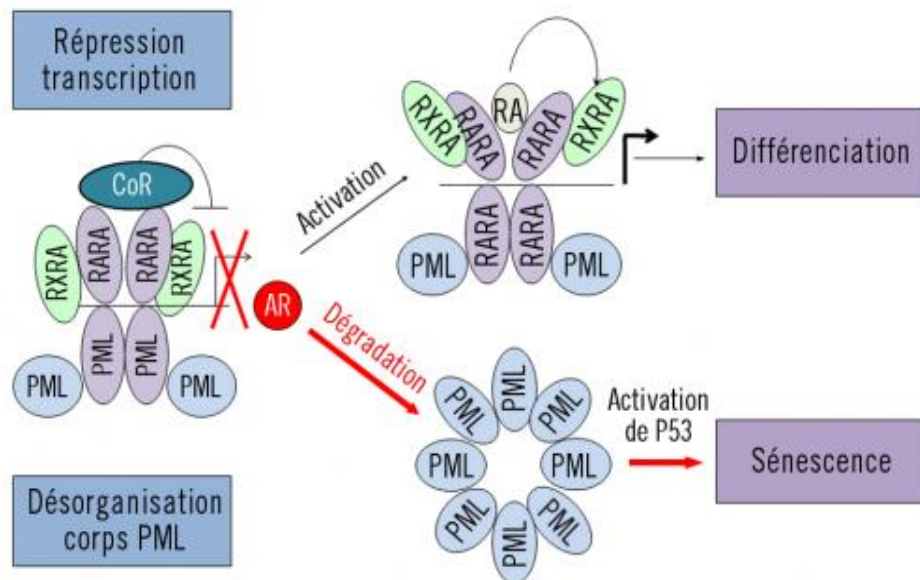


Figure 10: Modèle physiopathologique expliquant l'action de l'acide rétinoïque ([Ablain et al., 2014](#)). PML/RARα a une double fonction : répression de la transcription des gènes et désorganisation des corps nucléaires PML. En réponse à l'acide rétinoïque (AR), la réactivation transcriptionnelle est responsable de la différenciation cellulaire. La dégradation de PML/RARα par l'acide rétinoïque ou l'arsenic permet la reformation des corps nucléaires, l'activation de P53 et l'élimination des cellules leucémiques.

1.4.3. Thérapie immunologique

L'immunothérapie ciblée consiste à utiliser des anticorps monoclonaux pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Les anticorps anti-CD20 (molécules présente à la surface des lymphomes) ont été développés pour cibler spécifiquement la lignée lymphocytaire B, et sont indiqués dans de nombreuses hémopathies lymphoïdes B et dans certaines maladies auto-immunes. Parmi ces anti-corps développés on trouve la Rituximab qui provoque la lyse des cellules tumorales par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ([Renaudineau et al.,](#)

2009). D'autres anticorps monoclonaux ont été également développés pour bloquer la prolifération cellulaire, c'est le cas des anticorps qui bloquent les récepteurs de l'ostrogène HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*) dans le cancer du sein. En effet, le trastuzumab bloque spécifiquement le récepteur HER-2 et induit une régression tumorale importante du cancer du sein métastatique. Le mécanisme de la destruction est lié à la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps. Plusieurs anticorps monoclonaux ont ciblé aujourd'hui l'angiogenèse en inhibant le facteur de croissance de l'endothélium ; VEGF: (*Vascular endothelial growth factor*). Le Bévacizumab par exemple inhibe le VEGF-A conduisant ainsi à des effets antiangiogéniques dans de nombreux cancers tels que les cancers bronchiques non épidermoïdes, les cancers colorectaux, les adénocarcinomes ovariens et les cancers métastatiques du cancer du rein (Bouزيد, 2012).

1.4.4. Thérapie épigénétique : Epi-drogues

Contrairement aux causes génétiques du cancer qui affectent la séquence de l'ADN, les modifications épigénétiques sont réversibles, ce qui ouvre des perspectives prometteuses en thérapie. Deux grandes familles d'inhibiteurs sont disponibles, les inhibiteurs des méthyltransférases de l'ADN (DNMT) ou des histone-désacétylases (HDAC) (Egger et al., 2004). La 5-azacytidine, la 5-aza-2'-désoxycytidine et leurs analogues sont des inhibiteurs des DNMT, qu'elles piègent en s'intégrant dans l'ADN à la place de résidus cytosine, permettant ainsi la réexpression de gènes suppresseurs de tumeur éteints par l'hypométhylation (Figure 11). Plusieurs dérivés modifiés pour diminuer la cytotoxicité de ces composés et augmenter leur stabilité en solution aqueuse ont été utilisés en tests cliniques, et ont donné des résultats significatifs dans le traitement de différents types de leucémie (Villar-Garea et Esteller, 2003). Les inhibiteurs d'HDAC sont quant à eux regroupés en quatre groupes selon leur classe structurale. Parmi les plus connus, on peut citer des acides gras à courte chaîne, comme le butyrate, des acides hydroxamiques, comme la trichostatine A (TSA), et des tétrapeptides cycliques, comme la trapoxine. Dans le cas de leucémies promyélocyaires aiguës résistantes au traitement par l'acide rétinoïque (ATRA), l'utilisation conjointe d'inhibiteurs d'HDAC et d'ATRA induit des rémissions (Claus et Lübbert, 2003). La démonstration du dialogue entre la méthylation des histones et celle de l'ADN (Fahrner et Baylin, 2004), ainsi que les nombreux résultats expérimentaux obtenus sur diverses lignées cellulaires orientent les protocoles thérapeutiques vers une utilisation conjointe de ces deux types d'inhibiteurs, ou en complément de thérapies classiques (Bachman et al., 2003). En dépit de nombreux problèmes encore à résoudre, notamment de toxicité et de spécificité, et même si tous les mécanismes moléculaires ne sont pas encore totalement élucidés (Gius et al., 2004), cette nouvelle approche thérapeutique est sans aucun doute promise à un bel avenir.

2. Activité anticancéreuse des plantes médicinales

2.1. Activité antitumorales des plantes médicinales du Maroc

Les plantes médicinales représentent une bonne source de molécules bioactives qui ont plusieurs effets agonistes et / ou antagonistes contre plusieurs voies mécanistiques cellulaires. Par conséquent, ces molécules sont une stratégie très spécifique pour limiter et / ou inhiber la croissance des lignées cellulaires cancéreuses. Au Maroc, plusieurs études, dont certaines dans notre laboratoire, ont été menées et ont suggéré l'activité antitumorale potentielle des plantes médicinales (Merghoub et al., 2016 ; Merghoub et al., 2009 ; Merghoub et al., 2011 ; Belayachi et al., 2013).

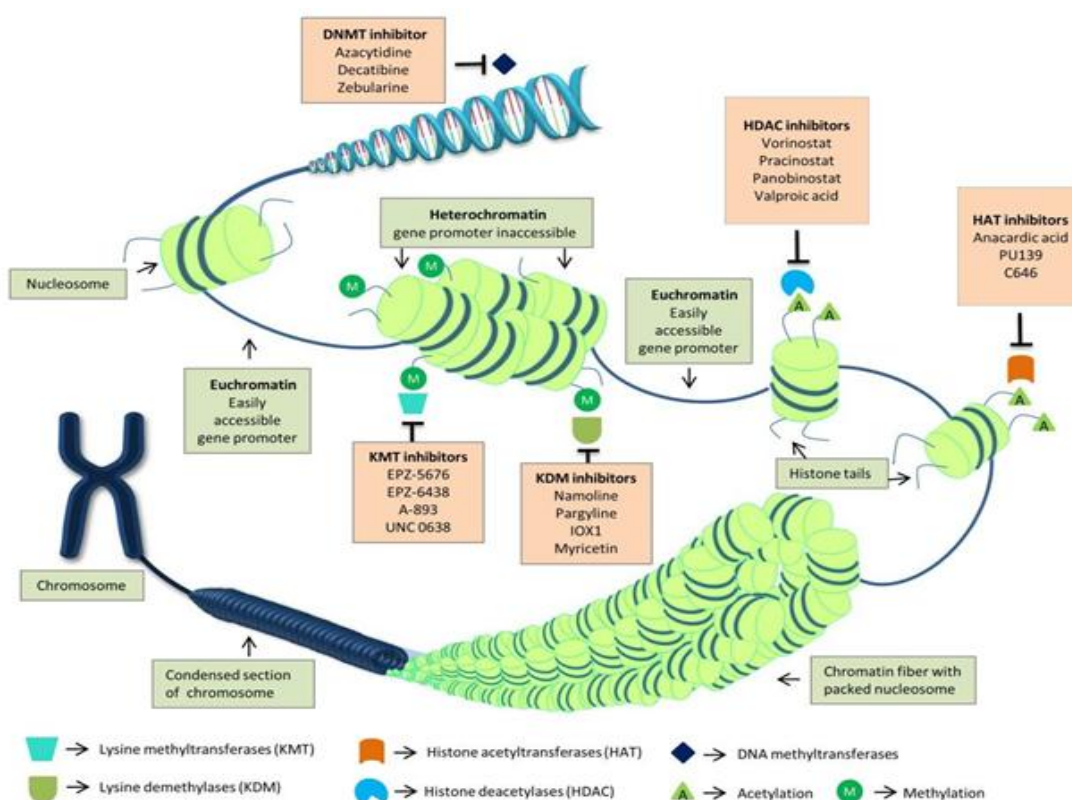


Figure 11: Cibles épigénétique du cancer (Biswaw et Rao, 2017). La modification des protéines d'histones sur le nucleosome est réalisée par plusieurs enzymes telles que HAT, HDAC, KMT et KDMs. Ces enzymes sont aujourd'hui les cibles épigénétiques de plusieurs inhibiteurs. Les enzymes de méthyltransférases (DNMT) sont aussi explorées pour le développement des drogues épigénétiques.

L'HE de *Senecio leucanthemifolius* a été testée contre la lignée HeLa (lignée cellulaire cancéreuse du col d'utérus humain) en utilisant le test de cristal violet (Benbacer et al., 2012). Cette HE a montré une activité cytotoxique importante contre HeLa ($IC_{50}=1.158 \mu\text{L/mL}$). L'effet a été attribué à quatre composés majeurs (α -Hydroxy-p-cyme, carvacrol, nerol et carveol) présents dans cette huile. Dans une autre étude, Mezzoug et al. (2007) ont testé l'HE d'*O. compactum* pour sa anti-mutagénicité et le résultat s'est révélée prometteur. L'inhibition est corrélée avec la

présence du carvacrol, composé majeur de cette HE. Les extraits organiques d'Origan sont étudiés par [Chaouki et al. \(2015\)](#) pour leur activité cytotoxique contre les lignées cellulaires tumorales A549 et SMMC-7721 en utilisant le test MTT. Ils ont montré une capacité cytotoxique d'extrait d'acétate d'éthyle contre A549 ($IC_{50}=198\pm12\mu\text{g/mL}$) et SMMC-7721 ($IC_{50}=266\pm14\mu\text{g/mL}$) ([Chaouki et al., 2015](#)).

Dans notre laboratoire, plusieurs chercheurs ont étudié les activités antitumorales des plantes médicinales. En effet, Merghoub et al. ont examiné les effets cytotoxiques des extraits méthanoliques de *Retama monosperma*, *Inula viscosa*, *Berberis hispanica*, *Ormenis eriolepis*, *Ormenis mixta*, *Rhamnus lycioides* et *Urginea maritima* contre les lignées cellulaires Hela et SiHa. L'extrait méthanique d'*I. viscosa* a montré une capacité cytotoxique importante contre la lignée cellulaire SiHa ($IC_{50}=54\mu\text{g/mL}$) et Hela ($IC_{50}=60\mu\text{g/mL}$), alors que l'extrait méthanolique d'*O. eriolepis* a inhibé la prolifération de SiHa et Hela avec des concentrations de $IC_{50}=94$ et $IC_{50}=96\mu\text{g/mL}$ respectivement ([Merghoub et al., 2009](#)). [Merghoub et al. \(2016\)](#) ont étudié les actions cytotoxiques et pro-apoptotiques des fractions de dichlorométhane et des extraits de n-hexane de *I. viscosa* contre les lignées cellulaires SiHa et HeLa. Les auteurs ont démontré que les extraits de dichlorométhane et d'hexane de *I. viscosa* ont inhibé la croissance des cellules HeLa et SiHa de manière dose-dépendante. L'extrait hexanique et de dichlorométhane d'*I. viscosa* sont liés à un effet anti-téломérase et un raccourcissement induit du télomère. Un autre mécanisme est lié à la capacité de ces extraits à induire l'apoptose via des effets sur l'annexin-V et la caspase-3 ([Merghoub et al., 2016](#)). D'autre part, [Belayachi et al. \(2013\)](#) ont criblé l'effet cytotoxique des extraits d'hexane, du méthanol, d'acétate d'éthyle et de dichlorométhane d'*I. viscosa*, *R. monosperma*, *O. eriolepis* et *Marrubium vulgare* sur plusieurs lignées cancéreuses ([Belayachi et al., 2013](#)). Tous les extraits ont inhibé la croissance de la majorité des lignées tumorales testées. Cependant, l'extrait d'hexane a montré des effets cytotoxiques à de faibles concentrations ($IC_{50}=5.9\pm3.57\mu\text{g/mL}$) contre le glioblastome épithélial (LN229).

2.2. Mécanismes d'action anticancéreux des plantes médicinales

Bien que plusieurs recherches aient été réalisées dans le domaine de la chimiothérapie en utilisant des substances isolées à partir de plantes médicinales, peu d'études ont abordé le mécanisme par lequel un extrait entier ou l'un de ses constituants agit sur les cellules tumorales. Et même si la plupart des études rapportent une toxicité spécifique sur les cellules cancéreuses en l'absence d'une toxicité sur les cellules témoins, certains composés tels que le safrole ou l'isoeugénol sont bien connus comme des molécules dangereuses, et l'évaluation de la toxicité des constituants des extraits et des HE *in vitro* et, en particulier, *in vivo* est d'une importance cruciale ([Bakkali et al., 2008](#)). Les mécanismes mis en jeu sont très divers, allant des niveaux structuraux à des niveaux moléculaires (régulation de transcription génique), en passant par des

niveaux métaboliques (production des espèces réactives d'oxygène chez les cellules cancéreuses).

2.2.1. Inhibition de l'inflammation et du stress oxydatif

L'inflammation et le stress oxydatif sont des phénomènes associés à la progression du cancer, mais seraient aussi probablement associés à sa genèse (Cole et al., 2007 ; Topc et al., 2005 ; Hou et al., 2007). De nombreuses études ont démontré que les effets anticancéreux de certains composés des HE sont associés à la diminution de l'inflammation et au stress oxydatif. Le limonène, par exemple, rétablit le niveau de réduction de la glutathion-peroxydase, de la catalase, du glutathion et de la réductase (Buhagiar et al., 1999). L'eugénol restaure également les niveaux de glutathion dans la peau soumise à l'agent cancérigène DMBA, et le géraniol inhibe la production de facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) qui est un facteur de transcription clé des protéines proinflammatoires dans le corps (Kaur et al., 2010 ; Ahmed et al., 2008). Le lien entre l'action inflammatoire de NF- κ B et le développement du cancer, la résistance thérapeutique dans le développement de tumeurs, l'angiogenèse et la métastase dans le cancer est bien établi et décrit (Brown et al., 2008). L'eugénol réduit en effet le NF- κ B dans le traitement des carcinomes gastriques induits chez le rat (Manikandan et al., 2010). D'autres études ont montré que des composés comme l'eugénol diminuent l'inflammation en agissant sur d'autres facteurs tels que la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), des cytokines et des facteurs inflammatoires, tels que l'IL-1 β , IL-6, TNF-alpha et PGE2 (Hussain et al., 2011).

2.2.2. Production d'espèces réactives de l'oxygène dans la cellule cancéreuse

L'augmentation des radicaux libres et du stress oxydatif dans la cellule cancéreuse ont un effet antitumoral. Plusieurs constituants terpéniques des HE tels que le β -caryophyllène peuvent induire spécifiquement la production des ROS (reactive oxygen species) dans les mitochondries des cellules cancéreuses sans augmenter le niveau du stress oxydatif dans les cellules normales (Park et al., 2011). Le thymol semble produire un radical phénoxy, un intermédiaire stable, qui génère des radicaux libres et des dérivés oxydés de quinones, qui sont associés à la mort des cellules de mélanome et d'ostéosarcome (Satooka et Kubo, 2012 ; Chang et al., 2011). De plus, Deb Dipanwita et al. (2011) ont démontré que le thymol augmente la production de peroxyde d'hydrogène dans les mitochondries des cellules cancéreuses. L'eugénol produit également le stress oxydatif dans les cellules cancéreuses et diminue les niveaux de glutathion (Vidhya et al., 2011).

2.2.3. Surexpression et désintoxication du foie

Le blocage d'enzymes de la phase d'initiation de la cancérogenèse par certains terpénoïdes est probablement associé à l'induction des enzymes de phase I et de phase II du métabolisme des

xénobiotiques, ce qui permet de métaboliser les cancérrogènes et de réduire leur impact sur l'ADN et, par conséquent, la diminution des risques liés à l'apparition d'un cancer. La glutathion-S-transférase est parmi les enzymes les plus importants, dont l'activité est augmentée de 30 % par l'action des terpénoïdes tels que le limonène (composé majoritaire retrouvé dans l'HE de citron) (Buhagiar et al., 1999).

2.2.4. Modification du potentiel membranaire des mitochondries

Un nombre croissant d'études démontrent que les effets bénéfiques des plantes médicinales contre le cancer sont associés à un changement dans la polarisation de la membrane des cellules cancéreuses et, en particulier, dans la membrane mitochondriale. En effet, les terpénoïdes sont très lipophiles et ont une haute affinité pour les membranes cellulaires. Kim et al. (2012) ont démontré que l'induction de l'apoptose par le géraniol dans le cancer de la prostate est associée à une dépolarisation de la membrane mitochondriale dans ces cellules cancéreuses. De plus, les cellules cancéreuses sont souvent hyperpolarisées, et les terpènes contribuent à leur dépolarisation et restaurent les processus normaux de la cellule, y compris l'apoptose. Le α -bisabolol et le thymol sont également efficaces *ex vivo* contre les leucémies lymphoïdes et myéloïdes aiguës en dépolarisant la membrane des mitochondries (Deb Dipanwita et al., 2011 ; Cavaliere et al., 2011). Le germacrone semble avoir également un effet dépolarisant sur la membrane mitochondriale des cellules cancéreuses dans le cancer du sein, et le géraniol induit la dépolarisation de la membrane des cellules du côlon (Cardozo et al., 2011 ; Chen et al., 2011).

D'autres terpènes, tels que le β -élémane, modifient également la membrane des cellules cancéreuses. Sous l'action des terpénoïdes, les mitochondries des cellules cancéreuses libèrent des co-facteurs tels que le cytochrome C, qui activera l'apoptose d'une manière caspase-dépendante. L'une des voies est l'ouverture des pores de transition à travers la membrane mitochondriale, ce qui permet du coup l'augmentation de la perméabilité mitochondriale interne de la membrane à l'eau et les molécules de taille inférieure à 1,5 kDa. Les terpénoïdes tels que le α -bisabolol semblent cibler ce système (Darra et al., 2008 ; Cavaliere et al., 2009). La variation du potentiel de la membrane peut moduler l'ouverture ou la fermeture des canaux ioniques (qui peut altérer le pH intracellulaire) et induire des réactions multiples dans la cellule. Par exemple, le thymol et le carvacrol à 200 μ M semblent capables d'induire l'apoptose *via* la voie mitochondriale par l'ouverture des canaux calciques, qui produit la libération de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique des cellules cancéreuses de l'ostéosarcome (Chang et al., 2011 ; Hsu et al., 2011 ; Liang et Lu, 2012).

2.2.5. Activation de l'apoptose par les caspases

L'apoptose est l'une des voies cruciales avec lesquelles des agents anticancéreux ont été développés pour inhiber la croissance des cellules tumorales. Cependant, la résistance de ces dernières à la majorité des agents cytostatiques cause un problème majeur dans la thérapie anticancéreuse et, par conséquent, la compréhension mécanistique des voies de signalisation qui contrôlent l'induction de l'apoptose par les agents cytostatiques dans les cellules tumorales est un point extrêmement critique pour améliorer la thérapie anticancéreuse. Jusqu'à présent, peu d'agents anticancéreux, tels que les HE, semblent capables d'induire l'apoptose d'une façon tissu-dépendant. En effet, [Deb Dipanwita et al. \(2011\)](#) ont montré que le thymol induit l'apoptose d'une manière dose-dépendante dans la lignée cellulaire HL-60 *via* l'activation des voies indépendantes et dépendantes des caspases. [Gurung et al. \(2010\)](#) suggèrent que le thymoquinone induit le dommage de l'ADN, l'inhibition de la télomérase et l'induction de l'apoptose dans le glioblastome.

L'apoptose des cellules cancéreuses se produit par l'activation de certaines protéines de la famille des caspases. Plusieurs terpènes ont montré leur effet dans l'activation des caspases. Les caspases 3 et 9 sont activées dans les cellules leucémiques cultivées en présence de limonène ou de géraniol (caspase 3) dans de nombreux cancers (sur des cellules et tumeurs), en particulier dans la prostate ([Kim et al., 2012](#)) ou dans le cancer du rein (caspases 3, 8 et 9) ([Ahmad et al., 2011](#)). Autres terpènes tels que le β -caryophyllène peuvent aussi activer les caspases (caspase 3) ([Jaafari et al., 2012](#) ; [Park et al., 2011](#)), α -bisabolol (caspase 3, 8 et 9) ([Carnesecchi et al., 2002](#)), ou β -élémane (caspases 3, 7, 9 et 10) dans différentes lignées cellulaires de cancers de la prostate, de gliome, du sein, du côlon et du poumon ([Manikandan et al., 2010](#)), et le thymol (caspase 3, 8 et 9) dans la leucémie ([Deb Dipanwita et al., 2011](#)). Enfin, le germacrone active les caspases 3, 7 et 9 ([Zhong et al., 2011](#)).

2.2.6. Arrêt du cycle cellulaire

[Yin et al. \(2012\)](#) ont montré que le thymol induit l'arrêt de transition du cycle cellulaire de la phase G0 à la phase G1. [Rajput et al. \(2013\)](#) ont montré que le thymoquinone cible moléculairement la voie Akt et provoque l'arrêt du cycle cellulaire par l'inhibition de la cycline D1 et induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein. Dans une autre étude, [Tundis et al. \(2009\)](#) ont révélé l'implication des voies de PARP γ dans l'activité anticancéreuse de thymoquinone sur les cancers du sein. Des études *in vitro* ont démontré que la préexposition des cellules tumorales à la thymoquinone suivie par gemcitabine ou oxaliplatine a augmenté l'inhibition de croissance en comparaison avec gemcitabine ou oxaliplatine utilisée seule. Les mécanismes impliquent la dérégulation du NF- κ B, des gènes de la famille de Bcl-2, des gènes antiapoptotiques dépendant du NF- κ B ([Banerjee et al., 2009](#)). [Sethi et al. \(2008\)](#) ont également

montré que ce composé est impliqué dans l'activation des voies d'apoptose *via* la suppression de NF κ B. Chez l'homme, la thymoquinone inhibe la prolifération cellulaire dans les mélanomes, induit la chimiosensibilisation et active les voies de transcription de STAT (Jafri et al., 2009). Une autre étude réalisée par Yazan et al. (2009) a suggéré que ce composé avait un effet cytotoxique en induisant l'apoptose *via* une voie de signalisation dépendante de P53.

2.2.7. Modification des voies de signalisation

Inactivation de la voie PI3K/Akt/NF- κ B: L'inactivation de la voie PI3K/Akt/NF- κ B (*phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B/ nuclear factor-kappa B*) est un moyen également pour contrôler le développement du cancer. L'expression des gènes conduisant à l'activation de phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt a été observée dans de nombreux cancers, incluant la leucémie, ce qui rend cette voie une cible centrale pour le traitement du cancer. La voie de signalisation de la PI3K est impliquée à la fois dans le contrôle de la croissance cellulaire et du métabolisme du glucose. Elle influence la synthèse des protéines par l'intermédiaire de l'enzyme mTOR et aussi agit sur l'absorption et l'utilisation du glucose. L'activation de la voie PI3K rend les cellules cancéreuses-dépendantes de niveaux élevés au flux de glucose (Li et al., 2010). Ainsi, en limitant cette voie, certains composants tel le géraniol peuvent affecter l'aspect métabolique des cancers comme dans le cas du cancer de la prostate, ce qui nécessite de grandes quantités de glucose pour produire de l'énergie (Kim et al., 2012). En effet, les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie dans le cytoplasme de la cellule (fermentation de pyruvate en lactate, avec production seulement de deux molécules d'ATP par molécule de glucose) plutôt que la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (production de 36 molécules d'ATP par molécule de glucose). L'inhibition de mTOR par le géraniol dans les cellules cancéreuses peut également réactiver un processus appelé « autophagie » qui conduira à la mort de ces cellules (Kim et al., 2012). Les dérivés de β -caryophyllène aussi semblent agir par cette voie biochimique contre les cancers du sein et de la prostate (Zhong et al., 2011), l' α -bisabolol contre le cancer pancréatique, le β -élémane contre les cancers d'estomac et des poumons (Yazan et al., 2009 ; Buzzai et al., 2005).

Modification de la voie de l'AMPK: La protéine kinase activée par l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) est un capteur de l'état énergétique de la cellule et joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme énergétique. Si son rôle positif est décrit principalement pour le diabète de type II, sa fonction dans les cellules cancéreuses génère également un intérêt croissant. Cette protéine est un médiateur de la LKB1 (*Liver kinase B1*) suppresseur de tumeur, et sa stimulation reprogramme le métabolisme cellulaire et agit sur la voie biochimique de p53, qui est impliquée dans la cascade d'événements conduisant à des caspases et l'activation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. Des études suggèrent que l'activation de l'AMPK par

des terpénoïdes, tels que le géraniol (Kim et al., 2012) et le β -caryophyllène (Park et al., 2011), contribue à l'inhibition de la croissance et de l'apoptose des cellules dans le cancer de la vessie, de la prostate et des seins.

Modulation dans l'expression des protéines MAPK/ERK: Les protéines MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinases*) appartiennent à une famille de protéines dans les cellules qui communiquent les signaux de récepteurs membranaires jusqu'à l'ADN, au niveau du noyau. Le signal commence quand une molécule de signalisation se lie à un récepteur sur la membrane cellulaire, suivi d'une transduction de signal puis des voies de signalisation qui finiront par la production d'un second messenger qui stimule l'ADN dans le noyau, ce qui conduit à l'expression des protéines et, par conséquent, des changements dans la cellule, tels que la division cellulaire. Ces protéines sont des kinases qui communiquent par l'ajout de groupes phosphate à une protéine voisine. Ces réactions de phosphorylation-déphosphorylation agissent comme un interrupteur on/off. Certaines substances telles que le limonène et le β -élémane semblent agir de cette manière en induisant l'apoptose dans des cellules cancéreuses dans des lymphomes (Liu et al., 2011).

2.2.8. Effet antiangiogénique

Il est bien connu que les tumeurs sont irriguées par les capillaires sanguins (angiogénèse), qui fournissent des nutriments. Les composés des HE, tels que les terpènes et certains polyphénols, peuvent réduire et prévenir la formation de réseau alimentant la tumeur, c'est le cas du limonène (Ong et al., 2006). Dans une étude, Chen et al., (2002) ont montré que la densité de microvaisseaux était de 5.32 ± 4.26 dans le groupe supplémenté de limonène par rapport à 18.64 ± 2.81 pour le groupe témoin. De plus, l'expression du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) était de 29.71 ± 8.92 dans le groupe du limonène contre 45.77 ± 4.79 pour le groupe témoin. Le β -élémane a été doué d'une capacité importante de réduire de façon significative le VEGF *in vitro* et *in vivo*. Une autre étude montre que l'administration de 100 mg/kg d'eugénol (trois fois par semaine) induit une apoptose dans les cellules tumorales et réduit considérablement le VEGF et la matrice métalloprotéinase, démontrant clairement un effet antiangiogénique (Manikandan et al., 2010).

Chapitre 4: Stress oxydant et antioxydants naturels

1. Stress oxydant

1.1. Généralité

L'oxygène moléculaire (dioxygène) est une molécule indispensable à la vie. Par sa configuration électronique, elle possède une structure biradicale (deux électrons non appariés chacun sur une orbitale séparée de spin identique) lui attribuant une grande stabilité. Grâce à cette propriété,

l'oxygène lorsqu'il oxyde une molécule ou un atome, il ne pourra accepter les électrons que par ceux qui vont ralentir sa réaction avec les espèces non radicalaires (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Dans les conditions d'homéostasie physiologique, les organismes, y compris l'homme, produisent en perpétuelle permanence des niveaux importants des molécules, souvent réactives, appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, l'oxygène moléculaire peut capter d'une manière séquentielle et univalente un électron conduisant alors à la formation d'un chef d'orchestre des ERO : l'anion superoxyde. Les ERO accomplissent des fonctions physiologiques d'immense importance et leur production est constamment régulée par les mécanismes de protection naturelle par rapport aux radicaux présents. Cet équilibre cellulaire entre éléments oxydants et d'autres réducteurs est communément connu sous le nom d'équilibre "redox". De nombreux facteurs de risque tels que la malnutrition, l'inflammation, le tabagisme, l'alcoolisme, le stress, etc...peuvent casser cet équilibre en faveur des oxydants, conduisant ainsi à l'initiation d'un état de stress oxydant.

1.1.1. Espèces réactives oxygénées (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène comportent deux types des radicaux libres oxygénés (RLO) et les espèces non radicalaires d'oxygène telles que l'acide hypochloreux (HOCL), l'azote (O_3) (Berger et Chioléro, 2001) (Figure 12).

1.1.1.1. Espèces oxygénées réactives radicalaires

De point de vue chimique, un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence de ces électrons célibataires confère à ces molécules une forte instabilité. Cet état soit comblé par l'acceptation d'un électron, soit par le transfert d'électron libre sur une autre molécule (Robert, 2006). L'instabilité du radical libre considéré détermine la forte probabilité. Si l'instabilité est modérée, la probabilité d'accepter un second électron sera grande et dans ce cas le radical libre ne présente qu'une transitoire "passager" dans une réaction d'oxydoréduction classique. Au contraire, si cette instabilité est forte, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule (Fontaine et al., 2002).

Anion radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) : Au cours de respiration cellulaire mitochondriale, l'accepteur final des électrons est l'oxygène moléculaire qui subit une réaction tétravalente conduisant à la production de la molécule d'eau. Cependant, une partie des électrons transférés peut s'échapper de la chaîne respiratoire et réduire de façon monoélectronique l'oxygène, conduisant ainsi à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (Deby-Dupont et al., 2002). Ce radical peut prévenir encore d'autres réactions enzymatiques (NADPH oxydases) (Hong et Garvin, 2007) et non enzymatiques (auto-oxydation) (Misra et Fridovich, 1972). Le radical superoxyde possède une

durée de vie de quelques secondes avec une très faible réactivité chimique (il n'interagit pas des macromolécules telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques). Cependant, la toxicité de ce radical est due essentiellement à ses produits réactionnels formé en aval : l'eau oxygénée (H_2O_2) et les peroxynitrites ($ONOO^-$) (Moussard, 2006).

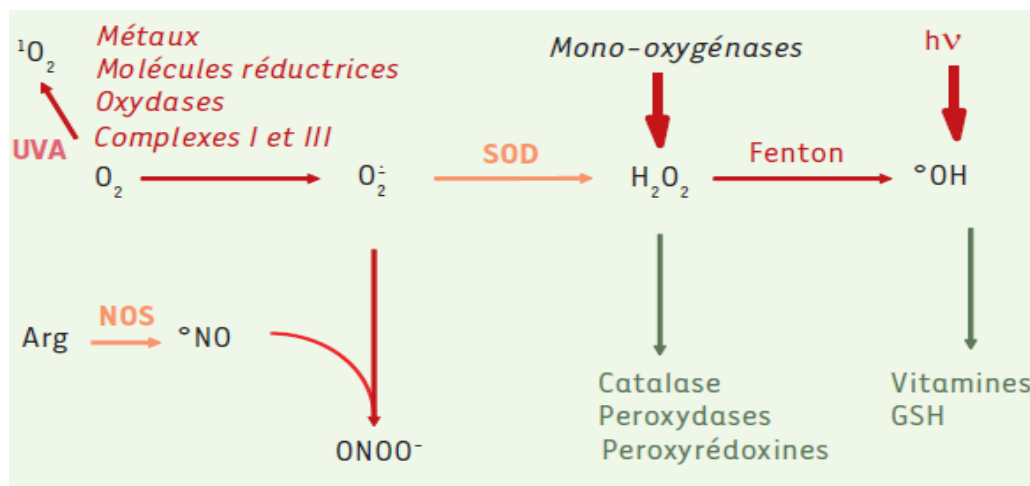


Figure 12: Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (Robert, 2006). L'oxygène peut subir des étapes successives de réduction conduisant à la formation d'ERO. En présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes, l'oxygène capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde O_2^- . Ce radical est le substrat d'enzymes essentielles ; la superoxyde dismutase (SOD) ; qui le transforme en eau oxygénée H_2O_2 . L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, (Fe^{2+}), elle est transformée en radical hydroxyl $^{\circ}OH$ par la réaction de Fenton. Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines formant parfois d'autres radicaux libres. L'eau oxygénée peut aussi subir des réactions de détoxification catalysées par la catalase, la glutathion peroxydase ou les peroxyrédoxines. Sous l'influence de rayonnements UV, l'oxygène peut être transformé en oxygène singulet. Le métabolisme de l'oxygène croise celui de l'azote puisque O_2^- interagit avec un autre radical, le monoxyde d'azote NO et conduit au composé toxique, le peroxynitrite $ONOO^-$.

Radical hydroxyle $HO^{\bullet}$: La toxicité de H_2O_2 est due essentiellement à grande capacité de produire le radical $HO^{\bullet}$ en présence des métaux lourds lors des réactions de Fenton et les d' Haber-Weiss.

Réaction de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$

Réaction d'Haber-Weiss: $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$

Ce radical peut former par la décomposition des peroxynitrites (Halliwell, 1999). L'hydroxyle est considéré comme le radical le plus réactif retrouvé dans les systèmes biologiques. Même s'il a une durée de vie trop courte (quelques nanosecondes), il est très délétère vis-à-vis une panoplie des composants cellulaires tels que les hydrates du carbone, les acides nucléiques et les lipides (Robert, 2006).

Radical peroxy $RO_2\cdot$: Il résulte de l'addition de l' O_2 sur des radicaux libres carbonés $R\cdot$ formés précédemment. Ce radical est moins réactif que $OH\cdot$, mais il est capable d'oxyder un grand nombre de molécules (par arrachement d'un électron ou d'un proton ou par addition d'une double liaison). Il est fortement impliqué dans la dégradation des membranes biologiques par leur capacité de peroxyder les lipides ([Robert, 2006](#)).

1.1.1.2. Espèces oxygénées réactives non radicalaires

Oxygène singulet 1O_2 : L'inversion de spin de l'un des électrons non appariés de l'oxygène à cause d'un apport énergétique peut conduire à la production d'une forme plus réactive appelée l'oxygène singulet (1O_2). Ce radical est formé durant les processus métaboliques normaux et est parfois utilisé par les cellules phagocytaires pour détruire les bactéries ingérées. Par ailleurs, la production d'oxygène singulet peut se faire par la condensation de l'anion superoxyde et le radical hydroxyle ([Johnston et al., 1975](#)). L'effet de cette molécule s'articule sur l'attaque et l'endommagement des macromolécules, en particulier les acides gras insaturés ([Jamieson, 1989](#)).

Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : Le peroxyde d'hydrogène est une espèce oxygénée non radicalaire produit par la dismutation du radical superoxyde d'oxygène mais aussi peut être formé directement sous l'action de certaines enzymes telles que les xanthines oxydases ([Halliwell, 1995](#)). Ce produit possède une durée de vie relativement longue (quelques minutes). Malgré qu'il ne soit pas un radical libre, le peroxyde d'hydrogène est capable de traverser les canaux aqueux grâce à sa similitude avec l'eau. Toutefois, en absence des métaux lourds, cette espèce reste peu réactive et moins toxique.

Acide hypochlorique (HOCl) : Sous l'action de la myéloperoxydase, les neutrophiles activés forment l'hypochlorite à partir de H_2O_2 ([Sanchez, 2005](#)). Cette molécule est un agent oxydant liposoluble par excellence. Par sa forte réactivité, elle peut aisément oxyder les acides aminés (principalement la méthionine) perturbant ainsi le processus vitaux-normaux des protéines.

1.1.2. Espèces réactives azotées (ERN)

1.1.2.1. Espèces radicalaires azotées

Radical d'oxyde nitrique ($NO\cdot$) : L'oxyde nitrique ($NO\cdot$) est une forme radicalaire azotée produite chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine. Cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) ([Sorg, 2004](#)). Dans les conditions physiologiques, l'oxyde nitrique joue rôle primordial dans la régulation de la pression sanguine, la défense et la régulation immunitaire, la relaxation des muscles lisses et la neurotransmission ([Valko et al., 2007](#)). Cependant, quand la concentration de ce radical devient forte, elle devient délétère pour nos cellules, notamment elle réagit avec des ions superoxydes

pour former le peroxynitrique ($\text{ONOO}\cdot$), un oxydant puissant, qui peut se décomposer, lui-même, pour régénérer d'autres radicaux tels que NO_2 et $\text{OH}\cdot$ (Sorg, 2004).

1.2.2. Espèces non radicalaires azotées

Peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$) : Le peroxynitrique ($\text{ONOO}\cdot$) est une espèce azotée non radicalaire à forte capacité oxydante. Il résulte d'une réaction spontanée entre le monoxyde d'azote et le radical superoxyde. Ce radical est très réactif et cause des multiples dommages cellulaires qui, dans certaines circonstances, entraîne la mort cellulaire par induction d'apoptose ou de nécrose. Le peroxynitrique est impliqué dans la genèse de plusieurs maladies telles que le diabète, l'inflammation, l'hypertension et le cancer (Pacher et al., 2007).

1.1.3. Production des radicaux libres

Les origines cellulaires des réactives oxygénés sont essentiellement enzymatiques et découlent de plusieurs sources. Deux sources sont à l'origine de la production des radicaux libres au niveau intra ou extra cellulaire. La première produit des ERO à cause de l'imperfection de la chaîne du transport des électrons (réduction monoélectronique) au niveau de la mitochondrie. Alors que la deuxième source est constituée d'une enzyme, NADPH oxydase, localisée au niveau la membrane plasmique. Cette enzyme peut s'orienter au niveau de la membrane ce qui lui donne un avantage d'interaction avec des substrats intracellulaire (NADH, H^+ et NADPH, H^+) et de libérer ainsi des ions superoxydes (Beaudeux et Vasson, 2005). En plus de ces deux principales origines, d'autres voies cytosoliques peuvent encore produire des ERO dans certaines circonstances. Ces voies jouent des rôles de cascades biochimiques de signalisation de la xantine oxydase, du cytochrome P450, de la NO synthases, et des enzymes de la voie arachidonique durant l'inflammation. D'autres molécules telles les monoamines (dopamine, épinéphrine, norépinéphrine), l'hémoglobine et les flavines, dans certaines conditions, leur auto-oxydation en présence des métaux produit encore des ERO (Robert, 2006).

1.2. Dommages du stress oxydant

Les radicaux libres produits étant hautement réactifs. En effet, ils sont capables d'oxyder ou d'initier les réactions radicalaires *vis-à-vis* de nombreuses biomolécules. Ils peuvent ainsi causer des dégâts cellulaires massifs par l'altération des macro-molécules telles que des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Robert, 2006).

Par leur propriété d'absorbance, les protéines constituent les cibles majeures des oxydants. L'oxydation des protéines peut se faire soit au niveau des chaînes latérales des acides aminés soit au niveau de la chaîne principale. Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine et tryptophane) étant les composants les plus sensibles aux oxydants. En effet, l'oxydation de ces deux acides aminés peut générer des groupements fortement hydroxyles

et carbonyles sur des protéines, ce qui génère des dysfonctionnement structuraux et catalytiques liées aux celles-ci (Friguet et al., 2000). Dans certaines situations, ces oxydations sont réversibles et peuvent jouer des rôles des transducteurs des signaux. Cependant, lorsqu'elles sont irréversibles, elles participent de manière remarquablement corrélative dans la genèse de certaines maladies telles que le cancer (Robert, 2006).

Certains radicaux libres tels que le radical hydroxyle, l'alkoxy, et le peroxy sont responsables de la peroxydation lipidique, en particulier les acides gras polyinsaturés. La peroxydation peut conduire à des réactions en chaînes puisque le radical peroxy est à la fois un déclencheur et produit de la peroxydation en même temps. Les radicaux de peroxy lipidiques peuvent eux-mêmes réagir avec d'autres lipides, mais aussi avec d'autres macro-biomolécules telles que les protéines et les acides nucléiques (Robert, 2006). Les acides gras polyinsaturés (constituants importants des membranes cellulaires) sont très sensibles aux attaques de ces oxydants ce qui conduit par conséquent à une perturbation de la fluidité et la perméabilité membranaire. La peroxydation a aussi un impact très important sur les processus métaboliques, en particulier la dérégulation des transductions des signaux membranaires et des voies de signalisation intracellulaires dédiées par les acides gras polyinsaturés constituant ainsi un facteur de risque déclenchant pour certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et cancers (Agil et al., 2006 ; Halliwell, 2000).

Plusieurs radicaux libres tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle peuvent causer des dommages au niveau des molécules d'ADN. En effet, ces radicaux peuvent engendrer plusieurs modifications en particulier la modification des bases azotées, l'oxydation des désoxyriboses, des cross-links ADN-protéine et des cassures simple et double brin (Bandyopadhyay et al., 1999). Les conséquences des dommages d'ADN sont beaucoup plus abondantes que les lipides et des protéines et peuvent prédisposer à une panoplie des résultats phénotypiques très dangereux. En effet, les modifications peuvent toucher la répression ou l'activation transcriptionnelle, l'induction des voies de transduction des signaux, l'induction des erreurs de réplication et l'instabilité du génome (Valko et al., 2006). L'hydroxylation des bases azotées puriques (guanine et adénine) régénère des produits tels que la 8-hydroxyguanine et la hydroxy-adénine. Ces deux produits sont considérés des puissants mutagènes, car ils induisent des mutations d'ADN par substitution ou délétion conduisant ainsi au développement de certains cancers (Kamiya, 2004). Les radicaux libres engendrent des fragmentations massives dans l'ADN des lignées germinales en particulier l'ADN des spermatozoïdes conduisant ainsi à des néomutations transmissibles dans les générations suivantes sans qu'elles aient été avant.

1.3. Systèmes de défense : Antioxydants

Vu le rôle physiologique majeur assuré par des radicaux libres et leur effets délétères, la production de ces radicaux et leur réduction doit être strictement maintenue régulière. Cette régulation est assurée d'une manière physiologique par des antioxydants de l'organisme (Figure 13) et ceux apportés par l'alimentation. Les antioxydants sont des substances retardant, prévenant ou enlevant les dommages oxydatifs d'une substance. Les antioxydants comprennent des enzymes et des substances non enzymatiques (hydro ou liposolubles) présentes dans les différents compartiments (intracellulaires, extracellulaire et membranaire) (Valko et al., 2006).

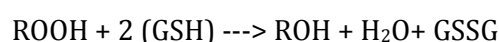
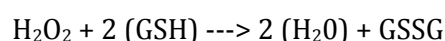
1.3.1. Système enzymatique

Les cellules possèdent trois groupes d'enzymes qui jouent des rôles critiques dans la protection de l'organisme contre le stress oxydant induit par les radicaux libres.

Superoxyde dismutase (SOD) : Les SOD sont des enzymes qui catalysent la conversion de deux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante : $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Ces enzymes sont de nature métalloprotéines dont leur activité dépend des éléments de manganèse, du zinc ou du cuivre comme des co-facteurs. La production des SOD à manganèse est essentiellement mitochondriale, alors celles à cuivre ou à zinc sont présentes dans les cytoplasmes (Salvemini et al., 2006).

Catalase : La catalase est une enzyme ubiquitaire rencontrée sur la quasi-totalité des cellules vivantes. C'est une hémoprotéine qui catalyse la conversion de peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et la molécule d'eau par la réaction : $2 (H_2O_2) \rightarrow O_2 + 2 (H_2O)$. Cette enzyme peut aussi finir la voie catalytique initiée par les SOD. Les réactions de détoxification par la catalase se déroulent au niveau des peroxysomes d'une façon quasi-ubiquitaire (Schrader et Fahimi, 2006).

Glutathion peroxydase (GPX) : Cette enzyme dégrade le peroxyde d'hydrogène et réduit les hydroperoxydes organiques (ROOH), en particulier des lipides, en alcools (ROH) en utilisant le glutathion qui réduit comme donneur d'hydrogène (Arthur, 2000). Ces enzymes sont présentes dans les mitochondries, les cytosoles et dans les espaces extracellulaires.



1.3.2. Système non enzymatique

Certains radicaux tels que le radical hydroxyle ne sont pas réduits par des systèmes enzymatiques et seules des molécules antioxydantes peuvent l'inactiver. Les antioxydantes non enzymatiques comprennent plusieurs substances :

Vétamine E : Le α -tocophérol ou vétamine E qui protège la liperoxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires. Les mécanismes de protection sont liés à leur capacité d'arrêter les réactions des chaines *via* le piègeage de radicaux peroxydes (Traber et Atkinson, 2007).

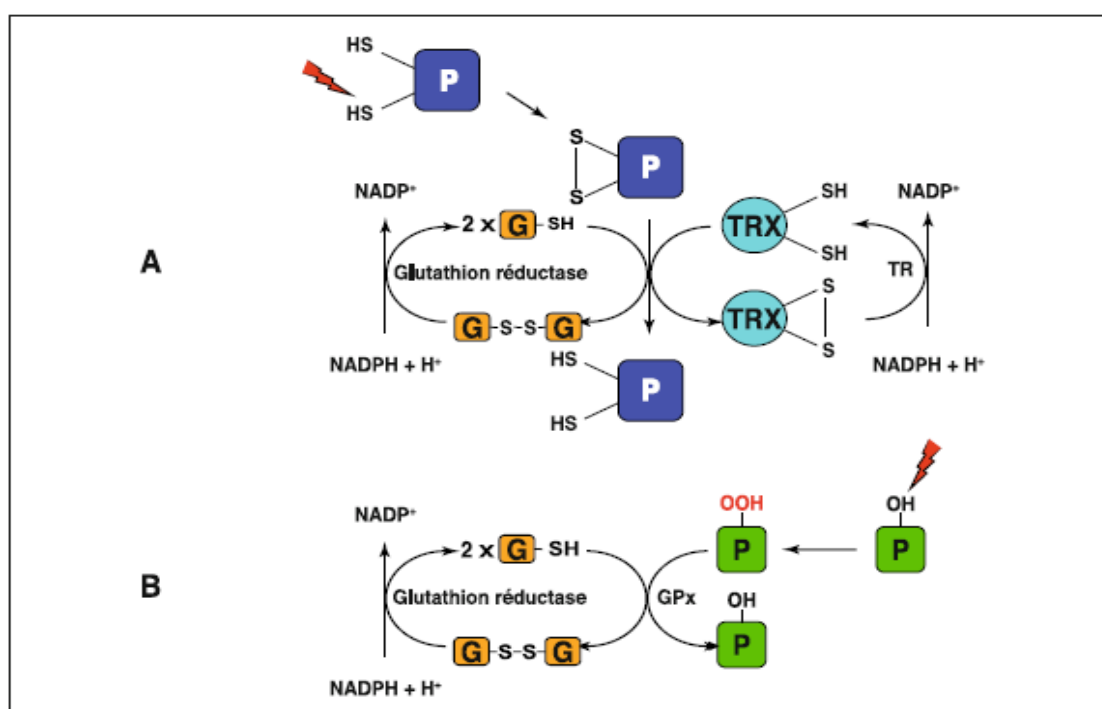


Figure 13: Détoxification des oxydations provoquées par les ROS (Robert, 2010). **(A)** Les ROS peuvent attaquer les fonctions thiol de résidus cystéine de protéines P et former des ponts disulfures. Le glutathion réduit G-SH est capable de réduire ces ponts disulfures en fonctions thiol en formant du glutathion oxydé G-S-S-G. Le glutathion réduit est régénéré grâce à une flavoprotéine à NADP réduit, la glutathion réductase GR. La thiorédoxine peut jouer le même rôle que le glutathion ; elle est régénérée par une thiorédoxine réductase TR. La formation de ponts disulfure sur certaines protéines, y compris la thiorédoxine, peut être le point de départ d'une voie de signalisation. **(B)** Les ROS peuvent oxyder des fonctions hydroxylées portées par des protéines P pour former des peroxydes. Le glutathion peroxydase GPx est capable de réduire les peroxydes en oxydant le glutathion réduit G-SH en glutathion oxydé G-S-S-G.

Caroténoïdes : Les caroténoïdes elles que le β -carotène et le lycopène qui agissent directement sur l'oxygène singulet protégeant ainsi la liperoxydation lipidiques. L'action des caroténoïdes est toutefois strictement régulée par la teneur en oxygène, quand celle-ci est plus élevée, les caroténoïdes deviennent elles-mêmes des pro-oxydants (El-Agamey et al., 2004).

Vitamine C : La vitamine C ou l'acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble le plus abondant dans le sang. Il est sensible à la chaleur, aux UV et à l'oxygène. L'acide ascorbique interagit directement avec des radicaux libres tels que OH et O₂ pour former le semidéshydroascorbate peu réactif qui est rapidement oxydé en acide déshydroascorbique. Il joue un rôle important dans l'inhibition de la peroxydation lipidique en assurant la régénération de l'α-tocophérol. Cependant, si la concentration de la vitamine C devient très forte il peut devenir pro-oxydant en présence du fer ([Sanchez, 2016](#)).

Glutathion : Cette molécule joue un rôle antioxydant endogène important en maintenant l'équilibre d'oxydo-réduction. La glutathion a un rôle protecteur et détoxifiant dans les situations de stress. En effet, il serve comme co-substrat des glutathions peroxydases et glutathion transférases. Par ailleurs, la glutathion est capable à elle seule de neutraliser les peroxy-nitriques sans fait appel à glutathion peroxydase ([Yuan et Kaplowitz, 2008](#)).

2. Activité antioxydante des substances naturelles

La propriété antioxydante des extraits des plantes médicinales et de leurs constituants est principalement due à leurs propriétés redox. Ils peuvent agir comme des agents réducteurs, des donneurs d'hydrogènes, des chélateurs de métaux de transition comme de fer et le cuivre impliqués dans la génération des radicaux libres. [Bouhdid et al. \(2008\)](#) ont testé l'activité antioxydante de l'HEd'*O. compactum* en utilisant le pouvoir réducteur du fer, le test de β-carotène et la méthode de piégeage du radical DPPH. Cette HE a montré des effets plus significatifs que certains antioxydants standards tels que l'acide ascorbique et l'hydroxytoluène butylé et ces activités antioxydantes varient selon la méthode utilisée ([Bouhdid et al., 2008](#)). Dans une autre étude, l'effet antioxydant de l'HE de *P. lentiscus* a été étudié par le test de piégeage DPPH. Les auteurs ont trouvé que l'HE a une forte activité de piégeage des radicaux (IC₅₀=23.79 µL/mL) ([Gardeli et al., 2007](#)). Cette valeur est significativement comparable à celles trouvées par les extraits de *P. lentiscus* (IC₅₀ =11µg/mL) ([Houbairi et al., 2015](#)). L'extrait a présenté un pouvoir réducteur ferrique remarquable, un bon piégeage de H₂O₂ et une faible inhibition de la peroxydation lipidique ([Mans et al., 2000](#)). La propriété antimutagène des extraits phénoliques de *P. lentiscus* de fruits a été étudiée et a montré une protection significative contre la mutation induite ([Mans et al., 2000](#)). Récemment, l'acétate d'éthyle, l'éther de pétrole et les extraits éthanoliques de *Pennisetum glaucum* ont été testés pour leurs activités antioxydantes par la capacité antioxydante équivalente au trolox, le DPPH et les tests de puissance antioxydante réducteurs ferriques ([Marmouzi et al., 2016](#)). Les résultats ont montré une variabilité significative entre les extraits de plantes et la méthode expérimentale utilisée. En effet, il a été rapporté que certains composés qui ont une activité de piégeage des radicaux ABTS n'ont pas montré d'activité de piégeage de la DPPH. En effet, la solubilité des extraits dans divers

solvants et la stéréosélectivité des radicaux sont deux facteurs qui influencent significativement la capacité des extraits à réagir avec les radicaux (Elias et Zhou, 2012). La différence dans l'activité antioxydante entre les extraits de plantes est certainement due à la variabilité des composés de fonctionnalité chimique. Cependant, la différence entre les dosages d'antioxydants est due aux mécanismes via lesquels un extrait réagit avec la méthode utilisée. Il a été rapporté que les composés phénoliques tels que les flavonoïdes neutralisent les radicaux libres en donnant un de leurs propres électrons. En effet, les composés phénoliques possèdent des groupes hydroxyles responsables de leurs propriétés antioxydantes. Ces composés ont la capacité de piéger les radicaux libres augmentés avec le nombre de groupes hydroxyles et de fragments catéchol dans la molécule (Wu et al., 2007). De plus, la localisation des groupes hydroxyles dans les molécules pourrait influencer leurs propriétés antioxydantes (Elias et Zhou, 2012).

Chapitre 5 : Plantes médicinales aux propriétés antibactériennes

1. Maladies infectieuses d'origine bactérienne

1.1. Introduction

Les antibiotiques ont constitué une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. Cependant, le mauvais usage de ces agents antimicrobiens et leur utilisation accrue ont eu pour conséquence de faire apparaître certaines formes de résistances des souches microbiennes contrebalançant les effets des antibiotiques (Goossens et al., 2005). Les bactéries pathogènes, grâce à leur flexibilité et plasticité génétique, sont capables de mettre en place un programme de résistance spécifique contre un antibiotique particulier. En effet, certaines souches arrivent à rétablir une multirésistance *vis-à-vis* de plusieurs antibiotiques à la fois donnant lieu à ce qu'on appelle les bactéries multirésistantes aux antibiotiques (Multidrug resistant) (Chaudhary, 2016). Parmi les bactéries pathogènes qui sont devenues de vrais problèmes pour la santé humaine, on trouve des espèces appartenant aux familles des Entérobactéries, des Pseudomonadacés et des bactéries de la famille des Acinetobacter qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits (Chaudhary, 2016). Face à ce problème, beaucoup d'études ont été réalisées pour développer des molécules alternatives efficaces contre ces maladies infectieuses. Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source importante de molécules bioactives qui pourraient être exploitées dans la thérapie des maladies infectieuses (Dung et al., 2008 ; Lahlou, 2013). En effet, depuis l'Antiquité, les plantes et leurs dérivés ont été utilisés dans la médecine populaire.

1.2. Résistance aux antibiotiques et réémergence des maladies infectieuses

1.2.1. Causes de la résistance

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante en pratique médicale (Levy, 1992). Ils ont joué un rôle important dans le traitement des infections microbiennes. Ces molécules ont également permis de surmonter les complications dans certaines situations, notamment la transplantation d'organes. Avec le temps, les microbes ont développé certaines formes de résistances *vis-à-vis* de ces antibiotiques (Turner, 2011). Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que l'utilisation suboptimale des antibiotiques au cours des traitements (Finland, 1979). Son émergence est due également à l'hospitalisation prolongée, la longue durée des séjours et les comorbidités, le non-respect des pratiques hygiéniques et le transfert des malades entre les hôpitaux (Palumbi, 2001).

1.2.2. Origine de la résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles ; naturelle et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques (Julian et Dorothy, 2010). La résistance naturelle (résistance intrinsèque) est commune à une population. Elle est due essentiellement à la présence de gènes spécifiques (Allen et al., 2010). Elle se caractérise par des modifications structurales, dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram-, et métaboliques, dans le cas du bacille de la tuberculose insensible à un grand nombre d'antibiotiques en s'opposant à l'action des antibiotiques par le biais de son métabolisme original. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en oeuvre d'un processus d'échappement *vis-à-vis* de l'antibiotique (Doyle, 2006). La résistance acquise est due à des modifications dans le profil d'expression génique *via* des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (Springman et al., 2009).

1.2.3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes (Giedraitiene et al., 2011). Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes, et ils sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents (Figure 14). Les mécanismes de résistance ont été décrits chez plusieurs souches bactériennes telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Marshall et al., 2009).

2.4. Bases génétiques de la résistance

Quelle que soit la nature de la résistance, innée ou acquise, elle s'établit *via* des allèles spécifiques dans le pool génétique d'une souche bactérienne. L'origine de la diversité génétique est due essentiellement à deux phénomènes globaux : les mutations chromosomiques ou parfois des hypermutations et le transfert horizontal de gènes entre les espèces de nature différente (White et al., 2005).

Mutations chromosomiques : Elles peuvent se produire spontanément lors de la réplication de l'ADN (en absence d'un vrai système de réparation). Cette marque génétique donne lieu à des protéines biochimiquement modifiées. Ce type de mutation est plus étudié chez *Escherichia coli* dont la mutation du gène *gyrA* lui confère une forte résistance (Hooper, 1999). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, une mutation dans le gène *mexR* cause la répression de l'opéron *mexAB-oprM* et confère la multirésistance à cette souche pathogène (Adewoye et al., 2002).

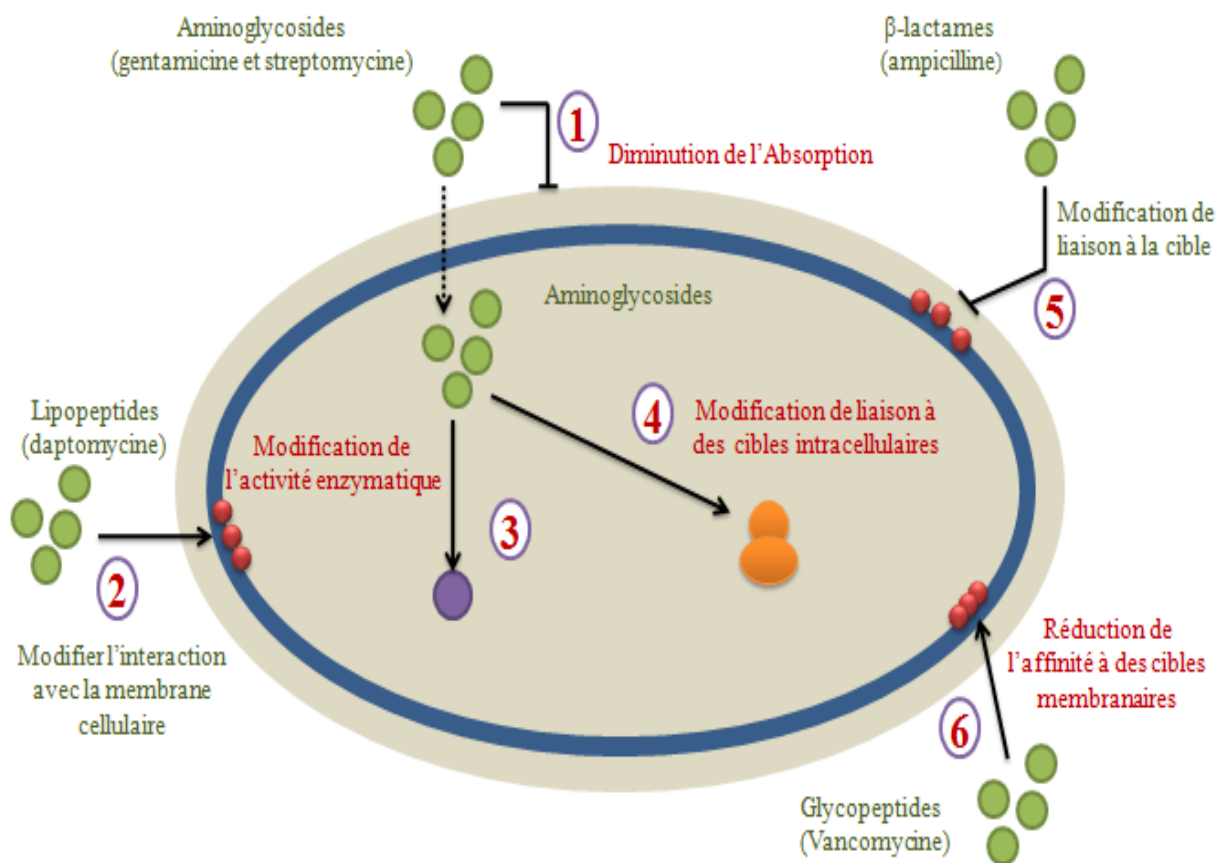


Figure 14: Mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahya et al., 2017a). Les bactéries possèdent différents modes de résistance aux antibiotiques. 1) Diminution de l'adsorption des aminoglycosides, 2) Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire, 3) Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides, 4) Modification de liaison des β -lactamines à des cibles intracellulaires, 5) Modification de liaison à des cibles membranaires et 6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires.

Hypermutation : c'est est un phénomène génétique qui désigne un état transitoire durant lequel une souche bactérienne subit un taux de mutation très élevé, permettant ainsi l'acquisition de la résistance aux antibiotiques. Cet état a été montré chez certaines souches pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobacter pylori* (Dzidic et al., 2008). D'autres souches bactériennes utilisent cette stratégie pour lutter contre d'autres agents pathogènes (Blazquez, 2003).

Transfert des gènes : Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels : **1)** La transduction : le transfert des gènes via les bactériophages, **2)** La transformation : l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries et **3)** La conjugaison : le transfert des fragments via des plasmides conjugatifs (Sommer et al., 2009). Dans certains cas, les éléments transposables (éléments mobiles qui se transposent d'une manière intra- ou interchromosomique) portent avec eux des copies des gènes *via* les trois mécanismes de transfert possibles : la conjugaison, la transformation et la transduction (Giedraitiene et al., 2011). D'autres éléments responsables du transfert des gènes entre les bactéries sont appelés les intégrons. Ce sont des fragments d'ADN connus sous le nom des cassettes des gènes que les bactéries s'intègrent dans certaines régions d'ADN chromosomique *via* un mécanisme de recombinaison d'une manière site-spécifique (Liebert et al., 1999). Ces éléments transfèrent des gènes impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les intégrons ne sont pas des éléments mobiles, mais leurs associations avec d'autres facteurs de transfert et d'insertion les rendent mobiles (Holmes et al., 2003).

1.3. Quorum sensing et pathogénécité bactérienne

1.3.1. Généralité sur le quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est l'ensemble des molécules synthétisées par les bactéries lorsqu'elles arrivent à une densité cellulaire importante. Ces molécules contrôlent certaines fonctions telles que le comportement cellulaire et peuvent ainsi détecter et initier des réponses aux stress inattendus. Ce système a été initialement découvert pour réguler certain nombre d'activités, comme l'expression génique des facteurs de virulence, la bioluminescence, la sporulation, la formation de biofilms et l'accouplement (Trosko, 2016; Bassler, 2002). Le QS est formé *via* la production de molécules dites auto-inductrices ou phéromones bactériennes. L'expression génique de ces derniers n'aura lieu que lorsqu'une population bactérienne atteint un seuil de densité cellulaire significative, entraînant ainsi l'activation ou la répression des gènes. Par conséquent toute population bactérienne apte à exprimer ces auto-inducteurs, est appelée quorum (Bassler, 2002 ; Xu, 2016). L'expression des auto-inducteurs dépend de la nature des

bactéries (Gram- ou Gram+) et de son état physiologique (densité cellulaire), mais aussi elle nécessite la présence d'autres éléments: les signaux synthèses, les signaux récepteurs, les gènes et les signaux régulateurs (Reading et Sperandio, 2006).

Les bactéries à Gram- produisent des auto-inducteurs à partir d'un précurseur appelé homosérine lactone acylée (HLA) (*n*-acylhomoserine lactones ou AHL) (Figure 15). La synthèse de HLA est catalysée par les enzymes de la famille de signal synthase (LuxI) (enzymes codées par l'opéron Lux). La transcription d'opéron Lux dépend de la densité cellulaire ; son activation nécessite une densité cellulaire significative (Reading et Sperandio, 2006). Ce système est très connu chez plusieurs espèces bactériennes à Gram- telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Agrobacterium tumefaciens*. Ces deux espèces sont capables de coupler leur expression génique en fonction des fluctuations de la densité cellulaire (Rasamiravaka et El Jaziri, 2016). Les bactéries à Gram+ utilisent un autre système pour établir les signaux du QS. Elles génèrent en fait des peptides intracellulaires (auto-inducteurs) pour activer le fonctionnement du QS (Figure 16). Ces peptides sont exportés au milieu extracellulaire sous forme des oligopeptides, ces derniers ont une affinité à des récepteurs membranaires externes riches en histidine. Cette interaction conduit à la transduction du signal qui génère des voies de signalisation permettant ainsi l'activation et/ou la répression des gènes spécifiques, de telle façon que chaque protéine transcrite est spécifiquement sélective pour un peptide signal donné (Reading et Sperandio, 2006).

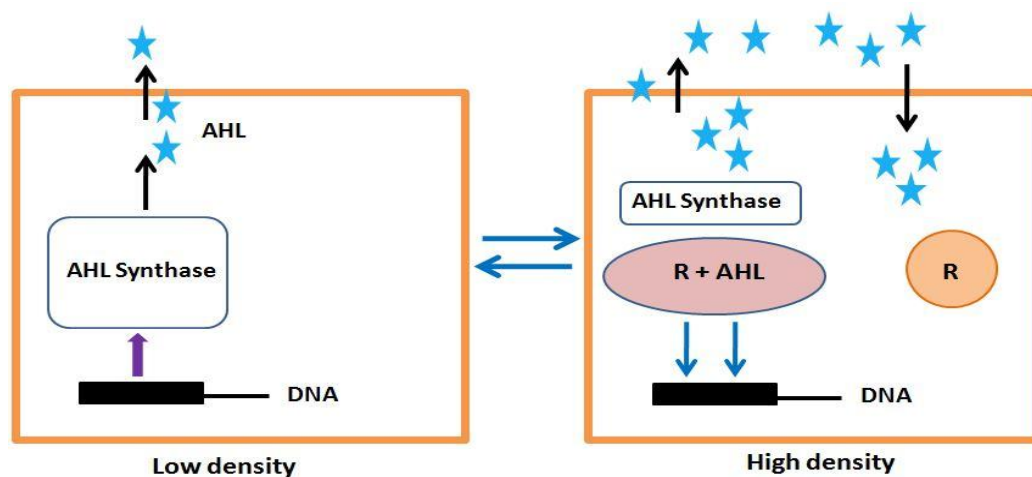


Figure 15: Quorum Sensing des bactéries à Gram- (Bouyahya et al, 2017b). Les bactéries produisent un autoinducteur, AHL, via une AHL-synthase. A faible densité, les molécules d'AHL sont activement transportées du milieu extérieur vers le cytoplasme par un processus de transport dépendant de l'ATP. A forte concentration, le transport s'effectue par diffusion passive. Lorsque la concentration d'AHL atteint un seuil (Quorum State), les molécules autoinductrices d'AHL interagissent avec la protéine régulatrice R, le plus souvent un régulateur transcriptionnel. Le complexe R-AHL se lie au promoteur des gènes cibles et initie leur transcription ainsi couplée à la densité bactérienne.

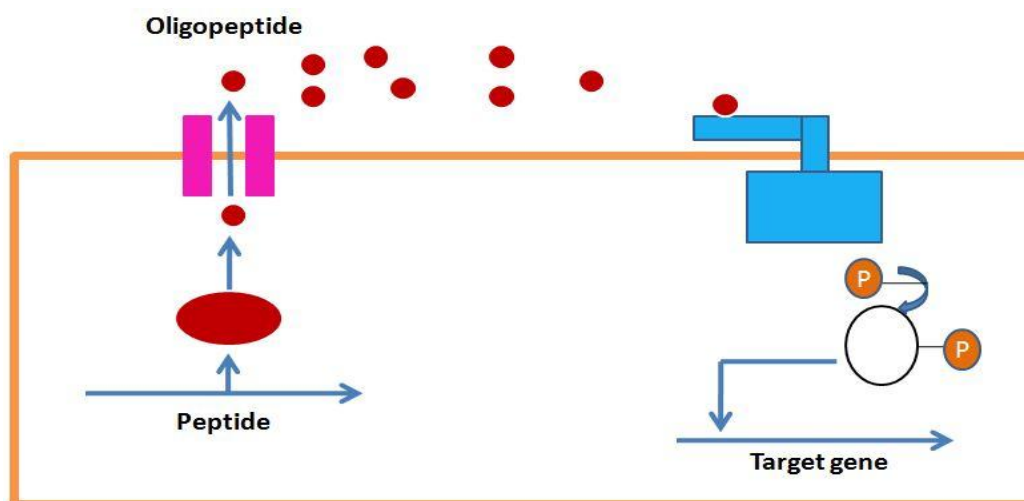


Figure 16: Quorum Sensing des bactéries à Gram+ (Bouyahya et al., 2017b). Les autoinducteurs des bactéries à Gram positif sont des oligopeptides modifiés post-traductionnellement par l'ajout de cycles lactone ou thiolactone, lanthionine et isoprényl. Ces oligopeptides autoinducteurs sont détectés par des protéines transmembranaires à deux composants transduisant les signaux par une cascade de phosphorylation.

2. Activité antibactérienne des plantes médicinales

2.1. Activité antibactérienne des plantes médicinales du Maroc

L'activité antibactérienne des extraits organiques et des HE des plantes médicinales marocaines sont très étudiées en utilisant des méthodes quantitatives et qualitatives telles que la méthode de diffusion sur disque (Talbaoui et al., 2012 ; Chatoui et al., 2016) et la méthode de diffusion en puits (Bouhdid et al., 2008). Les résultats sont exprimés en termes des zones d'inhibition qui permettent d'accéder aux valeurs d'inhibition quantitatives. Cependant, l'application potentielle de ces produits nécessite des résultats qualitatifs pour déterminer des concentrations efficaces telles que la concentration inhibitrice minimale (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB) pour promouvoir leur applications, en particulier dans l'utilisation thérapeutique (Talbaoui et al., 2012 ; Bouyahya et al., 2017c). D'autre part, les cibles moléculaires de ces produits sont déterminées en utilisant des matériaux sophistiquées tels que la microscopie électronique et la cytométrie en flux (Bouhdid et al., 2009 ; Bouhdid et al., 2010). Plusieurs approches sont utilisées au Maroc pour déterminer l'activité antibactérienne des plantes médicinales. Talbaoui et al. (2012) ont testé les effets des HE de six plantes aromatiques marocaines contre la croissance de *Streptococcus D*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (Talbaoui et al., 2012). Les résultats ont montré une grande variabilité qui est principalement due aux différences dans la composition chimique des HE testées. Les auteurs ont montré que les activités bactéricides de ces HE contre les souches bactériennes testées semblent principalement liées à la perturbation de la structure de la membrane bactérienne et ces résultats sont similaires aux antibiotiques standards utilisés (pénicilline-

streptomycine). Dans une autre étude, [Bouhdid et al. \(2008\)](#) ont révélé l'activité antibactérienne potentielle des HE d'*O. compactum* contre plusieurs souches pathogènes isolées. En effet, cette HE a présenté une capacité d'inhibition à une concentration de 0.007% (v/v) contre *Staphylococcus aureus* ([Bouhdid et al., 2008](#)). Cet effet bactéricide est certainement dû à la présence dans l'HE d'origan certaines molécules phénoliques telles que le thymol et le carvacrol. Ces deux composés sont largement reconnus pour leur action antibactérienne par plusieurs mécanismes ([Burt, 2004](#)). En effet, l'HE *O. compactum* a été testée pour ce mode d'action contre deux souches bactériennes : *S. aureus* et *P. aeruginosa* ([Bouhdid et al., 2009](#)). L'action antibactérienne a été liée à des altérations structurales, la perte de l'activité respiratoire, la diminution du potentiel et perméabilité membranaire. L'HE de *Thymus capitatus*, *Origanum elongatum* et *Mentha suaveolens* ont été testés pour leur activité antibactérienne contre *Salmonella*, *E. coli* O157: H7 et *Listeria monocytogenes*. L'HE de *T. capitatus* a révélé un effet antibactérien contre *Salmonella* et *L. monocytogenes* à une CMI=0.062 % (v/v) ([El Moussaoui et al., 2013](#)), tandis que les deux autres HE ont démontré une activité antibactérienne modérée. Ces résultats sont expliqués par la richesse de l'HE de *T. capitatus* par plusieurs molécules phénoliques qui sont largement capables d'inhiber les cellules bactériennes. Les extraits des plantes médicinales possèdent également une activité antibactérienne contrôlée par leurs composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les coumarines et les tanins. Par exemple, l'extrait aqueux de *Ficus carica* est testé contre *S. epidermidis* a montré une inhibition avec une faible concentration (CMI=25 µg/mL) ([Al Askari et al., 2013](#)).

2.2. Action antibactérienne des huiles essentielles

Plusieurs travaux ont été réalisés depuis des années sur l'activité antibactérienne des HE. Ces résultats obtenus restent figés dans des tests révélant la présence ou l'absence d'un effet et n'ont pas pu aborder le mode d'action par lequel une HE exerce son effet bactéricide ou bactériostatique. Plus récemment, certaines études ont commencé à décortiquer spécifiquement l'action des HE et leurs composants majoritaires sur les cibles bactériennes.

Cependant, les mécanismes restent moins clairs, et leur complexité vient de la composition chimique des HE qui présente une diversité de molécules pouvant agir chacune sur une cible différente ([Tiwari et al., 2009](#)). Par ailleurs, divers mécanismes antibactériens des HE ont été décrits. Elles peuvent affecter des niveaux morphologiques jusqu'à des niveaux de régulation en passant par des cibles structurales. Certaines études suggèrent qu'une HE peut simplement agir sur l'enveloppe externe de la cellule et le cytoplasme, vu son caractère hydrophobe spécifique, ce qui va induire une perturbation des structures bactériennes entraînant une augmentation de la perméabilité due à une incapacité à séparer les HE de la membrane bactérienne ([Bouhdid et al., 2009](#) ; [Bouhdid et al., 210](#)). Les principales cibles d'action des HE et de leurs composés sont

indiquées d'une manière générale sur la [figure 17](#). Elles peuvent agir sur la membrane cellulaire perturbant ainsi le maintien du statut énergétique de la cellule, le processus de transduction d'énergie couplé à la membrane et le transport de soluté, et la régulation métabolique. Parfois, les HE modifient l'expression des opérons en inhibant les médiateurs des auto-inducteurs.

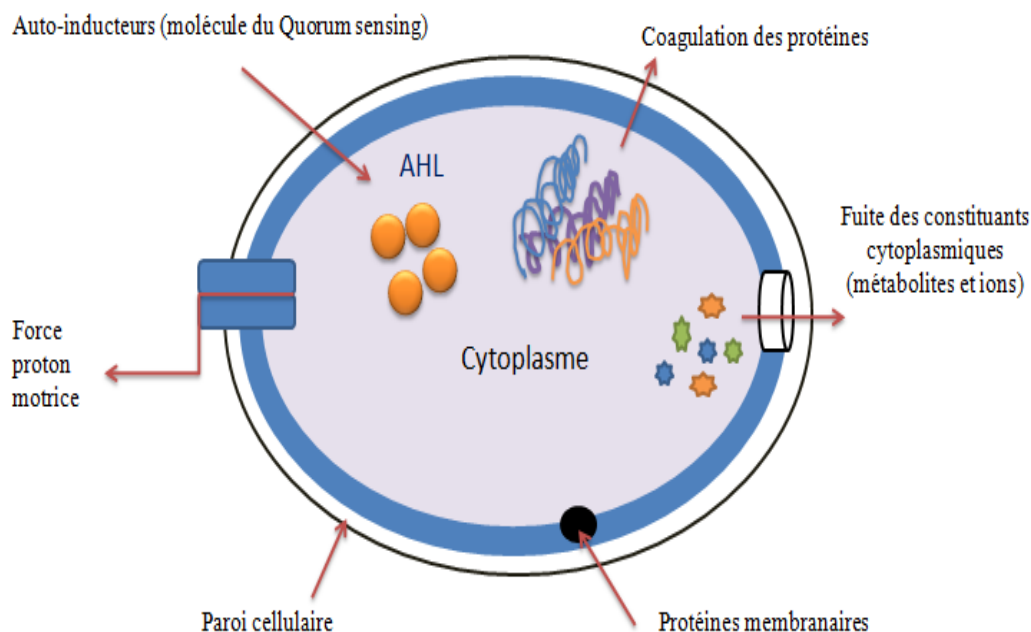


Figure 17: Mécanismes d'action des HE sur la cellule bactérienne ([Bouyahya et al., 2017a](#)). Il existe plusieurs cibles des HE pour inhiber les bactéries. Elles peuvent induire la coagulation, agir sur la paroi, induire la fuite des ions à travers la membrane, agir sur des protéines et les acides gras membranaires et agir sur les médiateurs du Quorum sensing. Ces mécanismes peuvent être appliqués en même temps générant ainsi une action amplificatrice.

2.2.1. Action sur la membrane cellulaire

Beaucoup de mécanismes d'action sont attribués à l'interaction de composants des HE avec les constituants de la membrane cellulaire ([Benchaa et al., 2008](#)). En effet, le caractère lipophile des molécules constituant les HE les rend capables de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire et de s'accumuler entre les phospholipides, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives. Le transport membranaire peut aussi dysréguler *via* la perturbation du gradient ionique de deux côtés de la membrane cytoplasmique ([Cox et al., 2001](#)). Cependant, certaines souches bactériennes ont pu développer des mécanismes lui permettant de contrebalancer cet effet grâce à l'utilisation de la pompe ionique ([Cox et al., 2001](#)).

2.2.2. Action sur les acides gras membranaires

Le métabolisme lipidique chez les bactéries constitue une voie prometteuse pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes (Heath et Rock, 2004). Les HE, grâce à leur caractéristique hydrophobe, constituent de véritables candidats qui pourraient affecter la biosynthèse des lipides, y compris les acides gras insaturés, et modifier ainsi la structure de la membrane cellulaire (Burt et Reinders, 2003). La présence des HE dans la cellule bactérienne diminue le taux des acides gras insaturés qui sont généralement responsables de la fluidité membranaire. En effet, le thymol, le carvacrol et l'eugénol (composés phénoliques majoritaires de plusieurs HE) peuvent augmenter la quantité d'acide gras saturé en C16 et en C18 et diminuer la quantité d'acides gras insaturés en C18 (Di Pasqua et al., 2007). L'action des HE n'est pas restreinte aux acides gras eux mêmes, mais peut également affecter des enzymes responsables de la biosynthèse de ces derniers. Par exemple, certaines études ont montré que quelques HE inhibent par différents mécanismes (inhibition compétitive, non compétitive et incompétitive) la désaturase et le cis-trans isomérase ; enzymes impliquées dans l'anabolisme et la conversion des acides gras (Di Pasqua et al., 2007).

2.2.3. Action sur l'ATP

La production d'ATP dans les cellules procaryotes se produit à la fois dans la paroi cellulaire au niveau de la membrane, par la chaîne respiratoire, et dans le cytosol par la glycolyse. La modification dans la membrane cellulaire affecte légèrement le processus du couplage énergétique conduisant à une perturbation entre l'équilibre du pool d'ATP intra- et extracellulaire (Turgis et al., 2009). Par exemple, l'utilisation de l'HE d'origan contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* a réduit significativement le taux d'ATP intracellulaire via la perturbation de la chaîne respiratoire au niveau membranaire (Caillet et Lacroix, 2006).

2.2.4. Action contre le quorum sensing

Plusieurs études suggèrent la nécessité de contrôler les infections bactériennes *via* l'inhibition du QS (Musk et Hergenrother, 2006). L'inhibition du quorum sensing peut être réalisée par plusieurs mécanismes (Figure 18). On peut agir sur la synthèse du signal HLA par trois voies : l'inhibition de la synthèse d'acyle porteur protéine, l'inhibition de HLA synthase et l'inhibition du transport des molécules HLA à l'extérieur. L'action peut être aussi orientée vers l'inhibition de la réception des signaux de molécules de HLA (Figure 19) par leur séquestration ou leur dégradation au niveau intracellulaire, et par l'inhibition compétitive (Vattem et al., 2007 ; Mathesius et al., 2003 ; Gao et al., 2003).

Plusieurs molécules de nature différente ont été testées pour leurs effets anti-QS. Ces molécules ont montré des actions spécifiques contre certaines cibles citées. Par ailleurs, la diversité

hétérogénéité des micro-organismes et par conséquent les molécules du QS qu'ils expriment, rendent les recherches dans ce sens très colossales.

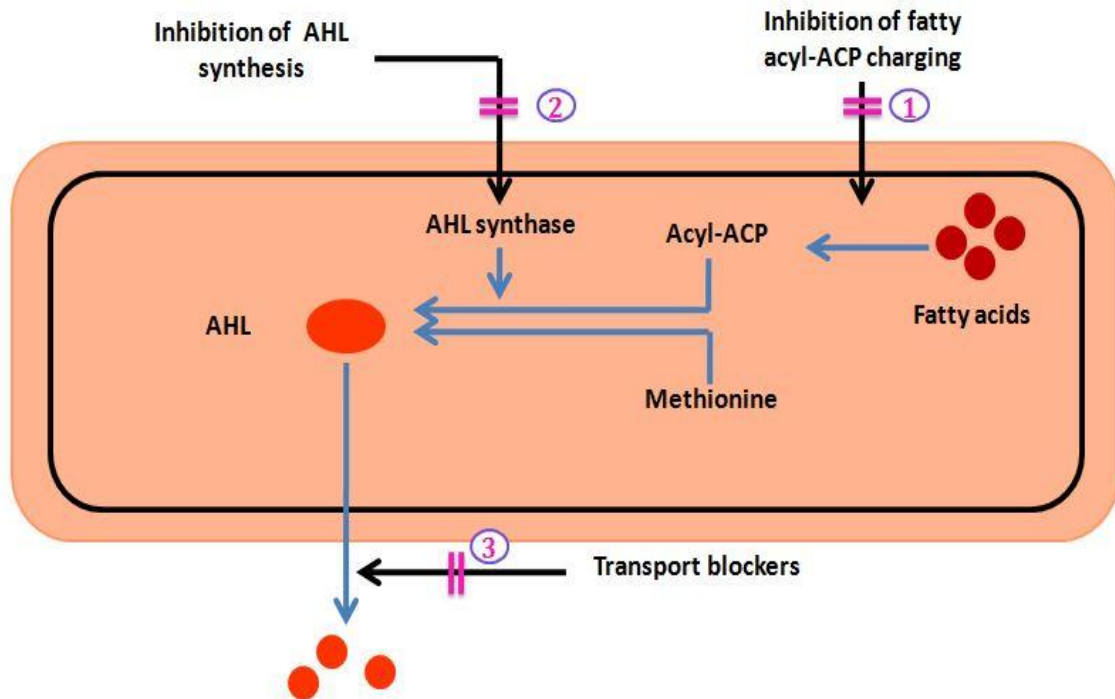


Figure 18: L'inhibition des signaux du quorum sensing par l'inhibition de la génération du signal de HLA (Bouyahya et al., 2017b). Généralement, il y a trois mécanismes d'inhibition: 1) Inhibition de la synthèse d'acyle porteur protéine, 2) Inhibition directe de la synthèse de HLA et 3) Inhibition du transport des molécules HLA à l'extérieur.

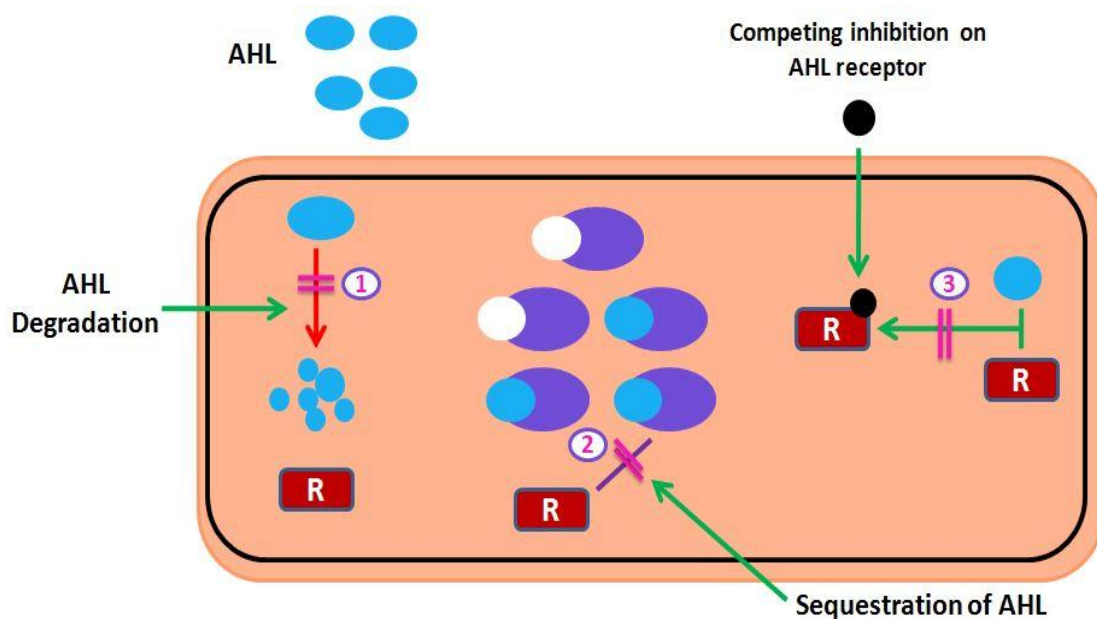


Figure 19: Mécanismes d'action anti-QS affectant la réception du signal (Bouyahya et al., 2017b). Il y a trois mécanismes principaux qui peuvent inhiber la réception des signaux du QS : la dégradation de HLA, la séquestration de HLA et l'inhibition compétitive de son récepteur.

Dans ces dernières années, les chercheurs ont remarqué qu'un mimétisme moléculaire existe entre les médiateurs du QS et les métabolites secondaires de certaines plantes. Cette constatation est due à des réarrangements géniques ayant lieu lors des phyto-infections bactériennes (Vattem et al., 2007). Ces plantes sont dotées de métabolites secondaires de structures chimiques extrêmement complexes et variables. Elles peuvent représenter par conséquent des véritables candidats comme des inhibiteurs efficaces du QS, contrebalançant ainsi la résistance induite *via* la formation de biofilms. Récemment, plusieurs études ont montré des propriétés anti-quorum sensing de plusieurs plantes médicinales (Luís et al., 2016 ; Luciardi et al., 2016 ; Myszka et al., 2016). Parmi les plantes médicinales les étudiées pour leur effet anti-QS on cite : *Piper bredemeyeri* (Olivero et al., 2011), *Syzygium aromaticum* (Chamdit et Siripermpool, 2012), *Cocos nucifera* (Viju et al., 2013), *Terminalia catappa* (Taganna et al., 2011), *Glycyrrhiza glabra* (Bhargava et al., 2015) et *Termanilia chebula* (Huber et al., 2003). Ces plantes ont montré leur capacité d'inhiber les phénotypes liés au fonctionnement du QS tels que le biofilm, la motilité et les facteurs de virulence. En effet, l'HE de *Citrus reticulata* a inhibé la formation du biofilm et la production de la molécule HLA, précurseur principal de construction du QS. Cette action a été attribuée au limonène ; composé majeur de cette HE (Luciardi et al., 2016). Par ailleurs, beaucoup de composés des HE peuvent agir en synergie contre le QS. Cet effet a été démontré par exemple chez l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata* (riche en limonène, α -terpinéol, α -terpinyl acétate et α -pinène) et d'*Eucalyptus globulus* (riche en 1,8-cineole, eucalyptol, α -pinene, aromadendrene et p-cymene) qui ont inhibé la production de violacein et le système du QS chez *Acinetobacter baumannii* (Myszka et al., 2016).

D'autres huiles essentielles riches en composés phénoliques ont montré des propriétés anti-QS. Par exemple, l'huile *Thymus vulgare* (riche en thymol et carvacrol) a diminué la production de HLA, supprimé la motilité et réduit l'expression des gènes du QS responsables de la formation des flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* (Myszka et al., 2016).

Chapitre 6 : Propriétés antileishmanienne des plantes médicinales

1. Généralité sur la leishmaniose

1.1. Parasite

Les parasites de *Leishmania* ont été décrits par Willian Leishman et Charles Donovan en 1903 à partir de biopsies viscérales et cutanées de patients de l'Inde, mais ils ont été déjà observés par d'autres chercheurs qui ont proposé de nommer ces parasites par le genre *Leishmania* (Ampuero, 2000 ; Alvar, 2001). Le parasite de *Leishmania* se caractérise par sa morphologie et sa physiologie dite dimorphique. Dans le tube digestif de son vecteur, il se présente sous forme promastigote. Cette forme de *Leishmania* a une longueur moyenne de 20 μ m, avec un

kinétoplaste (structure mitochondriale qui contient l'ADN extracellulaire) et un noyau central, il est pourvu d'un flagelle qui lui permet de se déplacer. Du point de vue physiologique, la température optimale des promastigotes est de 22-26 °C et leur culture est ainsi possible dans des milieux artificiels *in vitro*. A l'intérieur de son hôte vertébré, et en particulier dans les macrophages, ce parasite est sous la forme amastigote ovale ou arrondie. Sa taille mesure seulement de 2 à 3 µm avec l'absence totale de mobilité (sans flagelle). La forme amastigote est adaptée à la température corporelle et au milieu acide des phagolysosomes des macrophages. A l'intérieur de celles-ci, le parasite se multiplie par une division binaire (scissiparité) et après sa libération, il infecte d'autres macrophages (Bailey et al., 2007).

1.2. Vecteurs

Les vecteurs de *Leishmania* sont des insectes qui appartiennent à la sous-famille des *Phlebotominae*. Les espèces de deux genres sont impliquées dans la zoonose de *Leishmania* ; les espèces du genre *Lutzomyia* et *Phlebotomus*. Les espèces de deux genres sont très similaires du point de vue morphologique. La transmission de toutes les espèces de *Leishmania* se fait exclusivement par la femelle du phlébotome, car celle-ci a besoin de sang afin d'obtenir les protéines nécessaires au développement de ses œufs. Ces insectes piquent généralement durant la nuit et parfois au crépuscule pour chercher le sang. Cependant, ces vecteurs ne sont pas actifs à des basses températures. En effet, ils ne peuvent pas se fonctionner que lorsque la température extérieure est supérieure à 19°C. Cette propriété physiologique explique la distribution géographique de la leishmaniose dans les régions tropicales (Nozais et al., 1996).

1.3. Leishmaniose au Maroc

Au Maroc, les leishmanioses sont des maladies qui constituent une menace majeure pour la santé publique. En 2011, le Ministère Marocain de la Santé a signalé 4 319 cas de leishmaniose cutanée et 107 cas de leishmaniose viscérale (VL) (MMH, 2013). La leishmaniose cutanée est causée par trois espèces cliniquement importantes de *Leishmania* (*Leishmania major* (*L. major*), *Leishmania tropica* (*L. tropica*) et *Leishmania infantum* (*L. infantum*). Récemment, la forme mucocutanée a également été signalée au Maroc, mais reste rare (Iguermia et al., 2010). L'infection par le *Leishmania* est transmise à l'hôte humain suite à la morsure d'un phlébotome infecté (Diptera: P sychodidae, Phlebotominae) du genre *Phlebotomus*. *Phlebotomus papatasi* (*P. papatasi*) et *Phlebotomus sergenti* (*P. sergenti*) sont les vecteurs les plus communs pour la propagation de *L. major* et *L. tropica* au Maroc (WHO, 2014). On rapporte que *Phlebotomus ariasi* (*P. ariasi*), *Phlebotomus perniciosus* (*P. perniciosus*) et potentiellement *Phlebotomus longicuspis* (*P. longicuspis*) sont les vecteurs de *L. infantum* dans les pays méditerranéens (WHO, 2010). Des études antérieures au Maroc ont montré que la répartition des phlébotomes est due en grande partie au bioclimat (Prudhomme et al., 2012).

1.3.1. Formes Cliniques

Au Maroc, des formes zoonotiques et anthroponotiques ont été signalées. Les principaux réservoirs sont les chiens zoonotiques de la leishmaniose vécérale, les rongeurs zoonotiques de la leishmaniose cutanée et humains anthroponotiques de la leishmaniose cutanée (Amro et al., 2012).

Leishmaniose cutanée : La leishmaniose cutanée est caractérisée par des lésions cutanées chroniques, laissant des cicatrices permanentes avec déformation de la zone infectée. Elle est distribuée dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux (Amro et al., 2012). La répartition géographique des différentes formes est liée à des zones bioclimatiques bien décrites. D'après Rioux et al. (1986), le bioclimat du vecteur détermine la distribution, la densité et donc la prévalence de la maladie.

Leishmaniose cutanée anthroponotique : Elle est causée par *L. tropica* et transmise par le phlébotome (*P. sergenti*) aux humains comme seul réservoir (WHO, 2010). Au Maroc, elle a été identifiée et isolée, pour la première fois en 1987, d'une lésion cutanée chez un jeune enfant (Rhajaoui et al., 2012). Ainsi, elle a été considérée depuis 1997 comme une menace majeure pour la santé publique (Rhajaoui et al., 2011). Depuis lors, de nombreuses études éco-épidémiologiques ont été réalisées dans le centre et le sud du pays dans le but de détecter les foyers provoqués par la leishmaniose cutanée à *L. tropica*. Plusieurs foyers ont été signalés dans les zones rurales d'Azilal, Essaouira, Chichaoua et Al Haouz et dans les régions urbaines et périurbaines de Taza et Zouagha Moulay Yaacoub (Ramaoui et al., 2008).

Leishmaniose cutanée zoonotique à *Leishmania major* : La leishmaniose cutanée était décrite en 1914 par Foley et Vialatte. Au début, la maladie était connue par quelques cas sporadiques (Prudhomme et al., 2012). Plus tard, cette maladie a pris une forme épidémique séparée par des périodes calmes (Prudhomme et al., 2012). Au Maroc, la maladie est observée dans les zones arides des palmeraies des contreforts sud de l'Anti-Atlas et du Haut Atlas (Rhajaoui et al., 2011). Sa distribution est liée à la présence du rongeur commensal qui agit comme un réservoir du parasite. Sa transmission est assurée par *P. papatasi* comme vecteur (Prudhomme et al., 2012).

Leishmaniose viscérale à *L. infantum* : Le premier cas de cette forme a été décrit en France (Rioux et al., 1980). Au Maroc, le premier cas a été décrit dans le Rif central à Taounate. L'identification biochimique du parasite a montré que c'est *L. infantum* MON 24 (Rioux et al., 1996). En 2007, Rhajaoui et al. (2007) ont signalé un foyer de la leishmaniose cutanée au Maroc causé par *L. infantum*, avec 8 cas à Sidi Kacem. Cette étude a confirmé un chevauchement de leishmaniose cutanée et leishmaniose viscérale dans plusieurs provinces du centre du Maroc,

les foyers anthroponotiques de la leishmaniose cutanée à *L. tropica* trouvés à Fèz et Taza, ne sont pas loin des foyers de la leishmaniose viscérale à Sidi Kacem. En outre, plusieurs cas de leishmaniose viscérale causée par *L. tropica* ont été signalés dans des régions où la leishmaniose viscérale est causée par *L. infantum*.

1.4. Physiopathologie de la leishmaniose

La compréhension de la biologie cellulaire et moléculaire de *Leishmania* spp., de la complexité de son interaction avec le système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte a fait l'objet de nombreux travaux qui ont suggéré que cette compréhension peut conduire à une meilleure thérapie (Kaye, et Scott, 2011 ; Olivier et al., 2005 ; Gull, 2001). Les connaissances sur la biologie de la leishmanie proviennent essentiellement de modèles murins et de cultures cellulaires *in vitro* en utilisant diverses espèces de *Leishmania* (Debrabant et al., 2004). Les approches qui ont été utilisées se sont basées essentiellement sur le déchiffrage des gènes de choc thermique et les cassettes d'autres gènes. Ces gènes sont impliqués de la régulation du passage d'un environnement dépendant de la température ambiante (mouche de sable) vers une niche essentiellement homeothermique à l'intérieur de la cellule hôte mammifère (Bente et al., 2003 ; Duncan et al., 2004).

Les preuves actuelles favorisent un rôle de la leishmanolysine dans la migration des parasites à travers la matrice intracellulaire par digestion du collagène type IV après leur libération des cellules infectées (McGwire et al., 2003). L'induction des chimiokines MIP-1 β par les neutrophiles hébergeant les amastigotes attire les macrophages sur le site de l'infection. Les macrophages englobent ensuite les neutrophiles infectés, ce qui permet d'acquérir l'infection (van Zandbergen et al., 2004).

La forme amastigote interfère avec la présentation de l'antigène par les macrophages, en utilisant la cystéine-protéase B (Buxbaum et al., 2003). Les amastigotes possèdent également une protéine de cystéine puissante qui retardent l'apparition des réponses immunitaires protectrices (Sutterwala et Mosser, 1999 ; McDowell et Sacks, 1999). Cette protéine modifie l'activité de la protéase cystéine hôte pendant une infection intracellulaire (Besteiro et al., 2004). La réplication des amastigotes dépend des cyclophilines de l'hôte, car la division est inhibée par la cyclosporine A (Hoerauf et al., 1997 ; Meissner et al., 2002). La membrane de la promastigote contient une protéase de zinc, la leishmanolysine, une glycoprotéine de 63 kDa dont sa structure cristalline a été déterminée (Chaudhuri et al., 1989 ; Schlagenhauf et al., 1998). Une avancée passionnante dans la compréhension de la complexité de certaines formes de maladie mucocutanée a été la découverte d'un virus de l'ARN qui infecte le sous-genre *Leishmania* *viannia* (Ives et al., 2011). Il semble que ce virus de l'ARN de leishmania-1 (LRV1) soit reconnu

par les récepteurs de d'hôte et induit une réponse inflammatoire qui conduit à une réponse immunitaire hyper-inflammatoire résultants en des lésions destructrices ([Ives et al., 2011](#)).

2. Activité antileishmanienne des plantes médicinales

Plusieurs agents chimiques ont été décrits pour le traitement de la leishmaniose. Parmi eux, les médicaments antileishmaniens comme la chloroquine, la quinacrine, l'émétine, le métronidazole, les antibiotiques minocycline, la tétracycline et la rifampicine ([Want et al., 2016](#)). L'efficacité de ces traitements dépend de la souche parasitaire, alors que la sécurité des ces molécules est largement discutable. En effet, l'utilisation de ces agents chimiques est presque toujours limitée par des effets secondaires tels que l'augmentation des enzymes hépatiques.

Pour des raisons de toxicité élevée des molécules de synthèse, la recherche d'autres composés alternatifs exempts de ces problèmes et inconvénients est nécessaire. De plus, les produits de plantes médicinales jouent un véritable rôle comme source de molécules fonctionnelles diverses. En effet, ces plantes sont utilisées depuis toujours pour lutter contre la leishmaniose ont montré des résultats importants ([Ouhaddou et al., 2014](#) ; [El Hafian et al., 2014](#)). Au cours des dernières années, le criblage de composés antileishmaniens issus de plantes médicinales a été étudié ([Andrade et al., 2008](#) ; [Da Silva Filho et al., 2008](#)).

Au Maroc, l'utilisation traditionnelle des plantes contre la leishmaniose a été rapportée par [El Rhaffari et al. \(2002\)](#) dans la région de Meknès-Tafilalt (sud-est du Maroc). Cette étude a révélé de nombreuses espèces végétales appartenant aux différentes familles botaniques, qui sont fréquemment utilisées par la population de cette région. Parmi les plantes les plus utilisées on trouve : *Salvia verbenaca*, *Pistacia atlantica*, *Apium graveolens*, *Nerium oleande*, *Calotropis procera*, *Artemisia herba-alba* et *Lipidium sativum*.

L'évaluation pharmacologique *in vitro* des extraits de ces plantes a commencé récemment. En effet, [Et-Touys et al. \(2016a\)](#) ont étudié l'effet antileishmanien des extraits (hexane, de dichlorométhane et de méthanol) de *Salvia verbenaca* contre les formes promastigotes de *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum* ([Et-Touys et al., 2016a](#)). Les extraits d'hexane et de dichlorométhane ont montré une activité antileishmanienne plus élevée par rapport aux extraits méthanoliques. Dans une autre étude également réalisée par [Et-touys et al. \(2016b\)](#), des extraits de méthanol, de n-hexane et d'éthanol de *Salvia officinalis* ont montré des effets cytotoxiques importants contre *L. major*. Les HE et leurs composés majeurs ont également montré des effets antileishmaniens intéressants. En effet, [Essid et al. \(2015\)](#) ont testé l'action des HE de certaines plantes de la famille de Lamiaceae sur les formes amastigotes. Les résultats ont révélé des effets inhibiteurs à des concentrations très faibles, en particulier avec l'utilisation des molécules isolées des HE telles que le thymol et le carvacrol ([Essid et al., 2015](#)).

L'activité antileishmaniale des extraits naturels est certainement attribuée à la présence de molécules bioactives qui peuvent inhiber la croissance de ces parasites par de nombreux mécanismes d'action. Ces mécanismes dépendent de la composition chimique, des souches leishmaniales testées et des méthodes utilisées. Le spectre d'action de ces molécules contre les souches leishmaniales est très variable et peut aller de la destruction morphologique jusqu'à des niveaux de régulation.

Certaines molécules phénoliques telles que les coumarines ont démontré leur capacité à inhiber les parasites par l'induction de l'apoptose de manière dose-dépendante (Inuoe et al., 1994). Ainsi, certains flavonoïdes comme les flavonone ont pu également inhiber la croissance de *Leishmania* en affectant les mécanismes du transport membranaire. Les mécanismes de cytotoxicité antileishmanienne peuvent également affecter le niveau d'énergie des cellules en perturbant le transport des électrons dans la chaîne respiratoire (Inuoe et al., 1994).

Autres études ont suggéré que les HE et leurs dérivés ont des effets antileishmaniens. Les mécanismes impliqués comprennent l'induction de l'apoptose, la perturbation de la chaîne de transport des électrons et l'inhibition de l'ADN topoisomérase (Castro et al., 1992). Certaines molécules isolées des extraits de plantes médicinales ont montrés également des effets antileishmaniens. Par exemple, les iridoïdes et la licochalcone A (molécules appartenant aux chalcones) ont montré des effets cytotoxique importants contre *L. donovani* (Zhai et al., 1995 ; Ray et al., 1996). Les principales cibles de ces deux molécules sont les enzymes de la chaîne respiratoire des électrons telles que la fumarate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase et la malate déshydrogénase.

Objectifs

La découverte de nouveaux traitements antimicrobiens, antiparasitaires, antioxydants et anticancéreux passe par une investigation du potentiel pharmacologique d'un grand nombre de composés chimiques (le *criblage*) pouvant avoir des origines diverses allant du milieu naturel à la chimie de synthèse ou aux biotechnologies. Ainsi, depuis de nombreuses années, le Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines (Biochimie-Immunologie) recherche à étudier l'activité pharmacologique des substances naturelles extraites de plantes médicinales, pour identifier de nouveaux types de traitements toujours plus spécifiques et efficaces. Le travail présenté dans ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation de plantes médicinales marocaines et la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes, antioxydantes, antiparasitaires et anticancéreuses. De ce fait, nous visons la recherche et l'identification de molécules issues de plantes médicinales, capables d'induire des effets pharmacologiques importants dans différents systèmes biologiques.

Ainsi, les objectifs escomptés de notre étude visent à :

- Effectuer une étude ethnopharmacologique visant à lister les plantes utilisées de manière traditionnelle par la population locale de la région d'étude et leurs indications thérapeutiques ;
- Collecter et extraire certaines plantes médicinales sélectionnées pour l'étude phytopharmacologique *in vitro* ;
- Etudier les profils chimiques des plantes sélectionner les plantes médicinales à étudier *in vitro* ;
- Cribler l'activité antioproliférative sur des lignées cellulaires cancéreuses ;
- Cribler l'activité antioxydante *in vitro* par trois méthodes complémentaires
- Cribler l'activité antibactérienne *in vitro* sur plusieurs souches de références ;
- Cribler l'activité antileishmanienne *in vitro* sur les formes promastigotes de trois souches de *Leishmania* ;
- Etudier le mécanisme d'action antibactérien des produits performants.

Matériel et méthodes

1. Etude ethnopharmacologique

1.1. Zone d'étude

La province d'Ouezzane est l'une des provinces les plus grandes de la région de Tanger-Tétouan-Al-Hoceima. Elle appartient également aux marges méridionales du pays Jbala dont les grandes tribus sont: Masmouda, Rhouna, Ghzaoua, Seta et Beni Mestara. Elle est entourée de cinq autres provinces: Larache, Kenitra, Sidi Kacem, Taounate et Chefchoauen ([Figure 20](#)). Selon le Haut Commissariat au Plan (2014), Royaume du Maroc, la province d'Ouezzane possède une superficie de 2 km², une densité de 140,4 habitants / km² et une population de 300 637 recensements.

Le climat est de type méditerranéen, particulièrement subhumide selon la classification d'Emberger. Il est caractérisé par un été sec avec des températures comprises entre 19 ° C et 32 ° C et un hiver froid avec des températures douces entre 6 ° C et 14 ° C. L'indice d'humidité montre une moyenne annuelle de 800 mm, inégalement répartie. Les sols sont différents selon les zones. En outre, l'érosion du sol a augmenté en raison des activités de l'homme, à savoir le surpâturage et le défrichage des forêts. L'économie de cette province dépend principalement des ressources naturelles, en particulier de l'activité pastorale (l'agriculture de subsistance à base de céréales et les bétails) et l'arboriculture, principalement l'olivier (*Olea europaea* L.) et le figuier (*Ficus carica* L.). Alors que la commercialisation d'autres ressources naturelles comme les plantes médicinales occupe une place secondaire dans l'économie locale ([Ennabili et al., 1996](#) ; [Ennabili et al., 1997](#) ; [Ennabili et al., 2006](#)).

Les zones étudiées de la province d'Ouezzane se caractérisent par un relief de grande hauteur, constituant ainsi une contrainte pour son développement. L'enquête ethnopharmacologique a été menée dans cinq districts appartenant à la province d'Ouezzane : ZOUMI (34.797876N, -5.3472519W), MOKRISSET (34.921883,-5.353045), AIN BEIDA (35.018091, -5.526273), KALAAAT BOUKORRA (34.7479952N -5.1995802W) et BNI QUOLLA (34.741734, -5.539904).

1.2. Collecte des données

Afin de documenter le savoir faire local en matière d'exploitation des plantes médicinales, nous nous sommes basés sur une enquête préétablie utilisée dans d'autres études traitant le même thème ([Ennabili et al., 2006](#), [El-Hilaly et al., 2003](#), [Merzouki et al., 2003](#)). Plusieurs parcours ont été effectués pour compiler des données ethnobotaniques sur l'utilisation des plantes médicinales. La durée totale de terrain a nécessité environ 8 mois, de janvier 2015 à août 2015. La méthode utilisée pour la collecte de données était basée sur des entretiens semi-structurés ([Merzouki et al., 2003](#)), des discussions avec la population locale et des vendeurs. Au total, 113

personnes ont été interviewées. Les interviews ont été menées après avoir obtenu un accord des personnes interrogées. Diverses techniques ont été utilisées pour sélectionner les personnes ayant des connaissances traditionnelles relatives à l'utilisation de chaque plante médicinale (Yaseen et al., 2015). Le questionnaire utilisé pour la collecte de données avait deux objectifs principaux. D'une part, les données sur des personnes interrogées ont été collectées. La deuxième partie du questionnaire a été consacrée aux informations sur les plantes médicinales utilisées par les informants. Ces données concernent le nom local des plantes, les parties utilisées, le mode de préparation, la méthode d'administration, le mode d'utilisation et les maladies traitées.

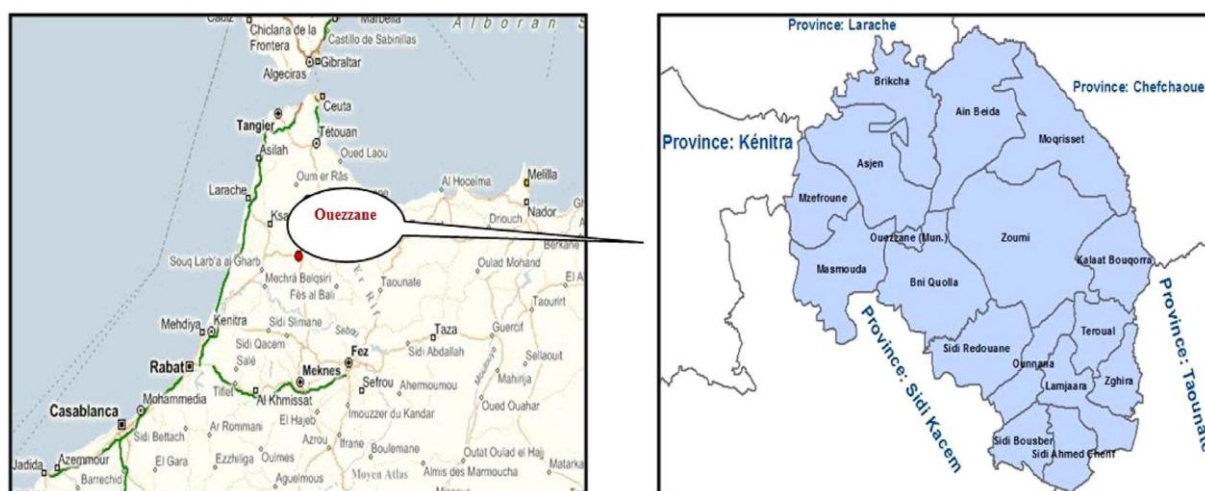


Figure 20: Carte de la province d'Ouezzane et ses zones étudiées

1.3. Identification des espèces de plantes médicinales

Au cours de cette étude, l'identification des plantes a été basée sur leurs noms locaux à l'aide des personnes interrogées. Les plantes utilisées ont été collectées et leur détermination taxonomique a été effectuée par le Pr. Ennabili Abdessalam (Laboratoire PAMSN, Institut national des plantes médicinales et aromatiques, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fes-Maroc). La confirmation de douteuses a été ensuite réalisée en se basant sur les ouvrages de références suivants : Flora marocaine (Fennane et al., 1999 ; Fennane et al., 2007); «Flore vasculaire du Maroc, inventaire et chorologie» (Fennane et al., 2005), la pharmacopée marocaine traditionnelle (Bellakhdar, 1997), les plantes cicatrisantes du Maroc (Sijelmassi, 2003) les plantes curatives au Maghreb et les soins de base (Bellakhdar, 2006).

1.4. Analyse quantitative des données

Facteur de consensus des informants (FCI)

Le FCI est principalement utilisé pour mesurer l'accord entre les informants et les plantes utilisées pour chaque maladie (Heinrich, 1998). Dans cette étude, le FCI a été calculé comme décrit par Kayani et al. (2014) en utilisant la formule suivante:

$$FCI = (Nur - Nt) / (Nur - 1)$$

Où: Nur est le nombre de rapports d'utilisation pour une catégorie d'utilisation particulière et Nt est le nombre de taxons utilisés pour une catégorie d'utilisation particulière par tous les informants.

Valeur d'utilisation médicinale (VUM)

La VUM des espèces étudiées a été calculée en utilisant la formule suivante (Tabuti et al., 2003): $VUM = U / n$. Où **VUM**: la valeur d'utilisation médicinale des espèces, **U**: le nombre total de rapports d'utilisation par espèce et **N**: le nombre total d'informateurs interrogés pour une plante donnée.

Niveau de fidélité (NF)

Le NF est utilisé pour traiter une maladie particulière. Il reflète le degré de préférence pour une espèce par rapport à d'autres (Musa et al., 2011). Il est calculé en utilisant la formule suivante (Yaseen et al., 2015): $NF = Ip / Iu \times 100$. Où: **Ip** est le nombre d'informateurs indiquant l'utilisation d'une espèce pour une catégorie de maladie particulière et **Iu** est le nombre d'informateurs indiquant l'utilisation de cette espèce pour toute catégorie de maladie.

2. Extraction et caractérisation phytochimique

2.1. Plantes récoltées et conditions optimales de cueillette

Les parties aériennes de quinze plantes médicinales les plus utilisées dans la médecine traditionnelle ont été récoltées au niveau de la région d'étude. Leurs noms scientifiques et vernaculaires sont représentés dans le [tableau 1](#). La récolte des plantes a été effectuée dans cinq sites géographiquement éloignées de la région d'étude. Le choix des sites est basé sur la distribution des plantes dans la région d'étude (nous avons réalisée au préalable des sorties dans les différents sites de la région d'étude pour voir une idée sur la distribution des plantes). Pour la récolte des plantes, certaines conditions ont été prises en compte. Premièrement, la période de l'année où la récolte des plantes a été effectuée pendant le stade de la floraison. Deuxièmement, la plante doit être débarrassée de toute impureté possible, soit le sol, la poussière, les pesticides et les herbicides qui doivent être éliminés. En ce qui concerne les travaux de laboratoire, il faut éviter les proliférations microbiennes et fongiques au cours de la conservation, ainsi que les activités enzymatiques non souhaitées. Les plantes récoltées sont séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré pendant quelques jours. Ensuite les parties végétales ont été bien conservées jusqu'à leur utilisation à des fins pratiques.

2.2. Préparation des huiles essentielles et des extraits organiques.

Pour l'extraction des HE, nous avons utilisé la méthode de l'hydrodistillation. Le milieu réactionnel constitué par la matière végétale et l'eau est porté à ébullition grâce à un chauffe-

ballon. La température est limitée par la température d'ébullition de l'eau 100°C. Les vapeurs chargées de substances volatiles, en traversant un condenseur, rencontrent l'eau froide à contre-courant et se condensent pour être récupérées dans une ampoule à décanter. L'eau et l'HE se séparent par différence de densité. Après la distillation, on introduit les HE dans des flacons opaques et étanches pour leur protection contre la lumière, ces flacons sont déposés dans un réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité jusqu'à leur éventuelle utilisation.

Tableau 1 : Plantes médicinales utilisées dans l'étude expérimentale (voir annexe)

Nom botanique	Nom vernaculaire	Partie récoltée
<i>Origanum compactum</i> (Benth)	Za'tar	Sommités fleuries
<i>Mentha pelegium</i> (L)	Fliyou	Sommités fleuries
<i>Mentha viridis</i> (L)	Na'naa	Sommités fleuries
<i>Rosmarinus officinalis</i> (L)	Azir	Sommités fleuries
<i>Salvia officinalis</i> (L)	Salmia	Sommités fleuries
<i>Myrtus communis</i> (L)	Rihan	Feuilles
<i>Lavandula stoechas</i> (L)	Halhal	Sommités fleuries
<i>Daphne gnidium</i> (L)	Metnan	Feuilles
<i>Centaurium erythraea</i> (Raf)	Gossat Lhaya	Sommités fleuries
<i>Cistus albidus</i> (L)	Chteppa	Partie aerienne
<i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb	Chandgora	Feuilles
<i>Arbutus unedo</i> L	Senou	Feuilles
<i>Cistus monspeliensis</i> L	Lossik	Feuilles
<i>Cistus crispus</i> L	Ouekir	Feuilles
<i>Eucalyptus globulus</i> L	Kellito	Feuilles

Pour l'extraction des extraits organiques, nous avons utilisé quatre solvants (méthanol, n-Hexane, éthanol et acétate d'éthyle) pour avoir des polarités différentes entraînant ainsi des composés divers. L'extraction est réalisée par la macération (Figure 21).

2.3. Caractérisation phytochimique des extraits

2.3.1. Dosage de polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, a été décrit en par Singleton et Rossi (1965). Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur

jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption est maximale à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. La quantification des phénols totaux dans les extraits nécessite de tracer une courbe d'étalonnage d'un phénol étalon (standard) comme l'acide gallique (acide 3,4,5-rihydroxybenzoïque) (Singleton et Rossi, 1965).

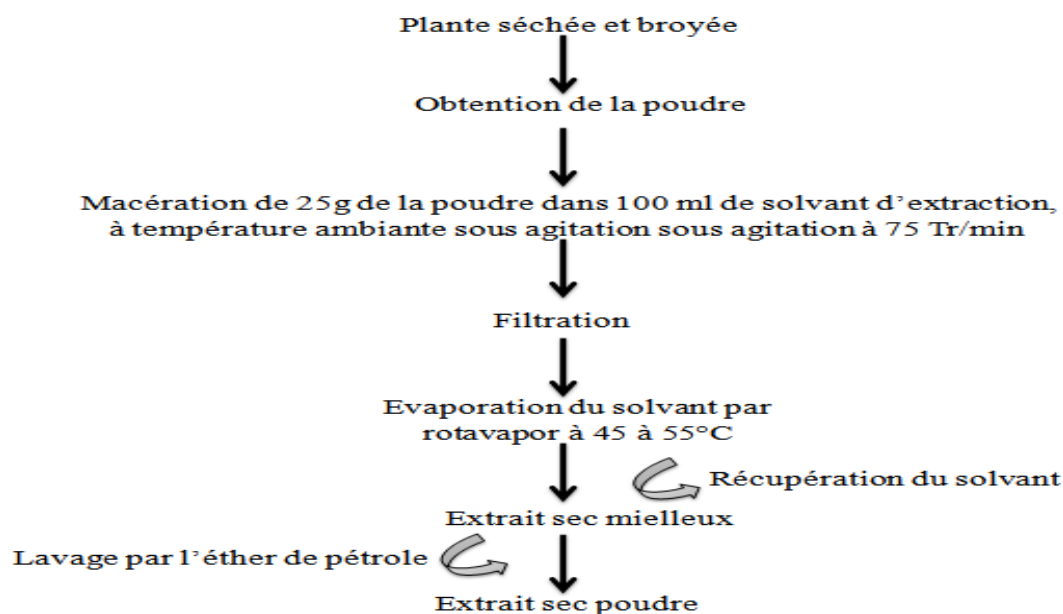


Figure 21: Protocole de préparation des extraits de plantes. Nous avons réalisé la macération de la poudre des différentes plantes (25 g de poudre dans 100 ml de solvant) dendant trois jours à température ambiante et en agitation à raison de 70 tours/ minutes. Le mélange est filtré sur papier filtre puis sur papier Watman. et le filtrat obtenu est concentré sous vide à l'aide d'un rotavapor et les résidus obtenus sont ensuite placés dans un dessiccateur afin d'éliminer totalement le solvant. Les extraits obtenus sont stockés dans des récipients opaques à -12°C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation. A ce stade, le rendement est calculé à partir de l'extrait final par rapport au poids de la plante sèche.

Pour le dosage des phénols totaux, les extraits sont dilués à une concentration de 1 mg/mL. 100 µl de l'extrait dilué sont mis dans des tubes à essai, puis 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu dilués 10 fois dans de l'eau distillée sont additionnés. Après une incubation d'une heure à température ambiante, 2 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 2 % sont ajoutés. Les tubes sont ensuite agités et placés à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Les mêmes étapes ont été suivies pour établir une gamme étalon (0 à 100 µg/mL) préparée à partir d'une solution mère aqueuse d'acide gallique (0.5 g/L). La lecture de l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 760 nm. Les valeurs de l'absorbance de chaque concentration nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de

l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait sec). Toutes les manipulations ont été réalisées en triple.

Les valeurs de concentration seront directement lues à partir des droites d'étalonnage établies à l'aide de la solution de référence d'acide gallique, de la forme $Abs = a \times [AG] + b$. La concentration de l'échantillon est exprimée en mg d'équivalent de l'étalon par gramme d'extrait sec ou de matière sèche. Où : a représente la pente et b l'ordonnée à l'origine de la droite étalon.

La gamme d'acide gallique est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 1000 mg/l (Figure 22).

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes sont mesurés par une méthode adaptée de [Lamaison et Carnat \(1990\)](#), en utilisant le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) comme réactif. L' $AlCl_3$ forme une liaison avec les doublets libres de l'oxygène des groupements OH des flavonoïdes, en produisant un complexe de couleur jaune, dont l'absorbance maximale est enregistrée à 415 nm. Les quantités des flavonoïdes dans nos extraits, sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde étalon la quercétine.

Pritiquement, trois solutions ont été préparées : La première est une solution aqueuse de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 10 % (w/v). La seconde est une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 5 % (w/v) dans de l'eau distillée, et, enfin, la dernière est une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ($NaOH$) à 1 M. Une solution méthanolique à 1g/L de catéchine a servi de référence. Les solutions filles qui sont préparés à partir de la solution de références ont permis de tracer la courbe d'étalonnage.

1mL de l'extrait des plantes est mélangé avec 1 mL de la solution trichloride d'aluminium (2%) et une goutte d'acide acétique. Les tubes sont ensuite agités légèrement et incubés à l'obscurité pendant 40 minutes à température ambiante. Dans les mêmes conditions, une solution mère de quercétine de concentration massique 0.2 g/L a été préparée avec le méthanol. A partir de cette solution mère, une gamme étalon de concentrations allant de 0 à 25 $\mu g/mL$ a été préparée. L'absorbance est mesurée à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 415 nm. Les valeurs de l'absorbance ainsi obtenues nous ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la quercétine. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent quercétine par g d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait sec). Toutes les manipulations sont réalisées en trois essais.

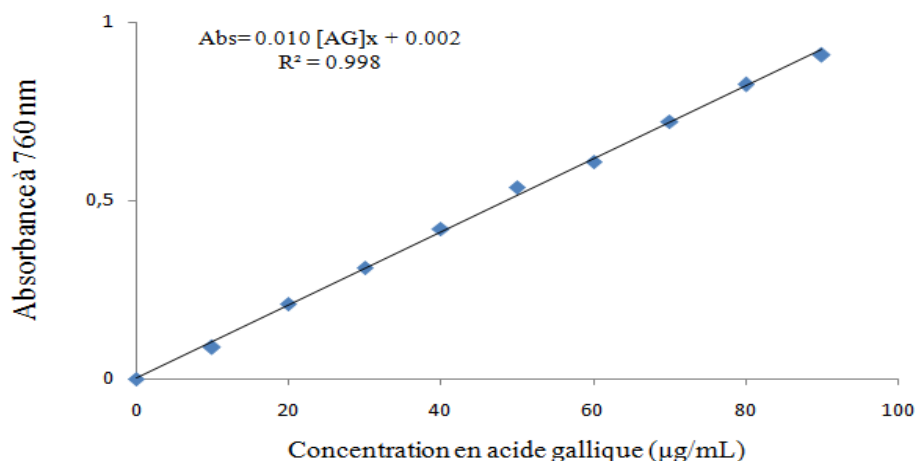


Figure 22: Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le réactif de Folin-Ciocalteu

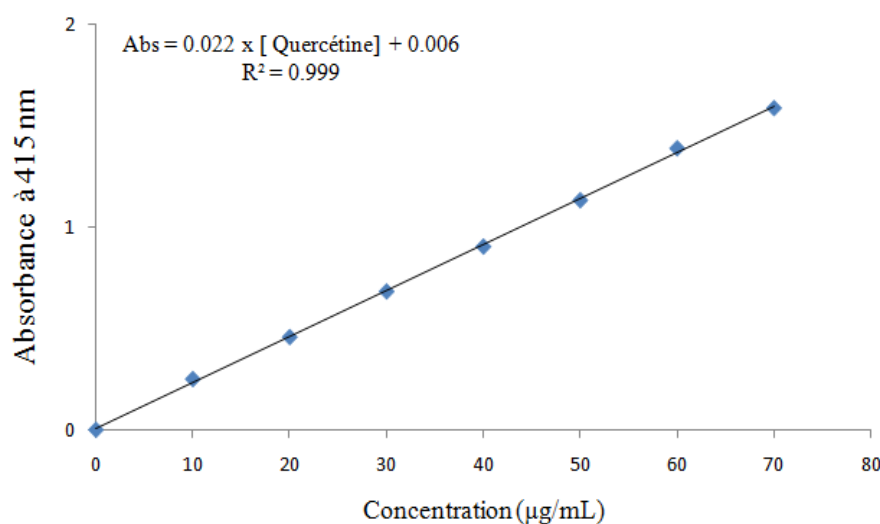


Figure 23: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

Les valeurs de concentration seront directement lues à partir de la droite d'étalonnage établies à l'aide de la solution de référence, de la forme $Abs = a \times [Cat] + b$. La concentration de l'échantillon est exprimée en mg d'équivalent de l'étalon par gramme d'extrait sec ou de matière sèche. La gamme de catéchine est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 80 mg/L (Figure 23). La quantité de flavonoïdes totaux de l'extrait testé à une concentration fixe est alors calculée à l'aide de l'équation de la droite d'étalonnage à partir des valeurs d'absorbances mesurées.

2.4. Caractérisation chimique des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

L'analyse de CG-SM des HE a été réalisée comme décrit par [Essid et al. \(2015\)](#) et [Talbaoui et al. \(2016\)](#). Elle a été réalisée sur un système de TRACE GC ULTRA équipé de VB5 non-polaire (5% de

phényle, 95% de méthylpolysiloxane), d'une colonne capillaire (30 m × 0,25 mm id, l'épaisseur du film est de 0,25 µm), directement couplé à un spectromètre de masse (Polaris Q) (EI 70 eV). La température de l'injecteur et du détecteur a été fixée respectivement à 250 et 300°C. La température du four a été programmée de 40 à 180°C à 4°C/min, pour 180-300°C à 20°C/min. L'hélium a été utilisé comme support de gaz avec un débit de 1 ml/min; l'échantillon (0,5 µL) a été injecté sans fraction. Les composants des HE ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention relatifs avec ceux d'échantillons authentiques ou par comparaison des indices de rétention relatifs (RRI) des pics de CG à ceux d'une série homologue de n-alcanes (séries de C-9 à C- 24 n-alcanes) rapportés dans la littérature. Chaque composé a été confirmé par comparaison des spectres de masse avec ceux des données de bibliothèque NIST02 du système CG/SM et des spectres des bibliothèques Adams (NIST / EPA / NIH, 2002; Adams, 2007) ([Adams, 2007](#)). Pour le pourcentage de composants individuels, nous avons établi des abondances en normalisant les zones de pointe CG de chaque composé sans aucun facteur de correction.

3. Etude de l'activité antiproliférative

3.1. Lignées cellulaires testées

La lignée cellulaire cancéreuse utilisée dans cette étude a été obtenue auprès de l'Institut National d'Hygiène de Rabat. Ces cellules sont issues de la collection ATCC (American Type Culture Collection, USA). **1)** Lignée RD : Cellules de rhabdomyosarcome embryonnaire humaine (ATCC N°CCL-136), **2)** Lignée L20B : Cellules de rhabdomyosarcome embryonnaire des souris (3T6Swiss albino, ATCC CCL96) et **3)** Lignée Vero : Cellules cancéreuses de rein de singe vert (ATCC N°CCL-81). Outre leur disponibilité, ces lignées ont été choisies grâce à leur entretien et culture relativement faciles. Elles sont également stables au cours du repiquage. *In vitro* les cellules sont réfringentes et développent une couche monocellulaire. Les CMSP (*Peripheral blood mononuclear cell : PBMC*) sont utilisées comme des cellules normales dans le test antiprolifératif pour évaluer le niveau de toxicité des produits testés. Immédiatement après la collecte, les échantillons de sang ont été dilués avec un volume égal de milieu essentiel minimal MEM et stratifiés sur Ficoll (Pancoll, Biotech) pour la séparation progressive des cellules. La couche de PBMC a été recueillie après centrifugation à 300 g pendant 30 min, puis lavée deux fois avec du MEM. Les PBMC ont été remises en suspension dans le milieu MEM ([Riedhammer et al., 2010](#)).

3.2. Culture des cellules

La culture de ces cellules se fait dans les milieux de culture MEM (Gibco). Ce milieu est une solution nutritive de couleur rose, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et d'un mélange de pénicilline-streptomycine-néomycine (Sigma) ([Aneb et al., 2016](#)). L'incubation de cellules se fait dans l'étuve à 37°C en atmosphère humide enrichie de dioxyde de carbone. Afin

de conserver des cellules souches dans des conditions optimales de croissance, il faut repiquer les cellules 48 heures après.

Dès leur arrivée à confluence, les cultures sont traitées pour être repiquées en sous-culture. La technique largement utilisée consiste à recouvrir les cellules préalablement débarrassées de leur milieu (MEM) et lavées, dans une solution diluée de trypsine (Sigma) : c'est la trypsination. Cette opération permet de décoller les cellules du fond du support par dissociation des liaisons intercellulaires et d'éliminer les cellules mortes. Pour réaliser la trypsination des cellules, on élimine le milieu de culture de flasque à trypsiner. Puis on lave les cellules et on dépose de la trypsine dans les flasques. Les flasques sont ensuite incubées de 3 à 5 min à 37 °C (temps nécessaire à l'action de trypsine). Après avoir totalement dissocié les cellules, l'action de trypsine est ainsi arrêtée par l'ajout du milieu de culture complet. Nous avons entrepris plusieurs opérations successives d'aspiration et de refoulement afin de décoller les cellules, les suspensions cellulaires sont ensuite centrifugées à 1500 rpm pendant 5 min. le culot est récupéré et resuspendu dans le milieu frais pour êtreensemencé dans plusieurs flasques pour l'entretien ou dans des microplaques de 96 puits à font plat pour le test de cytotoxicité.

Pour la conservation des cellules, nous avons adopté la méthode de congélation, la méthode la plus utilisée pour la conservation de longue durée. En effet, les très basses températures ont été utilisées pour la conservation des tissus biologiques, dans le but de bloquer les phénomènes physico-chimiques qui mènent à l'altération fonctionnelle ou totale durant le stockage des suspensions cellulaires que l'on souhaiterait sauvegarder. Les cellules trypsinées et lavées sont conservées en utilisant le DMSO comme produit de conservation. Les cellules sont mises dans le milieu de culture pour la conservation (90% de ce milieu contient 20% SVF + 10% DMSO). La congélation est réalisée à -80°C. Ensuite, les ampoules contenant ces cellules congelées sont transportées dans un bac contenant de la glace puis sont mises dans un bain marie à 37°C. Le contenu de l'ampoule décongelé est versé dans un tube contenant 13ml de milieu complet. Les cellules sont centrifugées 400g pendant 5 min et remises en suspension dans le milieu de culture complet après avoir éliminé le surnageant.

3.3. Evaluation de l'activité cytotoxique par le test MTT

Le test MTT permettra de déterminer les fractions actives parmi les produits testés. Le test se réalise sur les plaques à font plat de 96 puits. Les plaques sont préparées 48h avant la réalisation du test. Pour cela, on dispose dans chaque puits d'une suspension de cellules (à raison de 50.000 cellules/puits). Le dénombrement se fait au microscope avec utilisation d'une lame de Malassez pour le comptage des cellules viables et des cellules mortes de couleur bleue. Le bleu trypane (Sigma) est un colorant qui pénètre dans les cellules mortes ce qui leur donne une couleur bleue. Les plaques sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C, sous une atmosphère saturée en eau

enrichie de 5% de CO₂. Après 24h d'incubation 100 µL de substance à tester à différentes concentrations sont déposées en triplica dans les puits et mises en incubation pendant 48h à 37°C. Quatre heures avant la fin d'incubation, 20 microlitre de MTT sont ajoutés dans chaque puits. Le temps de contact est de 4 h dans une étuve à 37°C à 5% de CO₂. Les cellules viables ont alors métabolisées le MTT en cristaux de formazan. A l'aide d'un microscope inverse, nous visualisons l'état des cellules. Ensuite, afin de pouvoir effectuer la lecture par spectrophotométrie, il est nécessaire de solubiliser les cristaux de formazan éventuellement formés. Pour cela, nous retirons 100 µL de chaque puits à l'aide d'une pipette, les cellules restent dans le fond des puits. Nous ajoutons ensuite 100 µL de tampon de lyse (isopropanol/ HCl) dans chaque puits et nous agitons la plaque jusqu'à une solubilisation complète. Enfin, l'absorbance (D.O) est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque à 550 nm ([Merghoub et al., 2009](#) ; [Abdeljabar et al., 2009](#) ; [Aneb et al., 2016](#)).

Les cellules non traitées avec les produits testés sont utilisées comme témoin négatif. Le pourcentage de cytotoxicité est ainsi calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = (\text{AbsT} - \text{AbsC}) / (\text{AbsT}) \times 100$$

D'où : Abs T : absorbance des cellules non traitées (témoin) et Abs C : absorbance des cellules traitées. L'IC₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) est déterminée en fonction du pourcentage de cytotoxicité aux concentrations des produits testés. L'indice de sélectivité pharmacologique (ISP) est un paramètre intéressant qui définit l'équilibre entre l'effet pharmacologique des composés et leur toxicité. Il correspond à la concentration active la plus élevée contre les cellules cancéreuses sans toxicité contre les cellules normales. Il s'exprime comme le rapport entre la valeur d'IC₅₀ sur les cellules normales / IC₅₀ sur les cellulaires cancéreuses ([Essid et al., 2016](#)).

4. Etude de l'activité antioxydante

4. 1. Test de piégeage du radical DPPH

La mesure de l'activité antiradicalaire a été testée selon la méthode spectrophotométrique de Blois telle qu'elle a été adaptée par [Brand-Williams et al. \(1995\)](#). Le principe de cette méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres de DPPH (1,1-diphényl-2- picryl hydrazyl) en solution dans le méthanol. L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à un changement de coloration du violet foncé (DPPH stable) au jaune ou incolore (DPPH réduit). Ce changement est directement proportionnel à la capacité antioxydante du produit ajouté, il est déterminé indirectement par mesure de la densité optique par spectrophotométrie UV-VIS à 517 nm.

Des aliquotes (0.2 mL) de diverses concentrations (62.5-1000 µg/mL) des extraits de plantes ont été ajoutés à 1.8 ml d'un mélange de 0.004% solution méthanolique de DPPH. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée contre un blanc à 517 nm [11]. Le pourcentage (%) pour éliminer le radical DPPH a été calculé par la formule suivante (Bouterfas et al., 2016):

Activité de balayage DPPH (AA en%) = $[(Ac-At) / Ac] \times 100$. Où, Ac est l'absorbance du contrôle (sans extrait), et At est l'absorbance du test (avec extrait). Le Trolox et l'acide ascorbique ont été utilisés comme témoins positifs. La concentration d'extrait fournissant 50% de l'inhibition de DPPH (IC₅₀) est calculée à partir de la courbe tracée de la capacité d'inhibition (AA en%) contre les concentrations d'extraits et de normes en utilisant des équations de régression linéaire.

4. 2. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un produit est associé à son pouvoir antioxydant. Ce test est déterminé selon la méthode d'Oyaisu (1986). Cette activité est basée sur la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'échantillon à tester. Le pouvoir réducteur du fer par les extraits de végétaux est étudié en utilisant la méthode du chlorure de potassium de ferricyanide-ferrique comme décrit par Bey-Ould Si Said et al. (2016) et El Jamli et al. (2016). En effet, on a mélangé 1 mL d'extrait à différentes dilutions dans du méthanol pur (10, 20, 30, 40 et 50 mg ml⁻¹) avec du tampon phosphate (1 ml, 0,2 M'w/v', pH 6,6) et du ferricyanure de potassium [K₃Fe (CN) ₆] (1 ml, 1% 'w / v'). Le mélange obtenu a été incubé à 50°C pendant 20 minutes pour réduire le ferricyanure. Un volume de 2,5 mL d'acide trichloroacétique (10%) est ajouté à la solution et centrifugé à 1000 tr / min pendant 10 min. Le surnageant a été recueilli et mélangé avec de l'eau distillée (1,5 ml) et du FeCl₃ (150 µL, 0.1%'/v'), et l'absorbance est enregistrée à 700 nm. La concentration d'échantillon fournissant 0,5 d'absorbance (IC₅₀) est calculée en traçant la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration d'échantillon correspondante. L'acide ascorbique et le Trolox sont utilisés comme des standards. Le test est effectué en triplica et les valeurs d'IC₅₀ sont rapportées comme la moyenne ± SD.

4. 3. Balayage du radical ABTS

La méthode de radical ABTS est l'un des tests les plus utilisés pour la détermination de la concentration des radicaux (El Jamli et al., 2016). Il est basé sur la neutralisation d'un radical - cation résultant de la mono électronique oxydation du chromophore synthétique 2,2'- azino-bis (3 éthylbenzothiazoline -6- sulfonique acide) (ABTS) : ABTS-ABTS⁺+e⁻. Cette réaction est suivie par spectrophotométrie par la variation de spectre d'absorption. L'activité de balayage du

radical ABTS est déterminée selon la méthode adaptée d'El Jemli et al. (2016) avec quelques modifications. La réaction se fait entre 5 ml de solution mère ABTS et 5 ml de solution de persulfate de potassium (K₂S₂O₈) 2,45 mM, placée dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 heures. Avant utilisation, cette solution a été diluée avec de l'eau pour obtenir une absorbance de 0.7 à 734 nm et équilibré à 30°C. Les produits testés à différentes concentrations sont dilués avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour obtenir une solution d'échantillon. 5 ml de solution d'échantillon sont homogénéisés avec 195 ml de solution ABTS, le mélange est incubé à température ambiante pendant 6 min et son absorbance est enregistrée à 734 nm. La capacité de balayage d'ABTS est exprimée en IC₅₀ (µg/mL) et le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante: l'activité de balayage du radical ABTS (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$. Où: A₀ est l'absorbance du témoin, et A₁ est l'absorbance de l'échantillon.

5. Etude de l'activité antileishmanienne

5.1. Culture des leishmanies

La culture des leishmanies est une technique réalisée uniquement dans un laboratoire spécialisé, c'est une technique sensible qui permet de garder la souche viable pendant une longue durée grâce au repiquage. Le milieu de culture classique des formes promastigotes des leishmanies est le milieu NNN (Novy, McNeal et Nicolle) au sang de lapin ou le milieu MEM enrichi de sérum de veau foetal. Dans la présente étude, les leishmanies sont mis en culture au début dans le milieu diphasique NNN avec du sang de lapin, additionné de CC permettant aux leishmanies d'atteindre rapidement la phase stationnaire de la croissance. Après une durée de culture dans ce milieu, les leishmanies sont repiqués dans un milieu de culture liquide permettant une culture de masse, le milieu utilisé est le milieu MEM ou RPMI160 enrichi de SVF.

5.2. Espèces utilisées

Les espèces de *Leishmania* testées dans cette étude sont: *Leishmania infantum* (MHOM / MA/1998/LVTA), *Leishmania tropica* (MHOM/MA/2010/LCTIOK-4) et *Leishmania major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09). Ces trois espèces ont été isolées et identifiées chez des patients marocains infectés au Laboratoire National de Référence de Leishmaniose, à l'Institut National de la Santé, Rabat-Maroc. Les espèces ont été cultivées comme décrit par Et-Touys et al. (2016a). En effet, les cultures de chaque espèce de *Leishmania* ont été lavées avec une solution salée tamponnée au phosphate (PBS) et puis centrifugées à 1500 tr/min pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été ré-suspendues dans le RPMI 1640 (GIBCO) complété par 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur et 1% de mélange Penicilline-Streptomycine. Les cultures ont été maintenues à 23 ° C. Avant d'évaluer l'activité antileishmanienne, la densité cellulaire de chaque espèce a été calculée à l'aide d'un microscope optique. Lorsque la densité cellulaire

atteint une concentration seuil de 10^6 cellules/mL, *L. infantum*, *L. tropica* et *L. major* ont été lavées deux fois avec une solution salée tamponnée au phosphate (PBS) et centrifugées à 2500 tr/min pendant 10 minutes.

L'évaluation de l'activité leishmanicide a été évaluée à l'aide du dosage colorimétrique MTT (3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl) -2,5-diphényl tétrazolium) (Figure 24) tel que décrit par Essid et al. (2015). La viabilité cellulaire a également été évaluée par la détermination des concentrations du produit qui ont inhibé la moitié de la population cellulaire (IC_{50}), obtenue par la modélisation du pourcentage d'inhibition par rapport à la concentration d'extrait. Le pourcentage d'inhibition (%I) a été calculé en utilisant la formule suivante (Essid et al., 2015):

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Absorbance des cellules non traitées} - \text{Absorbance des cellules traitées})}{\text{Absorbance des cellules non traitées}}$$

L' IC_{50} (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) est déterminée en fonction du pourcentage d'inhibition aux concentrations des produits testés.

6. Etude de l'activité antibactérienne

6.1. Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes utilisées pour tester l'action de nos HE ont été choisies sur la base de leur appartenance à des groupes pathogènes et/ou incriminées dans le processus d'altération des aliments. La conservation de ces souches est faite dans un mélange de glycérol et de bouillon cœur cerveau (BHI). Pour une conservation de courte durée, les souches sont maintenues sur un milieu gélosé incliné à 4°C. Avant leur utilisation, les bactéries sont révisées par deux subcultures dans un milieu de culture approprié à 37°C pendant 18h à 24h. Le tableau 3 présente les souches bactériennes utilisées et leurs origines.

6.2. Préparation de la suspension bactérienne

La réactivation des souches est effectuée par ensemencement dans un milieu LB (Lauria Bertoni) *broth*) liquide à partir d'une culture originale de 18h à 24h à 37 °C dans une étuve. Un deuxième repiquage est réalisé sur le même milieu (LB liquide) et les tests antibactériens sont réalisés à partir des cultures jeunes en phase de croissance exponentielle. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/mL est effectuée à l'aide d'un spectromètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. Par exemple une densité optique de 0.65 correspond à $32 \cdot 10^7$ UFC/ml pour *Escherichia Coli* K12. La même technique de standardisation est utilisée pour les autres souches bactériennes.

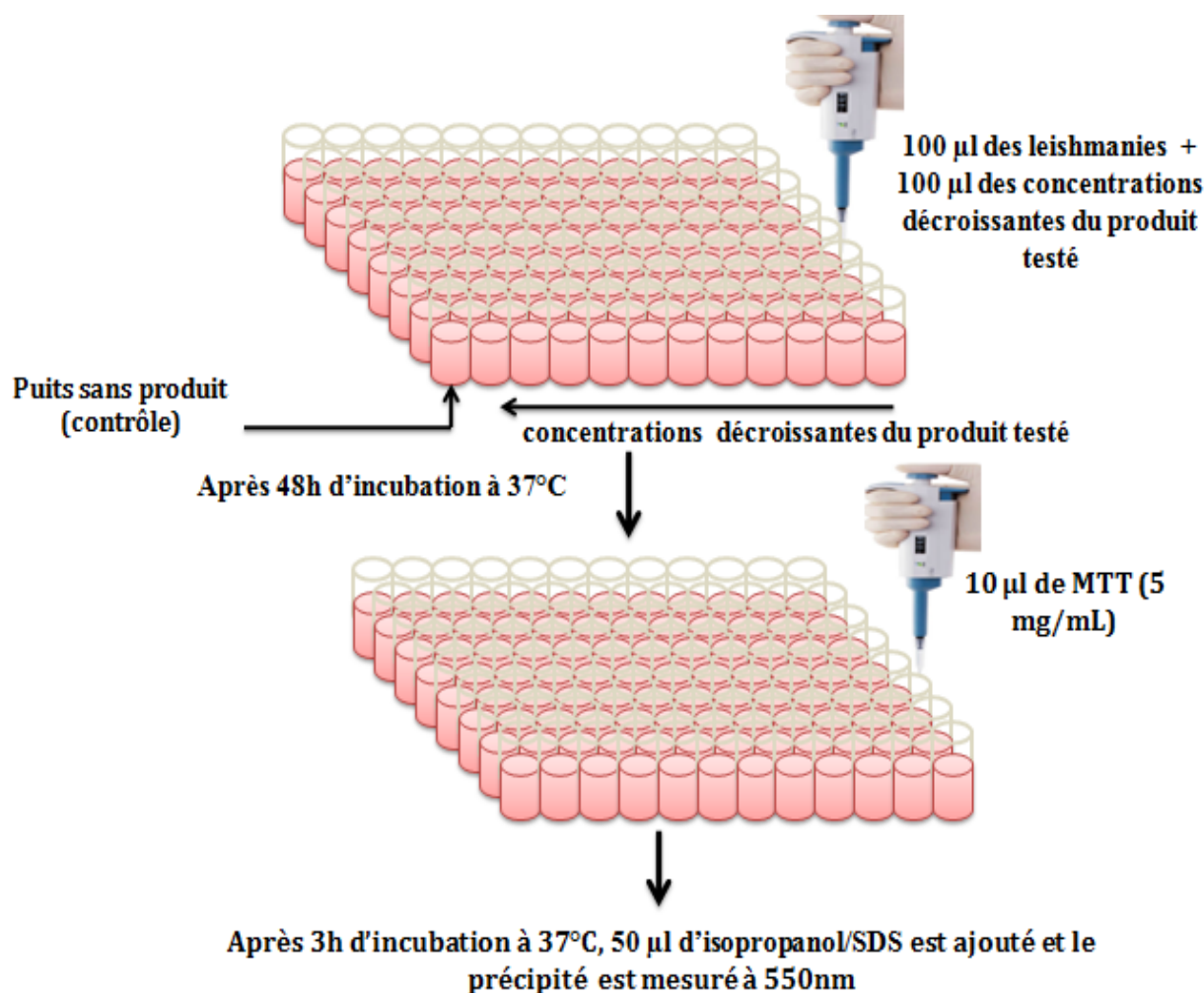


Figure 24: Evaluation de l'activité leishmanicide par le test MTT. 100 µL de culture de parasites (2.5×10^6 cellules/puits) ont été remis en suspension dans une plaque de culture tissulaire de 96 puits. 100 µL du produit testé à des concentrations décroissantes ont été ajoutés à chaque micro-puits et incubés pendant 72 heures à 23° C. Après 72 heures d'incubation, 10 µL de MTT (10 mg / mL) ont été ajoutés à chaque micro-puits et incubés pendant 3 heures à 23° C. La réaction a été arrêtée par addition de 50 L d'isopropanol à 50% (v / v) -10% (p / v) de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à chaque puits afin de dissoudre le formazan insoluble formé après réduction du colorant au tétrazolium. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 550 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA.

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées dans les tests antibactériens et leurs origines

Souche	Origine
Gram-	
<i>Escherichia coli</i> K12	Laboratoire de microbiologie alimentaire, UCL, Belgique (MBLA)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IH	Institut d'hygiène Rabat
<i>Proteus mirabilis</i>	Collection Espagnole de Culture Type (CECT)
Gram+	
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	Collection Allemande des microorganismes DSM
<i>Listeria monocytogenes</i> 4032	Collection Espagnole de Culture Type (CECT)
<i>Staphylococcus aureus</i> MBLA	Laboratoire de microbiologie alimentaire, UCL, Belgique (MBLA)
<i>Staphylococcus aureus</i> 976	Collection Espagnole de Culture Type (CECT)
<i>Staphylococcus aureus</i> 794	Collection Espagnole de Culture Type (CECT)

6.3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits

Le principe de cette technique consiste à estimer l'activité bactériostatique des produits antibactériens en mesurant les zones d'inhibition de croissance des germes autour de plusieurs puits contenant différentes concentrations des produits testées (Figure 25). Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, cette méthode est surtout utilisée en tant qu'étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs (Bouhdid et al., 2008).

6. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de micro-dilution

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en HE ou extrait organique. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en HE ou extrait capable d'inhiber la croissance bactérienne. La CMI est déterminée, dans ce travail, par la technique de micro-dilution en milieu liquide. Nous avons opté pour l'emploi d'un indicateur rédox: la Résazurine (Figure 26). La résazurine de coloration bleue est réduite sous l'action du métabolisme bactérien. Lorsque le potentiel redox du milieu atteint (-51mv), la résazurine est transformée en résorufine de coloration rose, la réaction est

irréversible. Et lorsque le potentiel redox du milieu atteint (-110mv), la résorufine est transformée réversiblement en dihydro-résorufine incolore (Bouhdid et al., 2008).

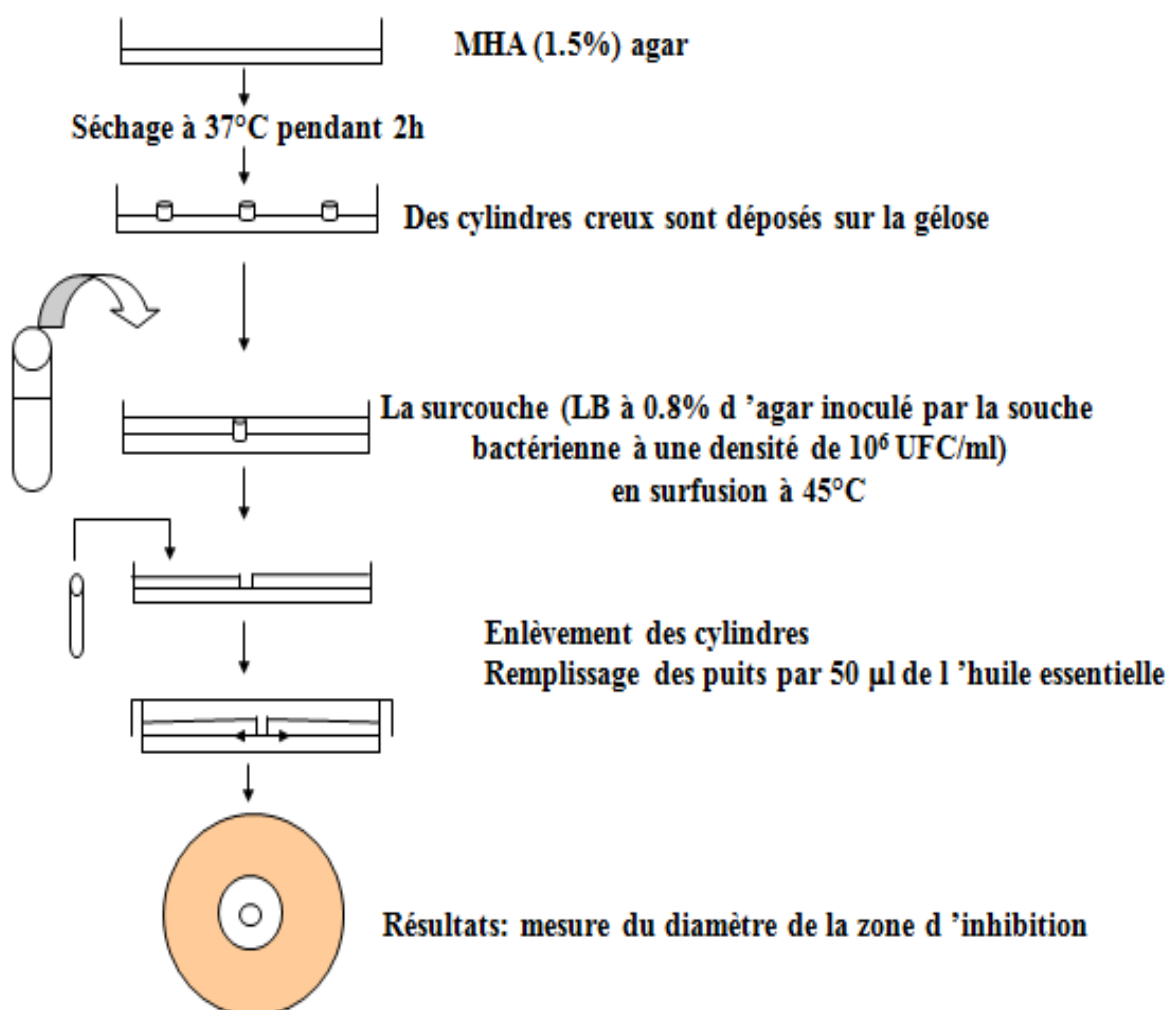


Figure 25: Diamètre d'inhibition exprimée dans la technique de diffusion en puits. *Pratiquement, huit ml du milieu Muller Hinton Agar (MHA) sont coulés dans les boîtes de Pétri vides. Sur cette couche basale, de petits cylindres (moules en verre), de 8 mm de diamètre, sont déposés. Un volume de 6 ml de milieu de Lauria-Bertoni (LB), contenant 0.8% d'agar, est ensemencé par une culture fraîche de la bactérie indicatrice de telle sorte que l'on ait une concentration finale d'environ 10^6 UFC/mL. Cette préparation est coulée délicatement sur la couche basale de MHA. Après solidification, les moules cylindriques sont enlevés générant à leur emplacement des puits de 8 mm de diamètre. Ces derniers sont remplis de 50 µL du produit à tester. Les boîtes sont ensuite scellées pour éviter l'évaporation des produits à tester. La diffusion de différents constituants de du produit testé dans le milieu gélosé est améliorée par une pré-incubation des boîtes de Pétri pendant 2h à 4°C. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à la température adéquate (37°C) pendant 24h. L'activité antibactérienne du produit se révèle par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits.*

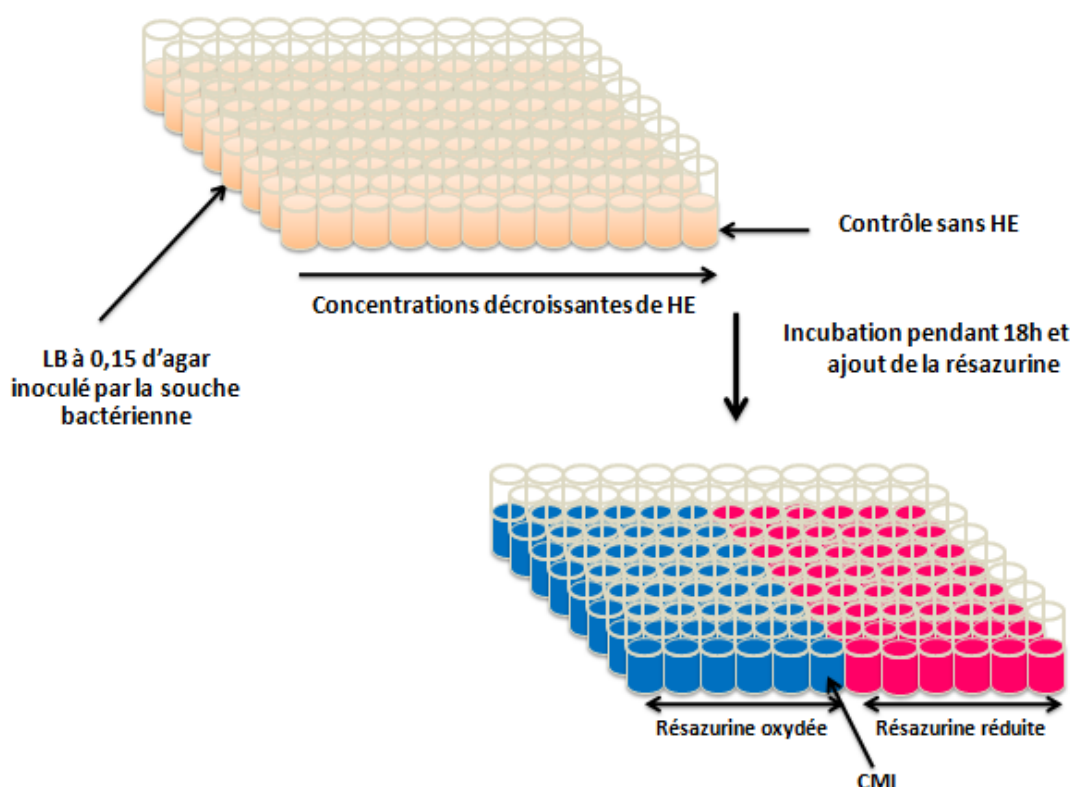


Figure 26: Schéma représentant la méthode de micro-dilution. Dans une plaque de micro dilution contenant 96 puits, des séries de dilutions des HE et des extraits ont été préparés dans le milieu LB à 0.15% allant du premier puits jusqu'à l'avant dernier. Ensuite à chaque puits sont ajoutées 50 μL du milieu LB à 0.15% d'agar inoculés à partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance en vue d'obtenir une concentration cellulaire finale d'environ 10^6 UFC/mL. Les puits servant de contrôle ne contiennent pas d'HE. Les plaques sont ensuite incubées à la température adéquate pour la croissance du germe (37°C) pendant 18h. La CMI correspond à la petite concentration d'HE qui ne produit pas de croissance bactérienne. Pour la détermination de la CMI, 10 μL de résazurine sont additionnés à chaque puits. Après 2h d'incubation, la CMI correspond à la plus petite concentration d'huile essentielle qui ne produit pas de changement de coloration de la résazurine.

6. 5. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99.9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une HE. La même gamme de concentration, réalisée par la technique de microdilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'HE à tester. A partir des puits témoins et dans chacun des puits où on n'a pas eu de changement de coloration de la résazurine, 10 μL sont prélevés et étalés à la surface du milieu PCA (*Plat Count Agar*), et la CMB correspond à la plus petite concentration qui ne donne aucune subculture. La CMB (% v/v) de l'HE est déduite à partir de la première boîte dépourvue de

bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois au cours de trois expériences successives (Bouhdid et al., 2008).

7. Mécanisme d'action antibactérien des huiles essentielles d'*Origanum compactum*

7. 1. Effet sur de la cinétique de croissance bactérienne

Le test de la cinétique de croissance a été utilisé pour étudier les effets bactéricides de l'HE. Les bactéries ont été traitées avec l'HE à MIC, 2 x MIC, MIC / 2 et le témoin ne contenant que du DMSO (1%). Ensuite, les bactéries ont été cultivées à 37 ° C pour 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 et 24 h, respectivement. A des intervalles de temps sélectionnés, la DO à 600nm des surnageants a été déterminée par spectrophotomètre UV-Vis. Toutes les mesures ont été effectuées en trois exemplaires. Par le dosage décrit ci-dessus, on a ordonné la courbe de croissance de *E. coli* et *B. subtilis*, le temps d'axe horizontal (0 h à 24 h), la densité optique (600nm) du surnageant comme axe vertical (Zhou et al., 2015).

7. 2. Effet sur l'intégrité de la membrane cellulaire

- Relargage du matériel génétique à travers la membrane bactérienne

L'intégrité de la membrane cellulaire pourrait être mesurée par la libération des constituants cytoplasmiques de la cellule tels que des matériaux génétiques (ADN et ARN) (Chen et Stuart, 2002). Les expériences ont été conçues comme suit: les bactéries ont été incubées dans un milieu NB à 37°C pendant 12 h. Les cellules bactériennes de la phase de croissance logarithmique ont été traitées avec l'HE à MIC, 2xMIC, MIC/2, un témoin (bactérie sans traitement avec l'HE) est également préparé. Ensuite, les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 1, 4, 8 et 24h respectivement. Les bactéries ont été séparées par centrifugation (10000 g) pendant 5 minutes à 4°C. Pour déterminer les quantités d'ADN et d'ARN libérées par le cytoplasme, le surnageant a été utilisé pour mesurer la densité optique à 260 nm.

- Relargage des protéines à travers la membrane bactérienne

L'intégrité cellulaire a été examinée en déterminant la libération de protéines dans le surnageant. Les concentrations de protéines dans les surnageants ont été déterminées par la méthode de Bradford (Bradford et al., 1976). Les cellules bactériennes en phase de croissance logarithmique ont été traitées avec l'HE à MIC, 2 x MIC, MIC/2, un témoin (bactérie sans traitement avec l'HE) est également préparé. Ensuite, tous les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 1, 4, 8 et 24 h respectivement. Ensuite, les bactéries ont été séparées par centrifugation (10 000 g) pendant 5 minutes à 4°C. Pour déterminer les concentrations de protéines libérées par le cytoplasme, on a utilisé le surnageant pour mesurer la densité optique à 595 nm.

7. 3. Effet sur la perméabilité de la membrane cellulaire

Le test de perméabilité de la membrane intérieure est réalisé par le nitroazène bêta-D-galactose glucoside voisin (ONPG) (Ryon) comme décrit par [Li et al. \(2016\)](#). En effet, la suspension de bactéries est diluée à 10^8 UFC/mL. Ensuite, l'ONPG (25mmol/mL) et l'HE ont été ajoutés à la suspension, les concentrations finales de l'huile essentielle étaient respectivement de CMI, CMI/2 et $2 \times$ CMI. La solution saline physiologique a été utilisée comme témoin. La suspension inoculée a été incubée à 37°C et les échantillons ont été recueillis respectivement à 0, 1, 2, 4 et 8 h. L'absorbance du surnageant des d'échantillons a été mesurée par spectrophotomètre à 420 nm.

7. 4. Effet anti-quorum sensing

Le criblage de l'activité anti-quorum des HE a été réalisé par la mesure de l'inhibition du biofilm (le phénotype majeur de l'expression du quorum sensing chez les bactéries). Le dosage de la formation de biofilm est réalisé dans des plaques de polystyrène à 96 puits comme l'ont déjà rapporté plusieurs études ([Taganna et al., 2011](#); [O'Toole et Kolter, 2002](#)). Une culture de nuit de *B. subtilis* et *E. coli* est diluée avec du bouillon LB et est mis en culture pendant 4 heures. Après addition de différentes concentrations des HE, des aliquotes de 100 μ L (10^7 UFC/mL) de culture ont été inoculées dans les puits et incubées pendant 24 h à 37°C. Par la suite, nous avons retiré le milieu et ajouté 100 μ L de cristal violet à 1% (p/v), dissous dans l'éthanol à 95%, à chaque puits. Après coloration à température ambiante pendant 20 minutes, le colorant a été éliminé et les puits ont été lavés à fond avec de l'eau stérile. Pour la quantification des cellules attachées, le cristal violet lié a été solubilisé dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'absorbance a été déterminée à 570 nm. L'absorbance mesurée permet de quantifier la formation totale de biofilms. Les puits sans HE sont considérés comme un contrôle négatif et la quercétine est utilisée comme témoin positif pour l'inhibition du biofilm ([Lee et al., 2013](#)).

Résultats

Article 1: Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities

Avant propos

L'homme a toujours utilisé les plantes médicinales pour se soigner. Le Maroc, grâce à sa situation géographique et son environnement bio-climatique diversifié, possède une flore végétale riche et variée. Les plantes médicinales constituent un pourcentage important de la flore marocaine et parfois avec des espèces endémiques et quasi-endémiques. Les régions du Nord du Maroc, en particulier le Nord-Ouest, sont très riches en plantes médicinales avec un savoir traditionnel très divers et qui reste à découvrir.

Dans ce contexte l'objectif de notre travail s'inscrit comme une priorité. Nous avons mené une étude ethnopharmacologique qui révèle les usages traditionnels des plantes médicinales au Nord-Ouest du Maroc (Province d'Ouezzane) ainsi que les connaissances traditionnelles liées à l'utilisation de cette ressource naturelle dans les soins de santé par la population locale et ceci afin de préserver et de protéger cet héritage précieux de la perte et de la négligence. Nous avons également cherché à cribler les propriétés pharmacologiques *in vitro* de certaines plantes médicinales rapportées dans cette étude. Dans ce travail, nous avons réalisé un questionnaire avec 113 personnes (habitants et herboristes locaux) en utilisant des méthodes semi-structurées et non structurées. Les données recueillies ont été analysées en calculant trois paramètres quantitatifs principaux: la valeur d'utilisation (VU), le niveau de fidélité (NF) et le facteur consensus d'informants (CFI). Les propriétés pharmacologiques de certaines plantes médicinales reportées ont été évaluées. L'activité antioxydante est estimée par le test de piégeage du radical DPPH et l'activité antibactérienne est évaluée par la méthode de diffusion en puits et la méthode de micro-dilution.

Il ressort de cette étude que 11% de la population locale utilisent la médecine traditionnelle seule, contre 67% utilisant à la fois la médecine moderne et traditionnelle. Au total, nous avons pu recenser les informations ethnomédicinales de 44 plantes utilisées représentant 28 familles botaniques. Les lamiacées sont les plus représentatives et comprennent 32% des espèces identifiées. L'utilisation médicale a révélé que les feuilles sont la partie la plus utilisée pour préparer les drogues, la décoction est la méthode de préparation la plus utilisée et les remèdes sont souvent administrés par voie orale. La valeur d'utilisation médicinale la plus élevée est obtenue pour *Origanum compactum* Benth. (VUM=0.62) et *Myrtus communis* L. (VUM=0.52). De plus, la valeur la plus élevée du niveau de fidélité (NV) est révélée pour *Origanum compactum* Benth. (100%), *Myrtus communis* L. (93.50%) et *Arbutus unedo* L. (93.50%). Alors que la valeur

la plus élevée du FCI est révélée pour les maladies du système respiratoire (FCI=0.69), la dermocosmétique (FCI=0.68), les problèmes du système digestif (FCI=0.63) et les troubles du système nerveux (FCI=0.69). Du point de vue pharmacologique, les extraits et les HE des plantes ont présenté des propriétés antibactériennes importantes contre les souches pathogènes et des capacités antioxydantes significatives.

Les données ethnopharmacologiques documentées dans ce travail ont révélé l'utilisation de plantes médicinales dans le Nord-Ouest du Maroc pour lutter contre les maladies. Par conséquent, des efforts sont nécessaires pour améliorer le niveau de la documentation, la conservation et la normalisation de ces espèces ainsi que pour préserver la transmission des connaissances traditionnelles. Par ailleurs, d'autres études testant d'autres extraits de plantes dans d'autres systèmes pharmacologiques sont nécessaires pour explorer davantage le potentiel biologique scientifique de ces plantes.

Article 2: *In vitro* antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines

Avant propos

Le cancer est une maladie complexe caractérisée par une diversité étiologique et de multiples étapes évolutives. Elle se déclenche suite à la dérégulation dans les programmes génétiques et épigénétiques due à plusieurs facteurs tels que les mutations géniques, les infections microbiennes, les carcinogènes chimiques et les perturbations hormonales. Lorsque les cellules deviennent cancéreuses, elles continuent à se diviser éternellement sans aucune réponse à la signalisation d'apoptose ou de la sénescence. Les traitements actuels reposent essentiellement sur l'utilisation des drogues chimiques (chimiothérapie) qui tuent souvent les patients par leurs effets collatéraux sur les cellules normales ; ces drogues ciblent les cellules en division rapide et provoquent ainsi des effets indésirables sur les cellules normales qui se caractérisent également par une division rapide. Cependant, les médecins ont toujours appliqué ces traitements en aveugles visant à combattre les cellules anormales sans connaissances moléculaires des causes de la maladie. Grâce aux progrès décisifs de la biologie moléculaire (génome, transcriptome, protéome, méthylome et l'épigénome), de nouvelles pistes de réflexion sur le traitement du cancer voient le jour. En effet, de nouvelles approches visant à cibler spécifiquement les cellules tumorales sans affecter les cellules normales commencent à être dynamique aujourd'hui. Le criblage de plusieurs molécules de nature diverse est nécessaire pour décortiquer des panoplies des molécules ciblant spécifiquement les différentes voies du cancer. Par ailleurs, le stress oxydatif causé est par un taux excessif d'espèces réactives d'oxygène. Ces réactifs induisent des mutations d'ADN et, dans le cas de réparations insuffisantes, ils jouent un rôle pronostique ou étiologique dans le cancer. Le ciblage du stress oxydant par les antioxydants peut également réduire le risque de genèse du cancer.

Dans cette optique, nous avons procédé dans ce travail au criblage des extraits organiques (méthanol, éthanol et n-hexane) de cinq plantes médicinales collectées d'Ouezzane (*Origanum compactum*, *Centaurium erythraea*, *Cistus crispus*, *Arbutus unedo* et *Myrtus communis*) pour leur propriétés antiprolifératives et antioxydantes. L'activité antiproliférative est testée sur trois lignées cellulaires cancéreuses L20B, RD et Vero en utilisant le test de cytotoxicité MTT et l'indice de sélectivité pharmacologique (PSI) calculé en utilisant des PBMC comme lignée cellulaire normale. L'activité antioxydante est évaluée par le test de FRAP et d'ABTS.

Les extraits de toutes les plantes ont montré une activité antiproliférative importante avec une variabilité. L'extrait hexanique de *C. crispus* a présenté de remarquables effets cytotoxiques spécifiques contre la lignée RD ($IC_{50}=04.75 \mu\text{g/mL}$, $ISP=36.48$) et L20B ($IC_{50}=07.16 \mu\text{g/mL}$, $ISP=24.20$). En outre, l'extrait hexanique d'*O. compactum* a montré une activité antiproliférative

sélective contre la lignée Vero ($IC_{50}=13.72 \mu\text{g/mL}$, $PSI=11.46$). En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'extrait méthanolique de *M. communis* a montré une remarquable capacité antioxydante mesurée par des tests d'ABTS et de réduction du fer avec des valeurs d' IC_{50} de $32.07\pm 0.53 \text{ mg/mL}$ et $07.43\pm 0.07 \text{ mg/mL}$, respectivement. Les résultats prometteurs obtenus n'ont pas révélé, cependant, des liens de causalité entre les effets antioxydants et antiprolifératifs, ce qui laisse penser, certes, que les extraits ayant montré des effets antiprolifératifs agissant sur d'autres cibles cellulaires qu'au niveau de stress oxydant. Ces espèces pourraient être considérées comme des sources potentielles de composés anticancéreux et antioxydants. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour la caractérisation chimique des composés actifs et d'examiner leur mode d'action.

Article 3: Anticancer and antidermatophyte activities of essential oils from three Moroccan medicinal plants (préparé)

Avant propos

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antiproliférative et anti-dermatophyte des HE de *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis* et *Lavandula stoechas*. L'effet cytotoxique a été effectué sur les lignées cellulaires cancéreuses Vero, L20B et RD en utilisant le test MTT. L'activité anti-dermatophyte est testée sur *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans* et *Trichophyton mentagrophytes* en utilisant la méthode de contact direct sur un milieu solide. L'HE de *L. stoechas* a montré une activité antiproliférative intéressante contre RD ($IC_{50}=19.03\pm 28,05$ $\mu\text{g/mL}$) et L20B ($IC_{50}=33.84\pm 1.72$ $\mu\text{g/mL}$). En outre, l'huile de *M. pulegium* a un effet cytotoxique important contre la lignée cellulaire Vero ($IC_{50}=60.21\pm 1.9$ $\mu\text{g/mL}$). Les meilleurs indices de sélectivité pharmacologique ont été obtenus avec de l'HE de *L. stoechas* sur les lignées cellulaires RD (11.098) et L20B (6.241).

L'huile essentielle de *R. officinalis* a montré des effets anti-dermatophytes remarquables que celle de *L. stoechas* et *P. pulegium*. Les valeurs d' IC_{50} de l'HE de *R. Officinalis* contre *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* et *T. tonsurans* étaient respectivement de 0.53, 0.60 et 0.64% (v/v). Les résultats de ces résultats ont montré que les huiles essentielles de *L. stoechas* et *M. pulegium* sont une source importante pour la découverte des agents anticancéreux et l'HE de *R. officinalis* est une source prometteuse d'agents anti-dermatophytes. Cependant, d'autres études sur les propriétés pharmacologiques sur d'autres types de lignées cellulaires cancéreuses et d'autres espèces fongiques sont nécessaires. De, des recherches concernant le mécanisme d'action de ces huiles et leurs principaux composés sont également nécessaires.

Article 4: Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco.

Avant propos

La leishmaniose est une maladie parasitaire qui menace très dangereusement la santé publique, en particulier dans l'Afrique avec un taux de mortalité très élevé et de morbidité quasi-total. Les souches leishmaniales ont développé des mécanismes de résistance spécifiques contre les drogues antileishmaniennes, en particulier les produits de synthèse. Récemment, de nombreuses recherches ont été avancées pour cribler de nouveaux agents antileishmaniens qui possèdent une efficacité sélective. Dans ce sens, les extraits de plantes médicinales constituent une source importante dans le screening des agents antileishmaniens. L'objectif de l'étude ainsi envisagée est d'évaluer l'activité antileishmanienne de certaines plantes médicinales du Nord-Ouest du Maroc. Les plantes étudiées sont : *Origanum compactum*, *Myrtus communis*, *Cistus crispus*, *Arbutus unedo*. Les extraits organiques des plantes sont préparés par macération en utilisant trois solvants : méthanol, éthanol et n-hexane. L'activité antileishmanienne est évaluée contre *Leishmania major*, *Leishmania tropica* et *Leishmania infantum* en utilisant le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium). Tous les extraits de plantes ont révélé une réduction de la viabilité cellulaire des promastigotes testés avec une variabilité entre les souches testées et le type d'extraits. L'extrait hexanique a présenté généralement l'activité antileishmanienne la plus élevée et *L. infantum* s'est montré le parasite le plus sensible. La meilleure inhibition de la croissance est observée avec l'extrait hexanique de *C. crispus* contre *L. major* ($IC_{50}=47.29\pm2.25 \mu\text{g/mL}$), l'extrait hexanique d'*A. unedo* contre *L. infantum* ($IC_{50}=64.05\pm1.44 \mu\text{g/mL}$) et contre *L. tropica* ($IC_{50}=79.57\pm2.66 \mu\text{g/mL}$). Les résultats obtenus montrent que les plantes médicinales du Nord-Ouest du Maroc pourraient constituer une potentielle source d'agents antileishmaniens. Cependant, l'évaluation de ces extraits contre les formes amastigotes serait une finalité pharmacologique très importante. Ainsi, la détermination des composées majoritaires qui sont certes derrières ces effets pharmacologiques pourrait permettre le développement de nouveaux agents anti-parasitaires.

Article 5: Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities

Avant propos

Centaurium erythraea (Rafin) est une plante médicinale appartenant à la famille des Gentianaceae. Cette plante est très connue pour ses propriétés médicinales très variées. Dans la population d'Ouezzane, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle avec une valeur médicinale élevée et un niveau de fidélité important. Dans ce travail, nous avons réalisé une étude pharmacologique *in vitro* de quatre extraits organiques de cette plante (méthanolique, hexanique, éthanolique et d'acétate d'éthyle) sur trois systèmes biologiques à savoir l'activité antiradicalaire, antibactérienne et antileishmanienne. L'effet antioxydant est testé sur le radical DPPH. L'activité antibactérienne est testée contre quatre souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*) en utilisant la méthode diffusion en puits. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) sont déterminées par la méthode de micro-dilution. L'effet antileishmanien est évalué contre *Leishmania major*, *Leishmania tropica* et *Leishmania infantum* en utilisant le test MTT. Les extraits organiques ont montré de grandes capacités à neutraliser le radical DPPH, en particulier l'extrait hexanique qui a piégé 50% du radical DPPH à une concentration significativement importante ($IC_{50}=49.54\pm 2.43 \mu\text{g/mL}$), en comparaison avec l'acide ascorbique et le Trolox. Tous les extraits ont montré des effets antibactériens contre les souches bactériennes testées. Des remarquables valeurs d'inhibition (CMI et CMB) sont obtenues, en particulier l'extrait méthanolique qui a inhibé la croissance de *S. aureus* d'une manière quasi-totale à une faible concentration (CMI=0.25mg/mL). Par ailleurs, *P. aeruginosa* est inhibée par l'extrait hexanique à une concentration de CMI=0.5mg/mL). Concernant l'activité anti-parasitaire, l'extrait hexanique, méthanolique et éthanolique ont montré de remarquables effets leishmanicides contre les promastigotes, en particulier l'extrait hexanique qui a réduit respectivement la viabilité cellulaire de *L. tropica* et *L. major* à des concentrations d' $IC_{50}=37.2\pm 1.62 \mu\text{g/mL}$ et d' $IC_{50}=64.52\pm 2.2 \mu\text{g/mL}$. La caractérisation des principes actifs et l'évaluation de leurs effets biologiques pourraient mettre en évidence de nouveaux agents anti-infectieux.

Article 6: Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities

Avant propos

Dans le cadre de la valorisation des produits végétaux médicinaux de la province d'Ouezzane, nous avons choisi *Mentha pulegium* et *Rosmarinus officinalis*. Ces deux espèces sont fortement utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter de nombreuses maladies. La composition chimique et les propriétés pharmacologiques *in vitro* des HE de *M. pulegium* et *R. officinalis* collectées de la région d'Ouezzane. L'objectif de ce travail est de déterminer la composition chimique de deux HE et d'évaluer leur activité antioxydante, antibactérienne et antileishmanienne.

Les HE sont isolées par l'hydrodistillation et la composition chimique a été déterminée en utilisant une analyse GC-MS. L'activité antibactérienne est testée en utilisant la méthode de diffusion, la concentration minimale inhibitrice (MIC) et la concentration inhibitrice minimale (MBC) par dosage de microtitration. L'activité antioxydante est estimée par la capacité de balayage des radicaux libres DPPH et la puissance réductrice du fer. L'activité antileishmanienne est testée contre *Leishmania major*, *Leishmania tropica* et *Leishmania infantum* en utilisant un dosage de MTT (3- (4,5-diméthylthiazole-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium). Le rendement en HE de *M. pulegium* et *R. officinalis* est de 5.4 et 2.7% respectivement. L'analyse CG/SM de l'HE de *R. officinalis* a révélé la présence de 29 composants représentés principalement par des monoterpènes oxygénés (63.743%) et des monoterpènes d'hydrocarbures (21.231%). Alors que l'HE de *M. pulegium* a révélé 21 composants représentés principalement par des monoterpènes oxygénés (83.865%). Les principales composantes de l'HE de *R. officinalis* sont l' α -pinène (14.076%), le 1,8-Cineole (23.673%) et le camphre (18.743%). Cependant, le menthone (21.164%) et pulegone (40.98%) sont les principaux composants de l'HE de *M. pulegium*. Les deux HE ont montré une activité antioxydante significative par rapport à l'acide ascorbique et à le Trolox. Pour l'effet antibactérien, les diamètres d'inhibition les plus élevés sont montrés par l'HE de *M. pulegium* contre *Bacillus subtilis* (30 ± 1.43 mm) et *Proteus mirabilis* (28 ± 1.32 mm). Ces valeurs sont significativement importantes par rapport aux antibiotiques commercialisés. Les valeurs de CMI et CMB les plus faibles sont obtenues avec l'HE de *M. pulegium* contre *S. aureus* MBLA (CMI=CMB=0.25% (v/v). Alors que l'HE de *R. officinalis* a présenté un effet bactéricide contre *Listeria monocytogenes* (CMI=CMB=0.5% (v/v)), *Bacillus subtilis* (CMI=CMB=1% (v/v)) et *E. coli* (CMI=CMB= 1% (v / v)). Pour l'effet antileishmanien, l'HE de *R. officinalis* est la plus active contre *L. major* ($IC_{50}=1.2 \pm 0.36$ μ g / mL. Alors que l'HE de *M. pulegium* a montré la plus forte action leishmanicide contre *L. major* ($IC_{50}= 1.3 \pm 0.45$ μ g/mL).

Article 7: *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities

Avant propos

Le genre *Lavandula* contient plusieurs plantes médicinales qui produisent des HE. *Lavandula stoechas* (L.) est l'une des plantes médicinales largement répandues dans la médecine traditionnelle marocaine y compris dans la région d'Ouezzane. Dans ce travail, la composition chimique et les propriétés biologiques de l'HE de *L. stoechas* sont étudiées. L'HE a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil antiparasitaire. La composition chimique de l'HE de *L. stoechas* a été déterminée à l'aide de l'analyse GC-MS. L'activité antibactérienne a été testée contre les souches pathogènes en utilisant la méthode de diffusion, la concentration minimale inhibitrice (MIC) et la concentration bactéricide minimale (MBC) par la micro-dilution en microplaque. L'activité antioxydante est estimée par la méthode de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur du fer.. L'activité antiparasitaire est testée contre *Leishmania major*, *Leishmania tropica* et *Leishmania infantum* en utilisant le teste MTT (3- (4,5-diméthylthiazol-2yl) -2,5-diphényltétrazolium). Les principaux composants des HE de *L. stoechas* sont représentés par le fenchone (31.813%), le camphre (29.602%), le terpinéol (13.149%), le menthone (8.963%) et l'eucalyptol (5.880%). L'HE a révélé une importante capacité antioxydante. Cette HE a montré des effets antibactériens importants et plus particulièrement contre *L. monocytogenes* et *S. aureus* MBLA avec des diamètres d'inhibition de 23 ± 0.85 et 21 ± 0.25 mm, respectivement. Les valeurs de CMI et CMB les plus faibles sont obtenues contre *L. monocytogenes* (MIC=MBC=0.25% (v/v)). L'HE a montré aussi des effets anti-parasitaires remarquables contre les parasites testés. En effet, elle est leishmanicide contre *L. major* avec une valeur d'IC₅₀ de $0.9 \pm 0.45\%$ (v/v). Les résultats obtenus justifient, néanmoins en partie, le succès d'utilisation de cette plante dans la phytothérapie. Par ailleurs, l'HE de *L. stoechas* et leurs composés majeurs peuvent avoir des applications potentielles dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Article 8: Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth)

Avant propos

La famille de lamiaceae contient de nombreuses espèces médicinales répandues dans plusieurs genres. L'*Origanum* est l'un de ces genres représenté par 38 espèces; avec 6 sous-espèces et 18 hybrides. Les espèces d'*Origanum* sont utilisées à l'échelle mondiale dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies. *Origanum compactum* (Benth) est l'une des espèces d'*Origanum* endémiques marocaines. Au Nord-Ouest du Maroc, cette espèce est très utilisée dans la phytothérapie avec un niveau de fidélité maximal. Cependant, la pratique traditionnelle de cette plante se fait durant tous les stades phénologiques avec des taux de guérison différents, ce qui laisse penser à quel point les changements phénologiques (stades de développement) influencent la composition chimique de cette espèce aromatique, et à quel point, éventuellement, les changements de cette composition corréllent avec les activités biologiques.

Les objectifs de l'étude envisagée sont la détermination de la composition chimique des HE d'*O. comcatum* durant trois stades phénologiques (végétatif, floraison et post-floraison) et l'évaluation de leur l'activité antibactérienne, antioxydante et antileishmanienne. Le rendement en HE du stade végétatif, floraison et post-floraison sont respectivement (5.7%), (4.3%) et (2.9%). Les analyses CG/SM des HE ont révélé la présence de 37 composants représentés principalement par les monoterpènes oxygénés (49.4-62.975%) et les monoterpènes d'hydrocarbures (31.815-43.632%). Les fluctuations des principaux composants sont les suivantes: carvacrol (6.398-43.584%), thymol (10.331-38.014%), p-cymène (17.815-19.245%) et γ -terpinène (7.114-17.415%).

L'activité antioxydante est estimée par la capacité de balayage du radicaux DPPH et la méthode du pouvoir réducteur du fer. Les HE obtenues à partir du stade post-floraison ont montré la capacité antioxydante la plus élevée avec des valeurs d'IC₅₀ de 172.87 $\pm$ 5.38 μ g/mL et IC₅₀=53.28 $\pm$ 2.64 μ g/mL révélées respectivement par le DPPH et le pouvoir réducteur du fer.

L'activité antibactérienne est évaluée contre huit souches bactériennes en utilisant la méthode de diffusion en puits. La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB) sont déterminées par la méthode de micro-dilution. L'inhibition la plus élevée est obtenue contre *Proteus mirabilis* par l'HE du stade végétatif et de floraison avec des diamètres d'inhibition de 43 $\pm$ 2.12 et 47 $\pm$ 2.73 mm, respectivement. Les valeurs de CMI les plus faibles sont obtenues avec des HE du stade de floraison contre *S. aureus* MBLA

(CMI=CMB=0.0312% (v/v). La souche *S. aureus* s'est montré la plus sensible aux HE, alors que *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante.

L'activité antiparasitaire est testée contre *Leishmania major*, *Leishmania tropica* et *Leishmania infantum* en utilisant du MTT (3- (4,5-diméthylthiazol-2yl) -2,5- Bromure de diphényltétrazolium). Les trois HE ont montré des activités cytotoxiques remarquables contre les espèces testées de *Leishmania* par rapport au Glucantime. L'HE du stade floraison est la plus active contre les espèces de *Leishmania* avec les valeurs d'IC₅₀ de 0.13±0.05, 0.02±0.03 et 0.22±0.05 µg/mL contre *L. major*, *L. infantum* et *L. tropica*, respectivement.

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont permis de conclure à quel point le choix du stade phénologique d'*O. compactum* a un impact sur la variation de composition chimique et par conséquent sur les effets médicaux. Les résultats mis en évidence dans cette étude montrent que le stade de floraison est la période de récolte optimale d'*O. compactum* pour les applications médicales.

Article 9: Essential oils of *Origanum compactum* induce membrane permeability, disturb cell membrane and suppress quorum sensing phenotype in *Bacillus subtilis* 6633 and *Escherichia coli* K12.

Avant propos

Les HE ont montré de nombreuses actions antibactériennes sur plusieurs cibles. Dans cette étude, nous avons choisi les HE d'*O. compactum* pour l'évaluation des mécanismes d'action antibactériens contre une bactérie à gram négative (*Escherichia coli*) et une autre à bactérie gram positive (*Bacillus subtilis*). L'action antibactérienne est réalisée en étudiant l'effet sur la cinétique bactérienne, sur la perméabilité membranaire et le relargage des macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et les protéines. Les HE ont été également testées pour leur effet anti-quorum mesuré par l'inhibition de la formation de biofilms. Les courbes de cinétique bactérienne indiquent que les HE ont provoqué une diminution remarquable dans la viabilité cellulaire de *B. subtilis* et *E. coli*, et ceci a été d'une manière dose-dépendant. Le test de perméabilité a prouvé que les HE ont augmenté la perméabilité de la membrane, en particulier chez *E. coli*. Le relargage des protéines et des acides nucléiques (ADN et ARN) montre une perte de l'intégrité membranaire, ce qui indique la lyse cellulaire induite par l'augmentation de la perméabilité chez *E. coli*. Chez *B. subtilis*, l'action lytique démontrée par le relargage des macromolécules est un phénomène secondaire résultant de l'inhibition d'attachement des cellules entre elles (action anti-biofilm). Les résultats de cette étude ont montré que les HE d'*O. compactum* ont des activités antibactériennes potentielles contre *E. coli* et *B. subtilis*. Les mécanismes antibactériens sont liés aux dommages irréversibles de la paroi cellulaire et de la membrane, conduisant aux fuites des matériaux cytosoliques, indiquant ainsi une mort cellulaire. La dérégulation du quorum sensing inhibe la formation de biofilms et par conséquent diminue la viabilité cellulaire jusqu'à un seuil de maintenance minimale suivi d'une lyse cellulaire secondaire. D'autres investigations mécanistiques sont d'importance cruciale pour déterminer d'autres cibles d'action, et valider ainsi d'une manière scientifique et appropriée l'utilisation populaire de cette plantes médicinales.

Discussion des résultats

Chapitre 1: Phytothérapie dans la province d'Ouezzane

L'informant est un élément central des enquêtes ethnopharmacologiques. Par conséquent, une meilleure compréhension des informants peut donner naissance à une étude solide et fiable. La collecte des informations socio-démographiques (âge, sexe, niveau d'étude,) sur les participants est très utile dans les études ethnobotaniques, il joue un rôle important dans l'analyse et l'interprétation des résultats. Les résultats de notre étude ont montré que la phytothérapie a été toujours pratiquée par la population de la province d'Ouezzane. Les raisons de l'utilisation des plantes médicinales peuvent être attribuables au coût le plus bas de ces remèdes naturels par rapport à la médecine moderne. De plus, les informants ont déclaré que les plantes médicinales les plus répandues sont plus utilisées dans le passé qu'aujourd'hui. Cette observation est due aux différents facteurs qui influent sur la végétation spontanée tels que la dégradation, la déforestation et l'acculturation. D'autre part, la perte de certaines espèces est liée à la connaissance associée aux certaines personnes. Par exemple, quelques informants ont signalé qu'une espèce a été perdue en raison du problème de la déforestation dans cette région. Cette plante a été utilisée contre la fièvre. D'autres informants ont déclaré que cette connaissance traditionnelle n'est pas correctement transmise entre les générations parce que les guérisseurs veulent surtout garder leurs connaissances secrètes. En effet, certains informants se sont souvenus que certaines personnes ont conservé leurs connaissances secrètes et sont mortes sans donner des informations sur certaines plantes médicinales utilisées pour traiter les morsures de serpent.

Nous avons ainsi montré que les femmes sont plus intéressées à préparer les drogues pour elles-mêmes et leurs enfants. Alors que les hommes sont plutôt occupés à travailler hors de la maison pour offrir les besoins de la vie. Ces résultats montrent que ces connaissances traditionnelles ont été et seront transmises principalement par les femmes. Plusieurs hypothèses peuvent être impliquées dans l'interprétation de cette observation ; la fréquence relative de l'analphabétisme des femmes dans la société, l'attachement des femmes aux connaissances traditionnelles ([Tabuti et al., 2003](#)) et la possibilité que les femmes étaient le plus souvent à la maison pendant les heures de l'enquête ([Jouad et al., 2001](#)).

Nos résultats sont en accord avec d'autres études antérieures réalisées dans d'autres régions marocaines qui révèlent l'implication plus élevée des femmes par rapport aux hommes dans la médecine traditionnelle ([Tahraoui et al., 2007](#) ; [Eddouks et al., 2017](#) ; [Teixidor-Toneu et al., 2016](#)). Nous avons observé également que le savoir traditionnel est souvent lié au gens âgés. Dans une autre étude, [Ziyyat et al. \(1997\)](#) ont signalé que les personnes âgées sont plus exposées

à différentes maladies et que les jeunes générations sont plus exposées à la modernisation (Ouhaddou et al., 2014). Ce résultat reflète l'image du transfert des pratiques traditionnelles d'une génération à l'autre. Malheureusement, la transmission de ces connaissances est actuellement menacée car elle n'est pas toujours assurée (Anyinam et al., 1995).

Nous avons montré une remarquable diversité de plantes médicinales dans la région d'étude. Par ailleurs, la diversité des plantes médicinales marocaines est due aux variations de la topographie et du climat marocain. D'autre part, le climat méditerranéen du Nord-Ouest du Maroc explique cette diversité floristique (Tabuti et al., 2003). Au Maroc, le nombre d'espèces est d'environ 500 et un nombre significatif est commun ou endémique dans les régions marocaines du Nord.

Sur le plan pharmacognosique, nous avons trouvé que les feuilles sont les parties les plus utilisées dans la préparation des drogues. L'utilisation élevée des feuilles comme remèdes explique le fait que ces derniers sont le centre du métabolisme bio-organique (les feuilles sont au centre du phénomène photosynthétique) et le stockage des métabolites secondaires chez plusieurs espèces, en particulier les plantes aromatiques. Cela s'explique aussi par la rapidité et la facilité de la récolte des plantes médicinales (Ghorbani et al., 2005). Cependant, le choix des feuilles ne pourrait pas être fait d'une manière anarchique; il peut en fait être réalisé pour ne pas contribuer ainsi à la déforestation. Les feuilles sont utilisées car elles permettent la préservation de la plante. En effet, la collecte des racines peut tuer la plante et mettre en danger les espèces (Kadir et al., 2013). Nos résultats corroborent avec d'autres études antérieures menées au Maroc et dans des populations dans différentes régions du monde qui ont signalé l'utilisation des feuilles pour la préparation de drogues (Islam et al., 2014 ; Abbasi et al., 2013).

La population utilise différents modes pour préparer les drogues (la décoction, la perfusion, la macération, ...). Nos résultats sont en accord avec d'autres études réalisées dans les régions marocaines (Benlamdini et al., 2014 ; El yahyaoui et al., 2015). La plupart des méthodes de préparation des drogues utilisent de l'eau comme solvant diluant (Merzouki et al., 2000 ; Vitalini et al., 2013). Cependant, certaines drogues sont préparées en combinaison avec certains aliments tels que le lait, l'huile d'olive et le miel. Cette préparation est liée à la relation entre ces aliments, en particulier le miel et l'huile d'olive, avec la population du Nord-Ouest du Maroc. Par ailleurs, le miel et l'olive ont été utilisés eux-mêmes dans plusieurs cas comme remèdes contre plusieurs maladies.

Dans la zone d'étude, nous avons généralement observé des troubles courants, car la population vit sur la consommation des aliments de mauvaise qualité. D'autre part, les valeurs plus élevées pour les maladies respiratoires et digestives ont également été rapportées dans plusieurs études antérieures réalisées au Maroc (Ennabili et al., 2000 ; El Hafian et al., 2014) et dans d'autres

parties du monde (Teklehaymanot et al., 2009 ; Rokaya et al., 2010). Ainsi, les maladies liées au système digestif, au système respiratoire et au système nerveux ont été les plus traitées par les plantes médicinales dans le monde entier, car cette catégorie de maladies est connue depuis l'antiquité.

Chapitre 2 : Etude phytochimique

1. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes

Les plantes médicinales synthétisent des métabolites secondaires de structures chimiques diverses. Parmi les métabolites synthétisés, les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes, prennent une place importante. Ces composés sont une source inépuisable de nouvelles molécules fonctionnelles aussi bien pour le domaine agro-alimentaire que pharmacologique. En effet, les composés phénoliques ont démontré toujours d'énormes activités biologiques telles les effets antimicrobiens (Lahlou, 2013), anticancéreux (El Bairi et al., 2016), antioxydants (Bouyahya et al., 2017c), et antiparasitaires (Et-Touys et al., 2016a). Ces groupes de molécules ont montré d'autres activités pharmacologiques telles que l'inhibition d'adhérence mitochondriale, des effets antiulcéreux, anti-arthritique et anti-angiogenèse (Biju et al., 2014). En outre, certaines études ont établi le lien de corrélation entre la consommation de ces molécules et la prévention de certaines maladies telles que celles liées au stress oxydatif, l'inflammation chronique, les maladies liées au système immunitaire, le diabète et le cancer (Chalise et al., 2010).

Dans ce travail, les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de plantes étudiées, en particulier, *C. erythraea*, *C. crispus*, *O. compactum*, *M. communis* et *A. unedo*, sont estimées. Les plantes médicinales étudiées sont riches en extraits organiques et l'efficacité d'extraction de ces composés varie en fonction du solvant utilisé. Nous avons ainsi révélé que ces plantes présentent des teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes. Selon Tawaha et al., (2006), la quantité de flavonoïdes et de polyphénols est considérée comme très élevée si elle est supérieure à 20 mg de EAG/g d'extrait. Sur la base de cette étude, les plantes peuvent être considérées comme une source très importante de composés phénoliques ou non. En effet, tous nos extraits portent des concentrations importantes en polyphénols et en flavonoïdes, mais leur quantité est variable entre les plantes et le type d'extrait. Ceci montre la différence des activités métaboliques entre les espèces différentes. La variation entre les plantes est certainement due au pool génétique de chaque espèce, alors que l'entraînement différentiel des composés phénoliques au sein de la même plante par des solvants différents provient sans doute du degré de polarité qui caractérise chaque solvant (Zainal-Abidin et al., 2017). Par ailleurs, le choix du solvant d'extraction joue un rôle primordial dans la recherche phytochimique et le criblage pharmacologique (Lahlou, 2013). Dans notre travail, le méthanol s'est montré le solvant le plus

efficace utilisé pour extraire les composants phénoliques (Chalise et al., 2010). En fait, le méthanol est le solvant le plus utilisé pour l'extraction de substances phénoliques à partir de plantes médicinales. D'autres études antérieures portant sur *Teucrium orientale* ont également confirmé que le méthanol a permis d'entraîner plus les composés phénoliques parmi tous les solvants (Tawaha et al., 2007). De plus, la composition des substances phénoliques peut aussi être affectée au sein de la même plante médicinale collectée en deux régions géographiquement différentes (Demain et Fang, 2000).

2. Composition chimique des huiles essentielles

Les HE ont constitué dans les dernières années une piste de recherche importante pour le criblage des molécules bioactives aux propriétés fonctionnelles diverses dans le domaine pharmacologique, cosmétique et alimentaire (Burt, 2004 ; Bakkali et al., 2008). En effet, et depuis longtemps, les HE sont dotées des effets biologiques intéressants tels que les activités antioxydantes (Bouyahya et al., 2017c), antibactériennes (Bouyahya et al., 2017a), antitumorales (Bouyahya et al., 2016a), antiparasitaires (Essid et al., 2015) et antifongiques (Lagrouh et al., 2017). Certaines plantes médicinales de la région d'Ouezzane sont qualifiées aussi aromatiques ; car elles sont capables de synthétiser et de sécréter les HE. L'extraction et la caractérisation chimique des HE des plantes médicinales aromatiques étudiées ont été ainsi envisagées. La composition chimique a été déterminée uniquement pour les HE ayant démontré des intérêts pharmacologiques importants. Il s'agit des HE de *L. stoechas*, *M. pulegium*, *R. officinalis* et *O. compactum* ; quatre plantes appartenant à la famille des lamiaceae. En effet, ces plantes sont dotées des structures histologiques particulières telles que les poches sécrétrices qui leur confèrent la synthèse et la sécrétion des essences volatiles (Burt, 2004). Toutes les HE sont riches en composés volatils appartenant aux différentes familles biochimiques telles que les hydrocarbures monoterpéniques, les hydrocarbures sesquiterpéniques, les monoterpènes oxygénés et les sesquiterpènes oxygénés. La teneur et la composition des HE diffèrent d'une plante à une autre, ce qui confirme le phénotype endogène contrôlant la synthèse de ces composés (Aboukhalid et al., 2017a).

Les composés majeurs (chémotypes) peuvent varier de façon quasi-totale d'une HE à une autre. Par exemple, l'HE de *L. stoechas* possède le fenchone, le camphor, le terpinéol, le menthone et l'eucalyptol comme chémotypes majoritaires. L'HE de *M. pulegium* est riche en pulégone et en menthone. Alors que, le 1,8-cinéole, le camphor, le bornéol l' α -pinène sont les composés majeurs de l'HE de *R. officinalis*. Nos résultats ne corroborent pas toujours avec ceux trouvés dans d'autres régions chez les mêmes plantes (Cherrat et al., 2014; Carrasco et al., 2015 ; Ait Ouazzou et al., 2012). En effet, la composition des HE peut varier également au sein de la même plante collectée de différentes régions. C'est le cas par exemple de l'HE d'origan qui a montré des

fluctuations dans la composition chimique dans des endroits différents (Aboukhaled et al., 2017b). Dans notre étude, les composés majoritaires de l'HE d'origan sont le carvacrol, le thymol, le p-cymène et le γ -terpinène. Ces résultats sont en accord avec d'autres études antérieures qui ont démontrées la quasi-présence de ces quatre composés (Ouedrhiri et al., 2016 ; Aboukhaled et al., 2016 ; Sbayou et al., 2016 ; Bouhdid et al., 2008; El-Babili et al., 2011). Cependant, la composition chimique peut aussi être affectée par les stades phénologiques de la plante ; un axe de recherche sur lequel plusieurs études se focalisent aujourd'hui (Mkaddem et al., 2007).

Nous avons ainsi démontré, qu'effectivement, les stades phénologiques affectent de manière importante la composition chimique des HE d'*O. compactum*. Cette dernière a fluctué sa composition chimique et plus particulièrement les chémotypes majeurs, en fonction des stades phénologiques (végétative, floraison et post-floraison). En effet, au stade végétatif, le taux du carvacrol et du thymol sont respectivement 24.71 et 15.32%. Au stade de la floraison, le pourcentage du carvacrol augmente jusqu'à 43.584%, tandis que du thymol baisse à 10.33%. Cependant, le pourcentage de ces deux composés est inversé (38% de thymol et 6.4% de carvacrol) au stade post-floraison. Cette fluctuation peut s'expliquer par deux hypothèses ; la première est basée sur l'isomérisation du carvacrol en thymol qui dépend de la température élevée du stade post-floraison (Belkamel et al., 2013), alors que la deuxième est portée sur le fait qu'au stade post-floraison, les plantes recyclent les métabolites secondaires pour rester en état de maintenance minimale. Dans le cas d'origan, cette biodégradation semble être utile à partir du thymol que du carvacrol.

En général, la composition chimique des HE est affectée par le stade de développement, le climat mais aussi par les méthodes d'extraction (Aboukhalid et al., 2016, Belkamel et al., 2013). Les résultats obtenus avec l'HE d'origan montrent clairement que les plantes expriment les enzymes responsables de la synthèse des HE de manière phase-dépendant. Dans la réalité, cette synthèse est régulée par les plantes dans l'espace et dans le temps grâce aux fluctuations d'expression génique *via* les différents acteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et le remodelage de la chromatine afin de répondre à des fonctions physiologiques spécifiques (Vriet et al., 2015; Avramova, 2015). Ainsi, la variation de la composition chimique de l'HE d'une plante entre des régions différentes pourrait s'expliquer par l'influence de l'environnement externe sur la régulation des voies métaboliques secondaires chez ses plantes (Crisp et al., 2016).

Chapitre 3: Etude de l'activité antiproliférative

1. Fiabilité de l'approche utilisée

Le criblage de nouvelles molécules antitumorales est en premier lieu basé sur l'évaluation de leurs activités antiprolifératives sur des lignées cancéreuses en culture. Par ailleurs, les techniques d'évaluation de l'activité antiproliférative ou cytotoxique *in vitro* présentent un intérêt crucial dans le domaine de criblage vue leurs simplicité de mise en œuvre, leurs spécificité et leurs sensibilité ([Eisenbrand et al., 2002](#)).

Dans notre travail, l'activité antiproliférative a été évaluée en utilisant le test MTT. Ce test permet de mesurer la viabilité cellulaire révélée par le fonctionnement d'une enzyme appelée : déshydrogénase mitochondriale, qui transforme la molécule MTT en formazén ; produit qui absorbe les UV à 550nm. Le choix du test est lié à sa réputation élevée dans l'étude des activités cellulaires, en particulier les propriétés anticancéreuses. L'activité antiproliférative reflète la propriété d'un composé à retarder ou bloquer la prolifération des cellules en culture.

Dans un premier lieu, nous avons réalisé un screening de l'activité cytotoxique *in vitro*, des extraits organiques des plantes : *O. compactum*, *A. unedo*, *M. communis*, *C. crispus* et *C. erythraea*. Dans le deuxième lieu, nous avons testé également les HE de *M. pulegium*, *R. officinalis*, *L. stoechas* et *O. compactum*. Les produits sont testés contre trois lignées cellulaires cancéreuses : L20B, RD et Vero.

Le problème de solubilité des produits naturels souvent cause des limites d'utilisation dans certaines applications. Pour évaluer l'activité antiproliférative, les HE et les extraits sont préparés et solubilisés dans le DMSO (avec une concentration de DMSO qui ne dépasse pas 1%), cette concentration est recommandée par la littérature comme non toxique sur la viabilité cellulaire ([Essid et al., 2015](#)).

L'exposition des cellules cancéreuses aux différentes concentrations des produits testés a induit l'inhibition dans la viabilité cellulaires de manière dose-dépendante. Pour comparer les résultats obtenus en terme pharmacologique, le calcul d'IC₅₀ (concentration qui inhibe 50% de la viabilité cellulaire) est fortement recommandé ([Essid et al., 2015](#)). Par ailleurs, pour révéler le degré de sélectivité pharmacologique d'un produit anticancéreux, il est primordial de le tester sur des cellules normales. Nous avons ainsi évalué l'action antiproliférative de nos produits contre les cellules mononuclées du sang périphérique (CMSP), utilisées comme cellules normales.

2. Activité antiproliférative des extraits

Le cancer est une maladie complexe multi-étapes avec diverses étiologies. Le traitement est essentiellement basé sur la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements ciblent les cellules avec une division rapide et provoquent donc plusieurs effets secondaires sur les cellules

normales qui se caractérisent également par une division rapide (Mans et al., 2000). Aujourd'hui avec le déchiffrement moléculaire des voies impliquées dans la cancérisation, l'espoir des traitements est d'établir la thérapeutique ciblée du cancer en utilisant de nombreuses molécules provenant de différentes sources et qui peuvent cibler spécifiquement les cellules tumorales sans affecter les cellules normales. Ces dernières années, les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes extraits de plantes médicinales ont montré des remarquables spécificités dans l'inhibition des voies de prolifération de cellules cancéreuses (El Bairi et al., 2016 ; Bouyahya et al., 2016a).

Dans ce contexte, des extraits phénoliques de cinq plantes médicinales sélectionnées ont été criblés pour leurs activités antiprolifératives sur trois lignées cellulaires cancéreuses. Les extraits ont montré une cytotoxicité significative contre les cellules testées. Par exemple, l'extrait hexanique d'*O. compactum* a montré une cytotoxicité importante contre la lignée Vero. Tandis que, l'extrait hexanique de *C. crispus* possède des effets antiprolifératifs remarquables contre la lignée cellulaire L20B et RD. Les résultats indiquent que ces extraits ont des cibles spécifiques sur les cellules cancéreuses testées.

L'activité antiproliférative des extraits dépend de la plante, du type d'extrait et de la lignée cellulaire testée (Mans et al., 2000). Des études antérieures ont démontré l'activité anticancéreuse des extraits d'acétate d'éthyle d'*O. compactum* sur deux lignées cellulaires tumorales humaines ; A549 et SMMC-7721 (Chaouki et al., 2015). La cytotoxicité de cet extrait est due à l'induction de l'apoptose par l'activation des caspases médiées par la modulation des protéines de la famille Bcl-2. Dans un autre travail, Chaouki et al. (2010) ont montré des effets cytotoxiques d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait de chloroforme d'*O. compactum* contre la lignée cellulaire du cancer du sein humain MCF-7. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur *C. crispus* pour ses propriétés anticancéreuses. Les extraits d'*O. compactum* et de *C. crispus* possèdent des teneurs importantes de composés phénoliques tels que les flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont dotés d'effets anti-radicalaires, avec une grande capacité à éliminer les radicaux libres comme les espèces réactives d'oxygène (Hertzog et Tica, 2012 ; Han et Bakovic, 2015). De plus, les ROS sont depuis longtemps connus pour être impliqués dans la genèse de plusieurs maladies, y compris le cancer (Waris et Ahsan, 2006).

Le mécanisme anticancéreux des flavonoïdes est basé essentiellement sur leurs propriétés antioxydantes, l'inhibition des enzymes impliquées dans la formation des ROS et la prévention de l'oxydation des composés cellulaires et extracellulaires (Han et Bakovic, 2015). Cependant, nous n'avons pas trouvé la présence d'une corrélation positive entre l'activité anti-oxydante et celle cytotoxique des extraits végétaux. Cette observation suggère ainsi que l'extrait l'hexane d'*O. compactum* et de *C. crispus* ont d'autres cibles spécifiques sur les lignées de cellules RD et Vero.

En effet, les flavonoïdes sont dotés d'autres mécanismes cytotoxiques sur les lignées de cellules cancéreuses. Ils peuvent moduler les voies de la prolifération du cancer, arrêter le cycle cellulaire, induire l'apoptose et inhiber l'angiogenèse (Hertzog et Tica, 2012 ; El Bairi et al., 2016 ; Katyal et al., 2014).

3. Activité antiproliférative des huiles essentielles

Il ressort de cette étude que les HE de *M. pulegium*, *R. officinalis*, *L. stoechas* et *O. compactum* ont des effets antiprolifératifs contre les cellules cancéreuses. Cependant, certaines de ces HE ont aussi une cytotoxicité remarquable *vis-à-vis* des cellules normales. Nous avons remarqué que toute augmentation de la concentration des HE est accompagnée d'une diminution de la viabilité cellulaire montrant ainsi que les effets antiprolifératifs sont de nature dose-dépendant. Cependant, à des concentrations élevées, toutes les HE inhibent la croissance même des cellules normales.

Pour cribler les HE ayant une activité antiproliférative importante sans qu'elles soient cytotoxiques sur les cellules normales. L'indice de sélectivité qui relie l'effet cytotoxique d'un produit sur une cellule cancéreuse et une autre normale a été établi. Il ressort ainsi que l'HE de *L. stoechas* possède un effet cytotoxique important contre la ligne cellulaire RD (19.03 ± 28.05 $\mu\text{g/mL}$) et L20B (33.84 ± 1.72 $\mu\text{g/mL}$), alors que des fortes concentrations de ces HE sont nécessaires pour inhiber la croissance des cellules normales. De plus, l'HE de *M. pulegium* a également démontré un effet antiprolifératif significatif contre la lignée cellulaire RD et Vero avec des valeurs d' IC_{50} de 47.52 ± 2.73 et 60.21 ± 1.9 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Cette HE n'a pas également montré un effet antiprolifératif important *vis-à-vis* des cellules normales.

Les résultats de cette étude sont variables et dépendants de la lignée cellulaire et l'HE testée. D'autres études ont révélé les activités anticancéreuses des HE de *M. pulegium* et *R. officinalis* (Shirazi et al., 2004 ; Wang et al., 2012), tandis que l'HE de *L. stoechas* n'a pas encore testé pour ses propriétés anticancéreuses. Seul des extraits aqueux de *L. stoechas* ont révélé l'effet cytotoxique (Çelik et Aslantürk (2007).

L'effet antiprolifératif pourrait être attribué aux composés chimiques bioactifs présents dans les HE. Les mécanismes d'action anticancéreux des HE sont complexes et plusieurs voies ciblées ont été décrites (Bouyahya et al., 2016a). En effet, une HE peut activer l'apoptose *via* l'expression des protéines de famille des caspases, induire des modifications dans les voies de signalisation, arrêter le cycle cellulaire et modifier la méthylation d'ADN et l'acétylation des histones dans les lignées tumorales (Raut et Karuppayil, 2014).

Chapitre 4: Etude de l'activité antioxydante

1. Mécanismes réactionnels et modes d'action des antioxydants

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un produit et le suivi des processus d'oxydation peuvent être réalisés par deux approches principales ; la mesure du produit résultant du processus d'oxydation ou l'estimation du pouvoir de piégeage des radicaux libres de modèles réactionnels. La première méthode est plus ancienne et nécessite une connaissance préalable des composés issus de l'oxydation. Cette approche recherche des groupements fonctionnels organiques au sein des dérivés des constituants d'origine. Alors que la seconde méthode relie la quantité d'antioxydants utilisés à celle des radicaux piégés.

Généralement, les tests de l'activité antioxydante sont divisés en deux types principaux : Les premiers tests sont des réactions basées sur le transfert d'atome d'hydrogène (*Hydrogen Atom Transfer HAT*) alors que les seconds reflètent des réactions basées sur le transfert d'électron singulier (*Single Electron Transfert SET*) ([Hung et al., 2005](#)). Par ailleurs, l'étude du pouvoir de chélation des métaux est également une mesure applicable dans l'évaluation de l'activité antioxydante ([Rice-Evans et al., 1995](#)). Dans notre travail de recherche, nous avons utilisé le test de DPPH, d'ABTS et de FRAP. Les résultats obtenus ont montré que l'effet antioxydant des extraits et des HE ne dépend pas seulement de la composition chimique mais également du milieu dans lequel la réaction s'est déroulée. L'activité antioxydante des extraits et des HE mesurée est étroitement liée à la concentration utilisée jusqu'à un seuil de saturation. Cette propriété de dose à effet répond d'une manière corrélative au paradoxe polaire décrit par [Porter \(1993\)](#). Généralement, les antioxydants polaires exposent des propriétés antioxydantes moins importantes car ils restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides, alors que les antioxydants apolaires sont concentrés au sein de l'interface l'eau-lipide, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques ([Franke et Mayer, 2000](#)).

2. Fiabilité des méthodes utilisées pour estimer l'activité antioxydante

Les HE et les extraits organiques sont certes constitués de mélanges de molécules possédant des propriétés chimiques extrêmement différentes. Cette diversité chimique peut mener à une dispersion des résultats suivant la méthode utilisée pour l'estimation de l'activité antioxydante. Par conséquent, l'utilisation de plusieurs techniques pour cribler des effets antioxydants est très demandée ([Takebayashi et al., 2010](#)). Par ailleurs, plusieurs méthodes ont été mises au point pour l'évaluation des effets antioxydants ([Takebayashi et al., 2010](#)). Dans notre travail, l'activité antioxydante a été évaluée par trois méthodes : Le test de DPPH, le test de l'ABTS et le pouvoir réducteur du fer.

D'une façon générale, le processus d'oxydation est souvent déclenché par une attaque radicalaire. Par ailleurs, l'évaluation de l'activité de piégeage des radicaux libres reflète de manière simpliste le pouvoir d'un produit à prévenir l'oxydation. Pour déterminer la capacité du piégeage des radicaux libres, nous avons employé le test de DPPH et le test de l'ABTS. Le DPPH est un radical libre stable qui accepte un électron ou un radical hydrogène pour se convertir en une molécule stable. Le test de l'ABTS évalue également le pouvoir à donner des protons et/ou d'électrons. Alors que le pouvoir réducteur mesure l'habilité d'un produit à agir comme un donneur d'électron et donc à réagir avec les radicaux libres et les convertir en molécules stables terminant ainsi les réactions radicalaires en chaîne. La mesure du pouvoir réducteur est basée sur la transformation de Fe^{3+} en Fe^{2+} en présence des produits antioxydants.

Les résultats de piégeage des radicaux nous ont permis de sélectionner certains extraits organiques et HE fortement antioxydants telles que les extraits de *C. erythraea* et d'*A. unedo*, et les HE d'*O. compactum*. Les résultats de mesure du pouvoir réducteur viennent renforcer ceux des deux tests précédents. En effet les extraits organiques et les HE ayant exprimé des remarquables activités antioxydantes par un test l'ont également exprimé avec d'autres tests.

La corrélation quasi-étroite observée entre les résultats obtenus par les trois techniques employées montre de façon importante à quel point l'utilisation d'une méthode peut être suffisante pour révéler la présence ou l'absence d'une activité antioxydante dans un extrait naturel. Cependant, la différence obtenue entre les tests nous a permis d'avancer que l'usage de chaque test devrait répondre aux finalités précises. Les fluctuations dans les résultats obtenus par les méthodes utilisées peuvent être expliquées par les structures chimiques des molécules présentes dans les HE et les extraits organiques testés.

3. Corrélation entre la composition des huiles essentielles et l'activité antioxydante

Dans ce travail, les HE testées présentent généralement une grande variabilité quand à la nature et les proportions des composés chimiques qui les constituent. Cette différence dans la composition chimique explique, néanmoins en partie, les effets antioxydants obtenus. Les HE constituées majoritairement par des composés phénoliques ont montré des forts effets antioxydants. Nos résultats sont en consonance avec plusieurs travaux antérieurs qui ont montré ainsi le pouvoir antioxydant remarquable des terpènes phénoliques (Wansi et al., 2010). Les HE ayant une forte teneur en thymol et en carvacrol comme celles d'*O. compactum* ont montré une remarquable capacité antioxydante. En effet, plusieurs études ont démontré que ces deux composés possèdent de forts pouvoirs antioxydants dans des systèmes alimentaires et biologiques (Foti et Ingold, 2003). De plus, la présence d'autres composés majeurs tels que le γ -terpinène et p-cymène doit être prise en considération, puisque ces deux molécules ont montré également une grande capacité à piéger des radicaux libres y compris le radical DPPH (Foti et

Ingold, 2003). Par ailleurs, plusieurs études ont établi des corrélations quasi-étroites entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques des HE (Oke et al., 2009). D'autres études comme celle de Cavar et al. (2008), ont attribué l'activité de piégeage du radical DPPH de l'HE de *Satureja montana* à des fortes teneurs en carvacrol et thymol. En effet, les composés phénoliques des HE ont la capacité de neutraliser des radicaux libres par leur aptitude à donner un hydrogène, cette propriété est expliquée par la présence dans la structure chimique d'un composé phénolique d'un groupement hydroxyle.

4. Correlation entre les teneurs en polyphénols et flavonoïdes des extraits et l'activité antioxydante

Les substances naturelles extraites de plantes médicinales douées des propriétés antioxydantes présentent actuellement un intérêt socioéconomique remarquable qui peut être sans équivoque dans le domaine de la recherche biopharmacologique. Les plantes médicinales sont déjà utilisées traditionnellement comme des antioxydants. Par ailleurs, certains de ces plantes on fait déjà l'objet d'une commercialisation en tant que additifs ou des compléments nutritionnels (Schuler, 1990). Dans ce contexte, plusieurs travaux sont menés aujourd'hui sur les activités antioxydantes des extraits organiques de plusieurs plantes médicinales pour découvrir de nouveaux antioxydants (Stagos et al., 2012).

Etant donné la complexité chimique des extraits organiques, certaines études ont pu révéler que les propriétés antioxydantes extraits organiques de plantes médicinales sont dues principalement à composés phénoliques (Cook et Samman, 1996). En effet, dans ce sens qu'une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des composés phénoliques et plus particulièrement aux flavonoïdes dans ces dernières années. Aujourd'hui, beaucoup de travaux ont rapporté l'existence d'une corrélation quasi-étroite entre le contenu en polyphénol et l'activité antioxydante des extraits de plantes médicinales (Zainol et al., 2003 ; Tawaha et al., 2007 ; Stagos et al., 2012). Cependant, l'activité antioxydante d'une plante ne dépend pas seulement des composé phénoliques mais également d'autres composés chimiques (Dorman et al., 2003). En effet, les terpènes, comme nous avons démontré, possèdent également un pouvoir antioxydant important notamment dans l'inhibition de la peroxydation lipidique (Grassman et al., 2002) et le piégeage des radicaux libres (Elzaawly et al., 2007).

Dans notre travail, les effets antioxydants des extraits semblent être liés aux teneurs des polyphénols et flavonoïdes. Par exemple, les extraits de *C. erythraea* (très riche en phénols) ont montré un effet antioxydant étroitement lié aux teneurs en polyphénols et plus particulièrement aux flavonoïdes. Les extraits méthanoliques et hexanique, renfermant généralement des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes, ont également prouvé des capacités antioxydantes plus importantes que les extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle. Ce résultat montre l'importance des

solvants d'extraction dans la recherche des agents antioxydants. L'activité antioxydante des composés phénoliques tels que les polyphénols et les flavonoïdes est en grande partie due à leurs propriétés redox qui les agissent comme des agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène, des émetteurs d'oxygène singulet et aussi des potentiels chélateurs de métaux ([Leopoldini et al., 2004](#) ; [Soobratte et al., 2005](#)).

Chapitre 5 : Activité antileishmanienne

1. Activité antileishmanienne des huiles essentielles

Dans le cadre de recherche de nouveaux agents antileishmaniens, les HE de *M. pulegium*, *R. officinalis*, *L. stoechas* et *O. compactum* ont été évaluées contre *L. major*, *L. tropica* et *L. infantum*. L'HE d'origan testée à trois stades phénologiques a montré des remarquables effets antileishmaniens, en particulier l'HE de stade floraison riche en carvacrol, ceci suggère le pouvoir leishmanicide du carvacrol. En effet, [Essid et al. \(2013\)](#) ont montré que ce composé possède des propriétés cytotoxiques contre les leishmanies, même sur les formes amastigotes. Les composés majoritaires présents dans les HE d'*O. compactum* sont certes responsables de l'action leishmanicide. En effet, certains composés phénoliques tels que le carvacrol et le p-cymène ont démontré un effet antileishmanien à de faibles concentrations contre *L. major* et *L. infantum* ([Essid et al., 2013](#)). Les HE de *L. stoechas*, *M. pulegium* et *R. officinalis* ont également démontré des effets leishmanicides avec des degrés d'inhibition variables. L'HE de *R. officinalis* est très leishmanicide contre *L. infantum* alors que l'HE de *L. stoechas* et *M. pulegium* ont montré des effets leishmanicides contre *L. major*.

L'action antileishmanienne ne dépend pas seulement des composants des HE mais également de la nature du parasite testé. En effet, *L. tropica* et *L. infantum* ont montré une résistance *vis-à-vis* de l'HE de *L. stoechas*. Tandis que les trois souches sont sensibles *vis-à-vis* des HE d'*O. compactum*, de *M. pulegium* et de *R. officinalis*. En effet, la sensibilité de chaque souche parasite dépend de sa capacité à tolérer l'action des composés des HE ([Raut et Karuppayil, 2014](#)). Plusieurs travaux antérieurs ont révélé les effets antileishmaniens des HE ([Essid et al., 2013](#) ; [Raut et Karuppayil, 2014](#)). L'activité antileishmanienne des HE est certainement attribuée à la présence de molécules bioactives qui peuvent inhiber la croissance de ces parasites par de nombreux mécanismes d'action. Le spectre d'action des HE contre la *Leishmania* est très complexe et peut aller de la destruction morphologique à des niveaux de régulation. Ces modes d'action antileishmaniens incluent l'induction de l'apoptose, la diminution du niveau d'énergie en perturbant la chaîne du transport des électrons et l'inhibition de la topoisomérase d'ADN (l'enzyme clé dans le compactage de l'ADN) ([Castro et al., 1992](#)).

2. Activité antileishmanienne des extraits

Les composants phénoliques tels que les polyphénols et les flavonoïdes extraits de plantes médicinales sont considérés comme une source importante dans la découverte de médicaments (Mans et al., 2000). Ces composés possèdent, en effet, de nombreuses activités biologiques, y compris des effets antileishmaniens (Et-Touys et al., 2016b ; Soosaraei et al., 2017). Le test MTT est une méthode colorimétrique très utilisée pour évaluer les effets cytotoxiques des composés naturels et synthétiques (Soosaraei et al., 2017). Dans notre travail, nous avons testé les effets des extraits organiques de cinq plantes contre la croissance de trois formes promastigotes de *Leishmania* (*L. major*, *L. tropica* et *L. infantum*).

Les extraits ont montré des effets cytotoxiques significatifs avec une variabilité entre les plantes testées, les types d'extrait et la souche parasitaire. Par ailleurs, les effets antileishmaniens ne sont pas corrélés avec les teneurs phénoliques des extraits. Par exemple, les extraits de *C. crispus* qui ont montré une activité antileishmanienne importante ne possèdent pas de fortes charges en polyphénols et flavonoïdes. Ceci suggère l'implication d'autres composés dans l'activité antileishmanienne tels que les composés terpéniques qui ont été largement démontré comme agents antiparasitaires (Raut et Karuppayil, 2014). Compte tenu de la complexité des molécules présentes dans les extraits végétaux, il n'est pas facile d'établir des corrélations étroites entre ces composés et l'activité biologique. Cela ne généralise plus l'absence d'une corrélation positive entre les phénols et l'action antileishmanienne, car certaines études ont montré l'existence de cette corrélation. En effet, les extraits de *Salvia verbecana* ont été testés sur les souches (*L. major*, *L. tropica* et *L. infantum*) et ont montré que l'activité antileishmanienne est corrélée avec les composants phénoliques (Et-Touys et al., 2016b). L'action peut être due à un composé major via un mécanisme d'inhibition spécifique, elle peut être attribuée aussi aux effets synergiques entre plusieurs composés majeurs exerçant chacun son propre mécanisme. Les composés mineurs peuvent aussi avoir un effet antileishmanien additif tout en potentialisant l'action d'un principe actif majeur (Lahlou, 2013 ; Soosaraei et al., 2017).

Chapitre 6 : Etude de l'activité antibactérienne

1. Fiabilité des méthodes utilisées pour d'évaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des HE et des extraits organiques de plantes étudiées a été évaluée contre des bactéries à Gram+ et à Gram-. Il existe plusieurs méthodes pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des produits naturels (Holley et Patel, 2005). Dans notre travail de recherche, le criblage des effets antibactériens a été tout d'abord réalisé en utilisant la technique de diffusion en puits. Les résultats s'expriment en termes des halos d'inhibitions autour des

puits et ils montrent des diamètres d'inhibitions variables selon la bactérie traitée et le produit ainsi testé.

La méthode de diffusion en puits est une technique simple et reproductible qui permet le criblage, de façon rapide, des produits naturels aux propriétés antibactériennes. Cependant, ce test est un screening préliminaire pour accéder aux autres approfondies. En effet, il a été montré, par des travaux antérieurs, que les produits naturels donnant des zones d'inhibition remarquables ne sont pas toujours, forcément, les bioactifs. Ce paradoxe est dû aux plusieurs facteurs qui peuvent influencer la diffusion des produits testés dans le milieu et leur effet contre les bactéries (Balouiri et al., 2016., Bouhdid et al., 2008).

Par ailleurs, d'autres méthodes complémentaires sont nécessaires pour quantifier l'action antibactérienne des produits testés. Ainsi, nous avons choisi les produits ayant montré des zones d'inhibition importantes pour révéler leur action inhibitrice par la détermination de la CMI en utilisant la méthode de micro-dilution sur microplaque. La CMI ; dose importante dans les applications pharmaceutiques et alimentaires ; est déterminée dans le milieu liquide afin d'assurer un contact direct entre le produit testé et la souche traitée.

Les auteurs ont fait recours souvent à l'usage d'émulsifiants comme l'éthanol, le DMSO et le Tween 80 pour solubiliser les produits à tester dans la détermination de CMI dans le milieu liquide. Cependant, ces émulsifiants semblent affecter l'activité (Burt, 2004). Pour résoudre ce problème nous avons utilisé l'agar 0.15% pour stabiliser l'émulsion huile-eau ou extrait-eau comme il a été recommandé par Remmal et al. (1993) et Bouhdid et al. (2008). Pour visualiser la croissance des bactéries dans la microplaque, nous avons opté pour l'emploi de la rézasurine comme indicateur redox (Mann et Markhan, 1998).

Les résultats obtenus ont montré que les HE ayant exprimé des effets antibactériens par le test diffusion sont également actives par la méthode de micro-dilution, alors que certains extraits organiques qui ont produit des zones d'inhibition ne montrent pas des effets inhibiteurs importants par la méthode de micro-dilution. La détermination de la CMI permet d'accéder aux résultats d'inhibition, mais ils ne donnent pas des indications définitives sur la nature de l'action bactérienne (bactériostatique ou bactéricide). Ces résultats, par conséquent devraient être confirmés par la méthode de CMB. Cette méthode permet de déterminer la concentration d'un produit qui engendre une action bactéricide. Cependant, cette technique semble être limitée car l'action bactériostatique d'un produit n'est pas toujours comparable entre la CMI et la CMB (Bouhdid et al., 2008). Paradoxalement, nous avons remarqué que, dans certains cas, les HE n'ayant pas montré des halos d'inhibitions importantes contre *P. auruginosa* ont inhibé cette souche aux valeurs de CMI très faibles. Par conséquent, la confirmation des résultats obtenus

avec la technique de diffusion en puits par des méthodes quantitatives à savoir la détermination de la CMI et la CMB semble être essentielle.

2. Corrélation entre la composition des huiles essentielles et l'activité antibactérienne

Les HE étudiées dans ce travail ont fait l'objet d'une grande différence en termes de la composition chimique. Une préliminaire interprétation de ces résultats permet d'avancer que les HE qui sont très riches en composés phénoliques expriment une puissante activité antibactérienne. Ces résultats remarquables corroborent avec ceux des études antérieures qui ont, en effet, montré le fort pouvoir antibactérien de ces composés ([Dorman et Deans, 2000](#)). Parmi les HE, celles qui contiennent le carvacrol et/ou le thymol comme composants majoritaires sont beaucoup plus actives que les autres. C'est le cas par exemple de l'HE *compactum* qui très riche par ces deux composés phénoliques. En effet, Le thymol et le carvacrol sont deux phénols monotérpéniques très connus par leur forte action antibactérienne contre une gamme de micro-organismes pathogènes ([Burt, 2004](#)). Ils sont actifs aussi bien contre les bactéries à Gram+ telles que *S. aureus* et *L. monocytogenese* que celles à Gram- telles que *E. coli* et *P. aeruginosa* ([Marchese et al., 2010](#) ; [Bahatti et al., 2014](#)). De plus, [Nastro et al., \(2004\)](#) ont montré que le carvacrol et le thymol se sont révélés efficaces même contre des souches de *S. aureus* multirésistantes à la méthiciline.

3. Corrélation entre teneurs en polyphénols et flavonoïdes et l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits organique a montré que les extraits méthanoliques et hexaniques sont plus actifs, alors que les extraits éthanoliques et d'acétate d'éthyle sont dotés d'une action inhibitrice la plus ou moins faible. En se basant sur le criblage phytochimique des extraits, on a trouvé que les extraits méthanoliques et hexaniques sont les plus riches en composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes). Ces résultats suggèrent que le méthanol et l'hexane sont des solvants qui font solubiliser le maximum des composés chimiques et que les principes actifs seraient plus solubles dans le méthanol et l'hexane que dans les autres solvants utilisés.

En effet, l'extraction des composés bioactifs dépend non seulement du temps et de la température d'extraction, mais notamment du solvant d'extraction ([Turkmen et al., 2006](#)). Par ailleurs, les extraits méthanoliques et hexaniques sont une source importante de polyphénols et plus particulièrement des flavonoïdes. Cependant, nous n'avons pas pu établir statistiquement une corrélation linéaire entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antibactérienne. En effet, l'activité antibactérienne n'est pas strictement liée aux composés phénoliques, car d'autres composés tels que les terpénoïdes, ont également des propriétés antibactériennes. Cependant, certaines études ont pu révéler un lien de causalité étroitement

dépendant entre la concentration des polyphénols et les effets antibactériens (Stagos et al., 2012), ce qui suggère finalement une variabilité des résultats qui se dispersent selon la plante étudiée, le type d'extrait testé, la bactérie traitée et la méthode utilisée. L'activité antibactérienne des polyphénols et en flavonoïdes pourrait être liée au degré d'oxydation de ces composés. Les mécanismes d'action antibactériens des polyphénols ne sont pas bien étudiés. Néanmoins, certains travaux ont suggère que le mécanisme de toxicité des polyphénols *vis-à-vis* des bactéries pourrait être lié soit au piégeage des ions métalliques tels que le fer soit à des interactions non spécifiques telles que la formation des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires et les enzymes (Cowan, 1999). Par ailleurs, l'activité antibactérienne des polyphénols semble être influencée par un autre facteur ; les poids moléculaires des polyphénols. En effet, les polymères sont trop grands et ils sont ainsi capables de traverser la membrane bactérienne, tandis que les monomères sont trop petits pour établir beaucoup de ponts d'hydrogènes (Field et Lettinga, 1992).

4. Sensibilité des bactéries à Gram positives et à Gram négatives

Les résultats de l'activité antibactérienne des HE et des extraits étudiés ont montré qu'ils sont actifs aussi contre les bactéries à Gram+ que celles à Gram-. En effet, les HE d'*O. compactum* sont très actives, même contre *P. aeruginosa*, souche pathogène opportuniste qui est connue par sa forte résistance aux antibactériens conventionnels. Cependant, les bactéries à Gram+ sont généralement plus sensibles agents antibactériens. Ces résultats sont en consonance avec ceux démontrés par les travaux antérieures (Bouhdid et al., 2008 ; Ouedrhiri et al., 2016). La résistance des bactéries à Gram- peut être attribuée à la complexité de leur enveloppe cellulaire qui possède une membrane externe qui prévient le passage des composés antibactériens empêchant ainsi d'accéder à la membrane plasmique. Les mécanismes d'empêchement sont liés au caractère hautement hydrophile des lipopolysaccharides qui ne laisse passer que des petits solutés hydrophiles à travers les porines (Calsamiglia et al., 2007). Par ailleurs, l'espace périplasmique contient des enzymes qui peuvent décomposer des molécules étrangères introduites de l'extérieur (Laciar et al., 2009).

5. Effets bactéricide et bactériostatique

La détermination des CMI ne permet pas de révéler la nature d'action en fonction de la concentration. En effet, l'effet bactériostatique n'est pas forcément un effet bactéricide. Par ailleurs, la valeur de CMB est d'une grande importance dans le domaine des infections. Cette valeur permet de révéler la concentration d'un produit à laquelle la bactérie est totalement détruite (effet bactéricide). En effet, bien qu'on voit souvent que les infections bactériennes répondent aussi bien aux agents bactériostatiques qu'aux agents bactéricides, en théorie un effet bactériostatique devrait produire une élimination plus rapide de la bactérie, une réduction de la

probabilité de l'apparition de la résistance et de la progression de l'infection et de meilleurs résultats cliniques. Cependant, les effets bactéricides sont plus recommandés dans le domaine de la thérapie infectieuse car ils assurent de manière irréfutable la lyse totale des bactéries (Lahlou, 2013).

Chapitre 7 : Action antibactérienne des huiles essentielles d'*O. compactum*

1. Choix des huiles essentielles

Pour évaluer l'action des HE contre les bactéries, nous avons choisi l'HE d'*O. compactum* (l'HE exprimant la meilleure activité antibactérienne). Cette HE a été choisie aussi car elle contient des composés phénoliques majeurs tels que le thymol et le carvacrol. Nous avons choisi deux souches bactériennes ; *E. coli* (gram négative) et *B. subtilis* (Gram positive) ; qui ont une montré une sensibilité remarquable *vis-à-vis* des HE d'*O. compactum*.

2. Choix des méthodes utilisées

Les modes d'action exacts de l'activité antibactérienne des HE et des extraits sont encore peu étudiés et mal connus. Les recherches ayant abordé les mécanismes d'action antibactériens des HE ont généralement rapporté qu'elles affectent la structure et la physiologie de la membrane cellulaire. Il n'est pas quasiment possible de proposer un mode d'action unique et généralisé pour toutes les HE sur les bactéries car chaque HE possède des mécanismes différents et chaque bactérie a une sensibilité particulière.

Les bactéries ont généralement une période de croissance assez particulière caractérisée par une phase importante : phase exponentielle. Le temps nécessaire pour atteindre cette phase dépend du micro-organisme et du milieu de culture (Rowe et al., 2016; Swinnen et al., 2004). Pour révéler la capacité des HE à baisser le taux croissance au niveau exponentiel, nous avons étudié leur action en fonction du temps afin de mettre en évidence le taux de réduction de croissance.

Par ailleurs, la membrane plasmique est une barrière de perméabilité sélective qui organise les échanges entre le milieu intra et extracellulaire tout en procurant un environnement intracellulaire convenable aux différents processus vitaux. Par conséquent, la perte de ce caractère est souvent identifiée comme un indicateur de mortalité cellulaire (Simones et al., 2015). Plusieurs techniques sont utilisées dans le but d'évaluer la perméabilité membranaire (Bouhdid et al., 2009). Dans notre étude nous avons opté à l'utilisation de la méthode de β -D-galactose glucoside (ONPG). L'intégrité de la membrane plasmique constitue également une indication de l'endommagement de la membrane plasmique. Cette intégrité peut être évaluée par la mesure du relargage des matériaux génétiques (ADN et l'ARN) et des protéines.

Outre l'activité sur la membrane plasmique, les HE peuvent affecter des niveaux de régulation plus élevés. En effet, les bactéries coordonnent leur pathogénécité par la communication entre elles grâce à un système de communication appelé : quorum sensing (Bouyahya et al., 2017b). Ce système déclenche certains phénotypes spécifiques tels que la formation de biofilms (Bouyahya et al., 2017b). Nous avons ainsi étudié l'action des HE contre le QS par l'inhibition de la formation de biofilms en utilisant le cristal violet comme substrat de révélation.

3. Action des huiles essentielles d'*Origanum compactum*

3.1. Action sur la cinétique de croissance

L'étude de l'inhibition bactérienne à travers la cinétique de croissance est une indication très utile pour révéler le niveau d'action antibactérienne du produit testé. Ceci donne des suggestions importantes sur la récalcitrance bactérienne *vis-à-vis* d'un produit en fonction de sa phase de croissance. En effet, l'action des agents antibactériens devrait en principe être évaluée sur la phase de croissance exponentielle ; la phase pour laquelle les bactéries ont un taux de croissance maximum, ce qui révèle ainsi l'état de vie *in vivo* de la bactérie dans les conditions de pathologie. Dans notre travail, les HE ont montré des effets importants sur la cinétique de la croissance bactérienne de *B. subtilis* et *E. coli*. En effet, à des concentrations sub-inhibitrices (2×CMI), l'HE d'*O. compactum* a inhibé la croissance totale (action bactéricide) de *B. subtilis* et *E. coli*, ceci confirme les résultats montrant les effets bactéricides aux valeurs de CMI. Cette action a été enregistrée même dans la phase exponentielle ce qui démontre ainsi le fort pouvoir bactéricide des HE testées. La diminution de la viabilité cellulaire des souches testées indique un blocage de croissance accompagné d'une lyse cellulaire. D'autres travaux ont révélé une inhibition importante de la cinétique de croissance de *P. aeruginosa* et *S. aureus* par l'HE d'*O. compactum* (Bouhdid et al., 2009).

3.2. Action sur la perméabilité et l'intégrité membranaire

Les HE ont augmenté la perméabilité membranaire de deux souches. De plus, la perte de perméabilité est remarquablement obtenue avec l'HE du stade floraison (riche et carvacrol) et végétatif (riche en carvacrol et thymol) qu'avec l'HE de stade post-floraison (très riche en thymol). Ceci montre la capacité du carvacrol à traverser la membrane cellulaire ; la propriété qui a été longtemps suggérée par plusieurs travaux (Nostro et al., 2004).

L'intégrité membranaire est mesurée par le relargage des matériaux génétiques (ADN et ARN) et des protéines. Chez les deux souches testées, on a détecté la présence des acides nucléiques et protéines relargées ce qui indique une perte de l'intégrité membranaire justifiée par une action lytique (bactéricide) des HE menant ainsi à l'éclatement des bactéries. L'HE de stade végétatif et de floraison on provoqué une perte d'intégrité plus importante chez *E. coli*, tandis que l'huile de

stade post-floraison est montrée plus bactéricide contre *B. subtilis*. Ceci est certes dépend étroitement des principes actifs majeurs présents dans chaque HE. Dans un travail antérieur, [Xu et al. \(2008\)](#) ont montré que le carvacrol a induit une action bactéricide contre *E. coli*. Le mécanisme associé à cette action a été liée à perturbation du potentiel de la membrane suite à une perte de sa perméabilité.

3.3. Activité antiquorum sensing

L'attachement des bactéries entre elles et avec les surfaces avoisinantes nécessite la formation des biofilms. Le biofilm donc est un réseau associatif d'une communauté bactérienne dont son expression et son fonctionnement est régit par le quorum sensing ; l'ensemble des molécules que les bactéries secrètent dans le milieu extra et/ou intracellulaire pour interagir entre elles et avec le milieu environnant ([Taganna et al., 2011](#); [Szabo et al., 2010](#)). Pour révéler l'action des HE contre le quorum sensing, nous avons testé leur capacité à inhiber la formation de biofilms. Les HE ont inhibé l'attachement des cellules de *B. subtilis* de manière plus importante que celles d'*E. coli*. De plus, l'HE de stade post-floraison (riche en thymol) a montré une action anti-biofilm très importante, en particulier son taux d'inhibition quasi-totale contre *B. subtilis* avec des concentrations sub-inhibitrices. Ce résultat pourrait s'expliquer par la forte teneur en thymol qui a été montré très efficace comme agents anti-quorum sensing avec ses divers modes d'action y compris l'inhibition de biofilms ([Bouyahya et al., 2017b](#)).

4. Action antibactérienne contre *E. coli* et *B. subtilis*

Chez les cellules d'*E. coli*, l'inhibition complète de la croissance bactérienne par les trois HE est accompagnée d'une perte significative de la perméabilité et l'intégrité membranaire. La corrélation entre la perte de la perméabilité membranaire et la diminution de la viabilité cellulaire montre que les HE d'*O. compactum* ont des effets bactéricides contre *E. coli* en perturbant la membrane plasmique menant à une perte des constituants cytosoliques indiquée par le relargage important des matériaux génétiques et des protéines. En effet, le traitement des cellules d'*E. coli* avec les trois HE provoque en premier lieu une perte de la perméabilité membranaire et de l'aptitude des cellules à se multiplier. La lyse cellulaire (bactéricidie) vient en deuxième lieu comme indiqué par la perte d'intégrité membranaire. Les travaux antérieurs ont longtemps suggéré la perte de perméabilité cellulaire comme un événement déclenchant qui amène finalement à lyse cellulaire ([Zhang et al., 2016](#)).

Quand aux cellules de *B. subtilis*, elles ont été également exposées aux trois HE à la 2×CMI, CMI et CMI/2. Contrairement à *E. coli*, la perméabilité membranaire induite par les HE de stade végétatif et de floraison n'est pas accompagnée par une perte d'intégrité membranaire qu'après 8h d'incubation, tandis que l'HE de stade post-floraison a perturbé de façon quasi-complète

l'intégrité de la membrane cellulaire. Ceci suggère l'existence d'un autre mécanisme de bactéricidie lié à cette action lytique démontré par la diminution de viabilité et le relargage des macromolécules. Par ailleurs, l'action anti-QS mesurée par l'inhibition d'attachement démontre l'énorme capacité de l'HE de stade post-floraison à inhiber la formation de biofilms chez *B. subtilis*.

La non perte de la perméabilité membranaire dans les premières heures d'incubation, la maintenance de la viabilité cellulaire dans un état quasi-stationnaire dans les premières heures d'incubation avec l'inhibition du quorum sensing chez *B. subtilis*, indique la présence des cellules ayant maintenues l'intégrité de la membrane mais ayant perdu la capacité à former des colonies à cause d'absence de communication entre elles (action anti-quorum sensing). Cet état est qualifié dans la littérature d'état Viable Non Cultivable (VNC). Il a été suggéré que cet état puisse être une stratégie de survie adoptée (maintenance minimale) par beaucoup de bactéries exposées aux conditions de stress ([Rowan et al., 2004](#)).

La mesure de l'intégrité membranaire après 24h d'incubation a montré que les cellules perdent leur intégrité en relargant les macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et les protéines. Les cellules bactériennes de *B. subtilis* ont donc subi une lyse cellulaire après un état de maintenance minimale dont le quel elles n'ont pas pu arriver à se diviser et restent isolées à cause d'une répression de leur capacité à se communiquer entre elles. Ce résultat est confirmé par la diminution accrue de la viabilité cellules dans les dernières heures d'incubation. En effet, l'état VNC a été démontré par certains auteurs comme étant un état physiologique transitoire avant la mort cellulaire ([Coutard et al., 2007](#)).

Discussion générale

La sélection des plantes médicinales passe par une investigation des bio-activités d'un grand nombre de plantes afin de sélectionner celles les plus actives. Il existe plusieurs approches pour le criblage des molécules bioactives. En effet, [Guirado et Cuéllar \(2008\)](#) se sont référés à la génomique, la métabolomique, l'écologie, la taxonomie, la botanique et les études basées sur l'épidémiologie. Alors qu'[Albuquerque et Hanazaki \(2006\)](#), s'appuient sur d'autres voies pour étudier les plantes médicinales telles que les approches de la randomisation, de l'écologie, de la chemotaxonomie (phylogénétique), de l'ethno-direction (ethno-orientation) et finalement l'exploration des résultats des différents tests biologiques.

Dans notre étude, nous avons suivi deux approches complémentaires ; l'approche écologique et l'approche ethnomédecine. L'approche écologique est connue par le champ d'observation, basée sur des observations des interactions entre les organismes et leurs environnements écologiques conduisant à des activités biologiques potentielles ([Guirado et Cuéllar, 2008](#)). Cette approche cherche des métabolites secondaires et leurs activités biologiques associées. Ces métabolites présents dans les plantes ont des fonctions écologiques qui pourraient justifier leur utilisation pour l'application et le développement des ressources thérapeutiques humaines. Par exemple, les métabolites impliqués dans la défense des plantes contre des microbes pathogènes peuvent être utilisés comme drogues antimicrobiens chez l'homme. Par ailleurs, l'observation de ces relations écologiques étroites est très utile dans la sélection des espèces de plantes à étudier. Dans la région d'Ouezzane, le climat méditerranéen offre une diversité métabolique extrêmement variable ce qui favorise par conséquent une diversité des métabolites produits par les plantes médicinales. En effet, les gènes qui codent pour les métabolites secondaires sont hautement régulés par des fluctuations environnementales et des différents types de stress. La fluctuation des métabolites chez les plantes est liée aux liens de causalités qu'existent entre les éléments de régulation de ceux-ci et leur transition d'état en fonction des facteurs externes. Ce sont des marqueurs génétiques dont leur expression régule en amont ou en aval l'expression de différents enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires. Les raisons pour lesquelles ces gènes sont soumis à ce type de régulation reviennent en fait aux échanges cumulatifs progressifs (dans le temps et dans l'espace) d'éléments de régulation tels que les transposons, qui sont souvent liés à des changements externes ([Aboukhalid et al., 2017](#)).

D'un autre côté, la deuxième approche utilisée est celle de screening ethnoguidé. Elle permet la sélection des plantes médicinales en s'accordant avec l'utilisation traditionnelle dans un contexte populaire. La base de cette sélection est liée à des connaissances historico-culturelles qui sont transmises entre les générations *via* le savoir ancestral. Il est très évident que le savoir traditionnel des plantes médicinales indique la présence des substances biologiquement actives.

Par ailleurs, la collection des plantes traditionnellement utilisées pourrait constituer un grand avantage augmentant ainsi la chance de découvrir de nouvelles drogues (Elizabetsky et Shanley, 1994). Plusieurs études ont comparé l'approche aléatoire avec l'approche ethnoguidée (Khafagi et Dewed, 2000 ; Guirado et Cuellar, 2008). Ces études ont montré d'une manière assez étonnante le rôle que pourrait jouer le criblage par l'ethno-médecine dans le développement des nouvelles molécules ayant des applications thérapeutiques contre les différentes maladies.

Dans notre travail, nous avons utilisé l'approche écologique et ethnopharmacologique pour sélectionner, cribler, évaluer et décortiquer de nouvelles molécules ayant d'énormes propriétés pharmacologiques. Le choix de l'approche écologique est fait sur une région géographiquement distinguée, écologiquement variée et floristiquement diversifiée ; la province d'Ouezzane (Nord-Ouest du Maroc). Cette région a été longtemps, et encore une fois aujourd'hui, vit avec des niveaux de vie très bas, en particulier les services de santé. Pour se défendre contre les différentes complications, la population utilise des drogues à base de plantes médicinales.

Dans un premier lieu, nous avons collecté les informations concernant l'utilisation des plantes dans la région d'étude, ainsi les liens qui relient les plantes avec l'homme ont été bien établis grâce à l'utilisation de certains paramètres ethnopharmacologiques tels que l'indice de citation et l'indice de fidélité. Ceux-ci nous ont permis de sélectionner, parmi 44 plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, quelques plantes pour le screening phytochimique et l'évaluation des propriétés pharmacologiques.

Le savoir traditionnel de plantes médicinales dans la province d'Ouezzane a révélé une panoplie des méthodes d'utilisation et des voies d'administration qui sont souvent liées à la plante utilisée et la maladie traitée. Par ailleurs, les plantes utilisées sont efficaces dans une mesure relative liée aux autres habitudes de pratiques traditionnelles qui contribuent à la réussite du traitement. Par exemple, les gens rentrent directement dans le sommeil après l'administration de certaines drogues, car ils pensent que le sommeil facilite l'action des drogues. De plus, l'administration des drogues avec certains aliments, en particulier le miel et le lait est un aspect remarquablement présent dans la pratique traditionnelle chez la population d'Ouezzane. Pour révéler, néanmoins en partie, l'implication de cette combinaison, nous avons testé l'effet antibactérien du miel d'origine d'Ouezzane en combinaison avec l'HE de *Mentha pulegium* contre *E. coli* K12 et *Listeria monocytogenes*. La combinaison synergique entre les deux produits a montré une remarquable action antibactérienne (Khay et al., 2016). Ce résultat a révélé, néanmoins en principe, à quel point ce type de combinaison joue un rôle déterminant dans la réussite de la pratique traditionnelle. En effet, les HE sont difficilement absorbables au niveau de l'intestin et par conséquent le mélange huile-miel pourrait faciliter l'entrée des composés des HE avec ceux du miel ce qui pourrait résoudre en principe le problème lié à l'absorption. De plus, nous avons

ainsi démontré l'activité antioxydante importante des échantillons du miel collecté de la région d'étude. Les effets antioxydants trouvés sont fortement corrélés avec les fortes teneurs en polyphénols et flavonoïdes que renferment le miel (Bouyahya et al., 2017d). Par ailleurs, certaines plantes médicinales sont elles-mêmes consommées en tant qu'aliments reflétant ainsi une notion récemment évoquée ; celle d'aliments, notion qui désigne le fonctionnement combinatoire d'un aliment comme médicament, ou ce qu'on appelle les aliments fonctionnels ou nutraceutiques (Bouyahya, 2016b).

Les plantes médicinales sélectionnées sont soumises à une série d'extraction organique en utilisant des solvants de différentes polarités tels que l'hexane, le méthanol et l'éthanol. Alors que, les plantes médicinales aromatiques ont été extraites par l'hydrodistillation pour l'obtention des HE. Etant donné l'importance des phénols en général et des flavonoïdes en particulier, nous avons réalisé un dosage phytochimique de ces deux familles chimiques afin de quantifier leur concentration dans nos extraits. Les résultats obtenus nous ont conduit à des remarquables teneurs en composés phénoliques avec une variabilité à la fois liée au solvant utilisé et la plante étudiée (Bouyahya et al., 2017c). Cette variabilité a été longtemps suggérée par des études antérieures ce qui laisse penser, de manière irréfutable, à quel point finalement le choix de la plante et le solvant d'extraction joue un rôle primordial dans le criblage phytochimique des phénols (Stagos et al., 2012 ; Lahlou, 2013).

Les HE sont analysées par CG-SM. Nous avons révélé une remarquable richesse de composés terpéniques en particulier les terpènes phénoliques. La diversité de molécules obtenues reflètent intensivement l'influence des facteurs éco-géographiques de la région sur la synthèse des HE et montrent, éventuellement, à quel point l'approche écologique choisie pourrait jouer un rôle extrêmement efficace dans le criblage de nouvelles molécules. Cette idée a été, *à priori*, soutenue par plusieurs auteurs et devrait constituer, *à postériori*, une approche colossale pour les recherches ethnopharmacologiques. En effet, certaines études ont commencé récemment à décortiquer le lien paradoxal qui existe entre l'écologie et le métabolisme secondaire chez les plantes (Aboukhalid et al., 2017). Le rôle que ces métabolites jouent dans la plante laisse penser déjà à l'existence des interactions importantes entre les facteurs environnementaux et les gènes responsables de la synthèse des métabolites secondaires. Ces gènes sont des véritables sujets de régulation induite ; ils peuvent être modifiés *via* les différents acteurs et leur expression dépend fortement des marqueurs génétiques et épigénétiques (Grativo et al., 2012). En effet, les marqueurs génomiques tels que les STR (*Short Tandem Repeat*), VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) et SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) prédisposent souvent à une expression ou répression génique *via* la régulation indirecte. Ces empreintes sont souvent mobiles dans les génomes des végétaux (Aboukhalid et al., 2017a), et peuvent mobiliser ainsi

avec eux une distinction transcriptionnelle indirecte en amont et/ou en aval d'autres gènes, y compris ceux impliqués dans le métabolisme secondaire (Mayer et al., 2017 ; Zogli et Libault, 2017). De plus, certains gènes sont soumis à la régulation épigénétique *via* la méthylation d'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, le remodelage de la chromatine et la transition d'état par des mRNA, menant ainsi à une régulation très fine qui intègre les signaux des facteurs environnementaux pour activer ou réprimer la transcription (théorie du phénomène) (Gallusci et al., 2017). Aujourd'hui, certaines études sont avancées plus loin en étudiant l'influence de la distribution géographique de plantes médicinales sur la migration des marqueurs génomique régulant l'anabolisme des HE (Aboukhaled et al., 2017a).

Dans un contexte de valorisation des produits extraits, nous avons réalisé un criblage pharmacologique sur quatre activités biologiques à savoir l'étude de l'activité antioxydante, antiproliférative, antiparasitaire et antibactérienne. Nous avons montré des effets antioxydants importants pour certaines plantes telle que *C. erythraea*. Cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement de certaines maladies notamment le diabète. Les propriétés antioxydantes de cette plante expliquent, néanmoins en partie, la façon dont des drogues de *C. erythraea* agissent contre le diabète. En effet, plusieurs études ont montré la corrélation quasi-étroite entre le diabète et le stress oxydant (Rochette et al., 2014). Ainsi, les résultats antioxydants obtenus peuvent avoir des applications solides dans le domaine du cancer, car cette maladie est fortement liée au stress oxydant dans les stades initiaux de sa genèse (Andrisic et al., 2017). L'implication du stress oxydant dans la cancérisation est principalement liée aux dommages des macromolécules y compris l'ADN prédisposant ainsi à la transformation tumorale (Mena et al., 2008).

Le cancer occupe actuellement le centre d'intérêt pour la découverte de médicaments ciblés. En effet, la compréhension mécanistique des voies de cancérisation grâce au progrès décisifs de la génomique, l'épigénomique, la transcriptomique et la protéomique, a orienté les recherches de manière extrêmement remarquable vers les pistes de réflexion dans la thérapie ciblée. L'idée vient dans le contexte ; si le cancer est une maladie de désordre, le déchiffrement moléculaire de celle-ci peut ouvrir des cibles précises pour rétablir ainsi l'ordre. En effet, certaines études ont commencé à décortiquer des molécules d'origines diverses, allant du milieu naturel à la biotechnologie en passant à la synthèse et/ou l'hémisynthèse.

Dans notre projet de recherche, en suivant l'approche de criblage horizontale, nous avons ainsi démontré à quel point certaines plantes médicinales de la région d'Ouezzane pourraient constituer une véritable source d'agents anticancéreux. C'est le cas par exemple d'extrait hexanique de *C. crispus* qui a révélé une remarquable activité antiproliférative *vis-à-vis* des lignées tumorales testées. Le fractionnement bioguidé de cet extrait pourrait révéler, certes, des

molécules bioactives qui auront des applications solides dans la thérapeutique ciblée du cancer. Les HE ont démontré également une forte capacité antiproliférative contre les cellules tumorales RD, L20B et Vero. Les résultats sont variables et fluctuants en fonction du produit évalué et de la lignée cellulaire testée. Plusieurs études ont démontré des activités antitumorales des substances naturelles extraites de plantes médicinales, c'est le cas par exemple d'arsénique utilisée en combinaison avec l'acide rétinoïque dans le traitement des leucémies (Rahmé et al., 2017). Le complexe arsénique-acide rétinoïque inhibe de façon hautement spécifique la protéine de fusion (PML/RAR α) responsable de la leucémie promyélocytaire aiguë. Alors que le deuxième exemple est celui du taxol qui est utilisé pour traiter les cancers d'ovaire (Wall et Wani, 1996). Le taxol bloque la division des cellules cancéreuses par leur action inhibitrice de la tubuline ; une protéine impliquée dans la division cellulaire.

Certes, les mécanismes d'action des substances naturelles sont multiples et très divers selon la nature chimique des substances impliquées mais également dépend des cellules cancéreuses (Bouyahya et al., 2016a ; El-Bairi et al., 2016). Les terpénoïdes par exemple peuvent agir à des niveaux sub-cellulaires et moléculaires en passant par les voies de signalisation (Bouyahya et al., 2016a). Alors que d'autres composés tels que les acide phénoliques et les flavonoïdes possèdent des effets anti-angiogénèses remarquables (El-Bairi et al., 2016).

Dans notre travail, nous avons remarqué qu'un extrait qui possède une remarquable capacité antioxydante n'est pas forcément un puissant anticancéreux, c'est le cas par exemple des extraits de *C. erythraea*. En effet, la propriété antioxydante d'un extrait ou d'une HE n'est pas, certes, attribuée à une seule molécule, mais c'est l'ensemble des molécules interagissent dans le milieu réactionnel, piégeant ainsi un radical libre par plusieurs mécanismes (Suhaj, 2006). Cependant, l'effet anticancéreux peut s'effectuer par une molécule qui pourrait bloquer, activer ou bien réprimer certains facteurs impliqués dans telle ou telle étape de prolifération.

L'activité antiproliférative des HE est certes attribuée aux principes actifs contenus dans ces HE. En effet, plusieurs composés terpéniques isolés des HE sont des antitumoraux avec des mécanismes d'action diverses. Par exemple, le carvacrol et le thymol semblent capables d'induire l'apoptose *via* la voie mitochondriale par l'ouverture des canaux calciques, qui produit la libération de Ca²⁺ dans le réticulum endoplasmique des cellules cancéreuses de l'ostéosarcome (Hsu et al., 2011). Le thymol a induit également l'apoptose d'une manière dose-dépendante dans la lignée cellulaire HL-60 *via* l'activation des voies indépendantes et dépendantes des caspases (Deb Dipanwita et al., 2011).

Par ailleurs, certaines molécules de plantes médicinales ont trouvé leur application dans le domaine du cancer. C'est le cas par exemple de la curcumine (molécule extraite de *Curcuma longa*) et la temontosine (molécule isolée d'*Inula viscosa*) (Sa et Das, 2008 ; Wilken et al., 2011 ;

[Merghoub et al., 2017](#)). En effet, la curcumine est dotée de puissants effets antitumoraux contre plusieurs types de cancer ([Wilken et al., 2011](#)). Ses mécanismes d'action sont liés à sa capacité d'arrêter le cycle cellulaire dans les différentes phases conduisant à l'apoptose de cellule tumorale *via* une activation éventuelle des voies dépendantes et/ou indépendantes des caspases ([Sa et Das, 2008](#)). D'autres études ont montré que la curcumine module le réseau épigénétique dans les cellules tumorales en réduisant l'acétylation des histones *via* l'inhibition des histones acétyl transférases (HTA) ([Sa et Das, 2008](#)). Le curcumin est une plante médicinale alimentaire dont la consommation quotidienne semble prévenir le cancer ([Sa et Das, 2008](#)). En effet, des travaux récents ont recommandé la consommation des aliments riches en principes actifs anticancéreux, suggérant ainsi la notion de nutrithérapie comme une stratégie de prévention contre le cancer ([Vernieri et al., 2018](#); [Wu et al., 2017](#)).

Les maladies infectieuses d'origine bactérienne ou parasitaire constituent une autre menace centrale en particulier pour les pays en voie de développement. Les microorganismes ont pu développer, en particulier les bactéries, grâce à la coévolution, la symbiose et éventuellement la dysbiose, des mécanismes sophistiqués qui leur permettent de contrebalancer les effets des drogues antimicrobiennes, ceux-ci a amené à l'apparition des souches résistantes voir multi-résistantes ([Waglechner et Wright., 2017](#) ; [Rangasamy et al., 2017](#)).

Les produits de synthèse qui ont été innovés par la catalyse chimique ont souvent des effets secondaires et/ou des problèmes liés à la biodisponibilité et la biodégradation ([Hafshejani et 2017](#)). Grâce au mimétisme moléculaire établi phylogénétiquement au cours de la coévolution, les molécules naturelles sont montrées capables de surmonter les limites de la catalyse chimique. En effet, elles ont montré des remarquables effets antimicrobiens avec une large gamme de sécurité, une action pharmacodynamique spécifique et une biodisponibilité pharmacocinétique importante ([Lahlou, 2013](#)).

D'ailleurs, le traitement des maladies infectieuses par les plantes médicinales est une idée très ancienne qui a été pratiquée de manière très empirique avant même la révolution pasteurienne et la découverte des micro-organismes ([Petrovsa, 2012](#)). La démonstration irréfutable qui fait de ces micro-organismes comme cause des maladies infectieuses a conduit aux pistes de réflexions sur des agents qui peuvent les combattre. En effet, la découverte des antibiotiques a beaucoup amélioré l'espérance de vie des populations. Cependant, les microbes ont très tôt développé des moyennes de survie contre ces antibiotiques ([Rangasamy et al., 2017](#)). Cette situation controversée, déjà prédite par Alexander Fleming, a conduit de divers laboratoires pharmacologiques aux autres pistes de recherches y compris le recours aux substances naturelles à base de plantes médicinales, mais cette fois-ci de manière rationnelle.

Notre contribution révèle que les plantes ayant été sélectionnées ont démontré des remarquables résultats antimicrobiens, en particulier, les HE qui sont très efficaces que les extraits organiques. Parmi les HE étudiées on trouve celle d'*O. compactum*, cette plante endémique du Maroc s'est montrée la plus utilisée dans la médecine traditionnelle dans la région d'Ouezzane (Bouyahya et al., 2017e) et d'ailleurs dans d'autres régions du Maroc (Eddouks et al., 2002 ; Orch et al., 2017 ; Fakchich et al., 2017). Ses HE testées à trois stades de développement ont inhibé de façon importante la croissance des leishmanies et des bactéries à des concentrations très fines. L'HE d'origan ont déjà montré des effets pharmacologiques importants et plus particulièrement les effets antimicrobiens (Bouhdid et al., 2008). Cependant, les propriétés antileishmaniennes n'ont pas encore été abordées par d'autres travaux. Cette activité laisse penser à des applications futures contre la leishmaniose, néanmoins, par leur utilisation par pulvérisation contre les vecteurs de la leishmaniose. Par ailleurs, l'isolement des principes actifs et leurs investigations profondes pourraient offrir des pistes thérapeutiques innovantes contre les formes amastigotes des leishmanies. Les effets antimicrobiens semblent être liés, certes, à des chémotypes de l'origan tels le carvacrol, le thymol, le γ -terpinène et le p-cymène. En effet, ces molécules ont des effets antimicrobiens multiples (Bouyahya et al., 2017f).

Les effets bactériostatiques et bactéricides démontrés par les HE d'origan, nous ont orienté à décortiquer les mécanismes par lesquels cette HE peut engendrer la mort bactérienne en fonction des composés majoritaires. L'évaluation de l'action antibactérienne s'est effectuée contre *E. coli* et *B. subtilis* ; car elles ont été les plus sensibles aux HE d'origan avec les valeurs de CMI égales aux celles de CMB.

Nous avons ainsi démontré que les HE ont causé la mort des cellules microbiennes grâce à leur capacité à traverser la membrane cellulaire menant ainsi à la perte de sa perméabilité et de son intégrité ; perturbations initiales déclenchant une lyse cellulaire (Bouhdid et al., 2009). Les bactéries, en formant des communautés, peuvent communiquer entre elles grâce au quorum sensing, ce qui leur permet de développer d'énormes stratégies afin de résister aux agents antibactériens. L'HE d'origan a montré également sa capacité à inhiber cette communication chez *B. subtilis*, piégeant ainsi les cellules dans un état de maintenance minimale ce qui leur amène à la mort. L'action anti-quorum sensing des HE et leurs composés actifs a été récemment montrée par plusieurs travaux (Luciardi et al., 2016 ; Luís et al., 2016 ; Myszkowski et al., 2016). Le thymol ; composé majeur de l'HE d'origan au stade post-floraison, pourrait être responsable de l'action quorum sensing.

Les résultats de criblage pharmacologique obtenus dans cette étude et plus particulièrement dans le domaine antimicrobien montrent à quel point les approches suivies représentent une grande fiabilité. Ainsi, la plante d'*O. compactum*, utilisée par la population avec un indice de

fidélité de 100%, a montré des propriétés mystérieuses. Cependant, cette plante est endémique du Maroc et en voie de disparition, en particulier au nord du Maroc, à cause de la collecte intensive et irrationnelle par des fournisseurs nationaux et internationaux. Cette situation, a amené de nombreux laboratoires à penser sur les voies de multiplication alternatives, en utilisant des outils de biotechnologie végétale, pour garder cette espèce rare. En effet, nous avons commencé le premier travail dans ce sens en étudiant la germination *in vitro* des semences d'origan, ainsi l'influence des facteurs abiotiques sur la cinétique de germination. Les résultats ont montré que les graines constituent un matériel facilement cultivable dans des conditions abiotiques optimales, offrant ainsi une voie alternative mais à part la multiplication végétative naturelle, qui est fortement menacée par la pratique de collecte anarchique (Laghmouchi et al., 2017).

Conclusions

Dans le présent travail, nous avons mis en exergue l'importance des approches ethnopharmacologiques et écologiques dans le criblage des plantes médicinales de région d'Ouezzane. Nous avons déterminé les teneurs en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes pour les extraits organiques, ainsi que la composition chimique des HE. Nous avons également évalué l'activité antiproliférative, antioxydante, antiparasitaire et antibactérienne de certaines plantes médicinales sélectionnées. Les résultats obtenus ont permis de formuler les conclusions suivantes :

La région d'Ouezzane est dotée d'une diversité floristique dont les plantes médicinales constituent un pourcentage important. Les plantes médicinales occupent une place importante comme approche thérapeutique chez la population de la région d'Ouezzane. L'étude ethnopharmacologique a révélé une importante variabilité dans la préparation des drogues, le mode d'administration et les pathologies traitées. Les extraits des plantes sélectionnées ont montré une richesse importante en polyphénols et en flavonoïdes, alors que les HE sont riches en terpènes phénoliques.

L'étude de l'activité antiproliférative nous a permis de montrer que les extraits de *C. cruspus* et *O. compactum* ont montré une activité antiproliférative importante contre les cellules cancéreuses RD et L20B, alors que les HE de *L. stoechas* se sont montrées plus active contre la lignée RD. Nous avons montré également que les produits qui ont révélé une importante cytotoxicité ne sont forcément pas les plus anticancéreux.

L'étude analytique de l'activité antioxydante nous a permis de conclure que l'action antioxydante est dose dépendante. Cette activité est d'autant plus importante que la dose des produits était élevée. Les extraits de *C. erythraea* semblent présenter un intérêt par leurs activités antioxydantes intéressantes qui ont été établies. Par ailleurs, l'activité antioxydante d'un extrait et/ou d'une HE ne dépend pas seulement de sa composition chimique mais aussi du milieu réactionnel.

L'étude des effets antiparasitaires a montré que les HE sont beaucoup plus actives contre les leishmanies par rapport aux extraits organiques. Les HE d'*O. compactum* ont montré des effets cytotoxique remarquables à des concentrations très fines contre les formes promastigotes de trois espèces de *Leishmania*.

L'activité antibactérienne des HE et des extraits a révélé une extrême variabilité dans les résultats obtenus. Au niveau méthodologique, la technique de diffusion en puits n'est pas suffisant pour tirer des conclusions sur l'effet antibactérien d'une HE. Elle doit être complétée par la détermination de la CMI et CMB. Nous avons montré que les HE sont plus actives contre

les souches testées par rapport aux extraits organiques. Par ailleurs, les bactéries à Gram positives sont plus sensibles aux produits testés que les Gram négatives.

Les HE d'*O. compactum* ont exprimé une forte activité antibactérienne et en particulier contre les bactéries à Gram+. L'étude du mécanisme d'action des HE d'*O. compactum* contre *E. coli* et *B. subtilis* a montré que ces HE inhibent la cinétique de croissance d'*E. coli* et induisent la perte de la perméabilité et de l'intégrité membranaire chez deux souches testées. Les HE d'*O. compactum* ont inhibé la croissance de *B. subtilis* via l'inhibition de la formation du biofilm ; phénotype majeur du Quorum sensing.

Perspectives

Les principales perspectives de recherches qui apparaissent à l'issue de cette thèse concernent principalement un aspect fondamental (mécanismes moléculaires) et un autre appliqué (utilisations des produits dans l'industrie).

Activité antiproliférative : il serait très intéressant de continuer le criblage des effets antiprolifératifs sur d'autres lignées cellulaires représentant différents types de cancers humains. Par ailleurs, il est primordial de fractionner des extraits hexaniques de *C. cruspis* et *O. compactum* et d'évaluer de leur activité antiproliférative sur plusieurs lignées cellulaires. Ainsi, les composés majoritaires des HE pourraient être isolés et testés pour leurs effets anticancéreux individuellement et/ou en synergie. Les mécanismes moléculaires des fractions et/ou des molécules les plus actives pourraient être conduits sur l'apoptose et le cycle cellulaire.

Activité antioxydante : parmi les perspectives concernant les résultats des effets antioxydants, il serait très important d'appliquer les produits antioxydants, en particulier les HE, dans l'industrie agro-alimentaire pour la conservation des aliments. Par ailleurs, les extraits organiques tels que ceux de *C. erythraea* pourraient être fractionnés et évalués dans des systèmes antioxydants *in vivo*. Ainsi, la combinaison entre les effets antioxydants et anticancéreux pourrait être envisagée en étudiant l'effet pro-oxydant et antioxydant sur des lignées cellulaires tumorales *in vitro*.

Activité antiparasitaire : vu les résultats obtenus, il serait très intéressant de décortiquer des mécanismes moléculaires, en particulier de l'HE d'*O. compactum* et de ses composés chémotypes, sur certaines cibles moléculaires telles que l'inhibition de l'arginase et de la topoisomérase. Il serait encore primordial d'étudier l'efficacité antileishmanienne des HE et de ses chémotypes sur des formes amastigotes *in vivo*. Un autre aspect de perspective est lié à l'éventuelle application des HE par pulvérisation contre les vecteurs de la leishmaniose.

Activité antibactérienne : il serait nécessaire de d'étudier l'efficacité antibactérienne de l'HE d'*O. compactum* *in vivo* et cela en évaluant leur efficacité dans le traitement d'animaux de laboratoire. Par ailleurs, approfondir les connaissances concernant le mode d'action antibactérienne est un point également intéressant. En effet, il serait remarquable de compléter ce travail en abordant l'effet de l'HE d'*O. compactum* sur d'autres fonctions et structures cellulaires. Il serait intéressant d'étudier l'effet sur les profils lipidiques et protéiques des membranes bactériennes ainsi que sur l'activité enzymatique et l'expression génique des intermédiaires du quorum sensing. En fin, les changements structuraux et physiologiques peuvent être ainsi faire l'objet de futures investigations. Enfin, il est assez judicieux d'étudier

l'éventuelle aptitude des souches bactériennes à s'adapter aux HE et à développer une résistance *vis-à-vis* de ces dernières.

Références Bibliographiques

- Abbasi AM, Khan MA, Shah MH, et al, 2013. Ethnobotanical appraisal and cultural values of medicinally important wild edible vegetables of Lesser Himalayas-Pakistan, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 9: 66.
- Abdeljebbar LH, Benjouad A, Morjani H, et al, 2009. Antiproliferative effects of withanoids from *Withania adpressa*. *Therapy*. 64: 121-127.
- Ablain J, Rice K, Soilihi H, et al, 2014. Activation of a promyelocytic leukemia-tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nature Medicine*. 20: 167-174.
- Aboukhalid K, Al Faiz C, Douaik A, et al, 2017. Influence of environmental factors on essential oil variability in *Origanum compactum* Benth. growing wild in Morocco. *Chem Biodiv*. doi: 10.1002/cbdv.201700158.
- Aboukhalid K, Lamiri A, Agacka-Mołdoch M, et al, 2016. Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco. *Chem. Biodiv*. 13: 1126-1139.
- Aboukhalid K, Machon N, Lambourdière J, et al, 2017. Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: implication for conservation. *Biol. Conser*. 212: 172-82.
- Adams RP, 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co., CarolStream, IL, USA.
- Adewoye L, Sutherland A, Sri Kumar R, et al, 2002. ThemexR repressor of the mexABoprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol*. 184: 4308-4312
- Ahmad ST, Arjumand W, Seth A, et al, 2011. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicol*. 290: 69-81
- Ait Ouazzou A, Lorán S, Arakrak A, 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Res Intern*. 45: 313-319.
- Al Askari G, Kahouadji A, Khedid K, et al, 2013. *In vitro* antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of leaves of *Ficus carica* collected from five different regions of Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*. 4: 33-38
- Alberts B, Bray D, Lewis J, et al, 1994. *Molecular Biology of the Cello* New York: Garland Publishing.
- Albuquerque NP, Hanazaki N (2006) As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16 (Supl.): 678-689.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, et al, 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*. 8: 251-259.
- Ampuero S, 2000. *Leishmania*. Serie de documentos monográficos N°8, Ministerio de Salud, Lima, Perú.
- Amro A, Gashout A, Al-Dwibe H, et al, 2012. First Molecular Epidemiological Study of Cutaneous Leishmaniasis in Libya. *PLOS Neglected Tropical Disease*. 6: 1-6.
- Andrade SF, Da Silva, Filho AA, et al, 2008. Antileishmanial, antimalarial and antimicrobial activities of the extract and isolated compounds from *Austroplenckia populnea* (Celastraceae). *Z. Naturforsch*. 63: 497-502.
- Andrisic L, Dudzik D, Barbas C, 2017. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox. Biol*. 14: 47-58.
- Aneb M, Talbaoui A, Bouyahya A, et al, 2016. *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *Euro J Med Plant*. 16: 1-13.
- Anyinam C, 1995. Ecology and ethnomedicine. Exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. *Soc Sci Medi*. 4: 321-329.

- Avramova Z, 2015. Transcriptional memory of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant J.* 83: 149-159.
- Bachman KE, Park BH, Rhee I, et al, 2003. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell.* 3: 89-95.
- Bahatti HB, Khan SS, Khan A, et al, 2014. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. *Phytom.* 21: 1597-1626.
- Bailey MS, Lockwood, DNJ, 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatol.* 25, 203-211.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, et al, 2008. Biological effects of essential oils, a review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475
- Balouiri M, Sadiki M, Bnsouda SK, 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharma Anal.* 6: 71-79.
- Banerjee SA, Kaseb O, Wang Z, et al, 2009. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Research.* 69: 5575-5583
- Bansaas K, Vousden KH, 2007. P53 : New roles in metabolism. *Trends in cell biology.* 17: 286-291.
- Barbosa WLR, 2008. Etnofarmácia: Fitoterapia Popular e Ciência Farmacêutica, UFPA, 150 p.
- Bartram S, Jux A, Gleixner G, et al, 2006. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochem.* 67: 1661-1672.
- Bassler BL, 2002. Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* 109: 421-424
- Begquist SAM, Gertsson UE, Knuthsen P, et al, 2005. Flavonoids in baby spinach (*Spinacia oleracea* L.): Changes during plant growth and storage. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9459-9464.
- Belayachi L, Aceves-Luquero C, Merghoub N, et al, 2013. Screening of North African Medicinal Plant Extracts for Cytotoxic Activity Against Tumor Cell Lines. *Europ J Med Plan.* 3: 310-332.
- Belkamel, A., Bammi, J., Belkamel, A., et al, 2013. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle d'une endémique Ibéro-marocaine: *Origanum compactum* (Benth.). *J. Anim. Plant Sci.* 19 : 2880-2887.
- Bellakhdar J, 1997. La pharmacopée marocaine, traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Saint-Etienne, Edit. Ibis Press, pp: 764 (Ed. Le Fennec. Casablanca, Maroc. 129-533).
- Bellakhdar J, 2006. Plantes médicinales au Maghreb et soins de base. Précis de phytothérapie moderne. Editions le Fennec, Casablanca, Maroc, pp: 386.
- Benbacer L, Merghoub N, El Btaouri H, et al, 2012. Antiproliferative Effect and induction of apoptosis by *Inula viscosa* L. and *Retama monosperma* L. extracts in human cervical cancer cells. *Topi Cerv Canc Adv Pre.* 16: 267-284.
- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, 2008. a review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technol.* 145: 209-228.
- Benlamdini N, Elhafian M, Rochdi A, et al, 2014. Étude Floristique et Ethnobotanique de La Flore Médicinale Du Haut Atlas Oriental (Haute Moulouya), *J Appl Biosc.* 78: 6771-87.
- Bente M, Harder S, Wiesgigl M, et al, 2003. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics.* 3 : 1811-29.
- Bernard MC, 1865. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. Paris, Labraire de l'académie impériale de médecine.
- Besteiro S, Coombs GH, Mottram JC, et al, 2004. A potential role for ICP, a Leishmanial inhibitor of cysteine peptidases, in the interaction between host and parasite. *Molecular microbiol.* 54:1224-36.
- Beta T, Nam S, Dexter JE, et al, 2005. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chem.* 82: 390-393.
- Bey-Ould Si Said Z, Haddadi-Guemghar H, Boulekbache-Makhlouf L, et al, 2016. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Indu Cro & Prod.* 89:167-175.

- Bhargava, Singh SP, Sharma A, et al, 2015; Attenuation of quorum sensing-mediated virulence of *Acinetobacter baumannii* by *Glycyrrhiza glabra* flavonoids. *Future Microbiol.* 10: 1953
- Biju J, Sulaiman CT, Satheesh G, et al, 2014. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *Int J Pharm Pharm Sci.* 6: 406-8.
- Biswaw S, Rao CM, 2017. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther.* 173:118-134.
- Blazquez J (2003) Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis* 37: 1201-1209
- Boelens MH, 1996. Chemical and sensory evaluation of trace compounds in naturals. *Perfum Flavor.* 21:25-31.
- Bohlmann J, Keeling CI (2008) Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials. *Terpenoid biomaterials.* *Plant J.* 54:656-69.
- Botta A, 2006. Interrelations entre génotoxicité, mutagenèse et cancérogenèse. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement.* 67: 295-297.
- Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, et al, 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiol.* 109: 1139-1149
- Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, et al, 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1558-1568.
- Bouhdid S, Skali SN, Idaomar M et al, 2008. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *Afr. J. Biotech.* 7: 1563-1570.
- Bourdeau V, Ferbeyre G, 2014. Engaging a senescent response to cure leukemia. *Nature medicine.* 20: 123-124.
- Bouterfas K, Mehdadi Z, Elaoufi MM, et al, 2016. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Ann Pharm.* 74: 453-62.
- Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, et al, 2017a. Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria. *Phytothérapie.* DOI 10.1007/s10298-017-1118-z.
- Bouyahya A, 2016b. Alicaments : des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé ? *Annales des sciences de la santé.* 1: 1-3.
- Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, Dakka, N., 2016a. Essential Oils as anticancer agents: news on mode of action. *Phytothérapie.* DOI 10.1007/s10298-016-1058-z.
- Bouyahya A, Abrini J, Et-Touys A, et al, 2017d. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of Moroccan honey samples. *Phytothérapie.* DOI 10.1007/s10298-017-1122-3.
- Bouyahya A, Abrini J, Et-Touys A, et al, 2017e. Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. *European Journal of Integrative Medicine.* 13: 9-25.
- Bouyahya A, Bakri Y, Khay EO, et al, 2017c. Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: A review. *Asian Pacific J Trop Dis.* 7: 57-64.
- Bouyahya A, Dakka Nadia, Et-Touys A, et al, 2017b. Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific J of Trop Med.* 10: 729-743.
- Bouyahya A, Guaouguaou FE, Dakka N, et al, 2017f. Pharmacological activities and medicinal properties of endemic Moroccan medicinal plant *Origanum compactum* (Benth) and their compounds. *Asian Pac J Trop Dis.* 7: 628-640.
- Bouzid K, Bedairia N, Marty M, 2012. Anticorps monoclonaux thérapeutiques en cancérologie Therapeutic monoclonal antibodies in oncology. *Pathologie Biologie.* 60: 223-228.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Barseet C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 28: 25-30.
- Branford S, Melo J, Hughes T, 2009. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter ?. *Blood*. 114: 5426–5435.
- Bretagne M, Huillard O, Chahwakilian A, et al, 2016. Bulletin du cancer. Inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant l'angiogenèse et sujet âgés : tolérance, évaluation pré-thérapeutique et gestion des effets indésirables. 103: 259-272.
- Brown M, Cohen J, Arun P, et al, 2008. NF- κ B in carcinoma therapy and prevention. *Expert Opin Ther Targets*. 12: 1109–1122.
- Bruneton J, 1999. Tannins. In: *Pharmacognosie, phytochimie, Plants médicinales; TEC and DOC* (Ed.,). Paris. pp: 369-404.
- Buhagiar JA, Podesta MT, Wilson AP, et al, 1999. The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulata*. *Anticancer Res*. 19: 5435–5443.
- Burt S, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol*. 94:223–53
- Burt SA, Reinders RD, 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl. Microbiol*. 36: 162-167.
- Buxbaum LU, Denise H, Coombs GH, et al 2003. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *J. Immunol*. 2003, 171:3711-7.
- Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, et al, 2005. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid β -oxidation. *Oncogene*. 24: 4165–4173.
- Caillet S, Lacroix M, 2006. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*. 69: 2961-2969
- Calsamiglia SM, Busquet PW, Cardozo L, et al, 2007. Essential oils for modifying rumen fermentation: A review. *J. Dairy Sci*. 90:2580-2595.
- Canha Benjamin C, 2016. Using Humor in Treatment of Substance Use Disorders: Worthy of Further Investigation. *Open Nurs*. 10 : 37–44.
- Cardozo MT, de Conti A, Ong TP, et al, 2011. Chemopreventive effects of β -ionone and geraniol during rat hepatocarcinogenesis promotion: distinct actions on cell proliferation, apoptosis, HMGCoA reductase, and RhoA. *J Nutr Biochem*. 22: 130–135
- Carnesecchi S, Langley K, Exinger F, et al, 2002. Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-Fluorouracil treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 301: 625–630
- Carrasco, A., Ortiz-Ruiza, A., Martinez-Gutierrezb, et al, 2015. *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography-mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Indus Crop Prod*. 73 : 16-27.
- Castro C, Jimenez M, Gonzalez-De-Parra M, 1992. Inhibitory effect of piquerol A on the growth of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med*. 58: 281
- Cavalieri E, Bergamini C, Mariotto S, et al, 2009. Involvement of mitochondrial permeability transition pore opening in α -bisabolol induced apoptosis. *FEBS J*. 276: 3990–4000.
- Cavalieri E, Rigo A, Bonifacio M, 2011. Pro-apoptotic activity of α -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. *J Transl Med*. 9: 45.
- Cavar S, Maksimovic M, Solic ME, et al., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chem*. 111:648–53.
- Çelik TA, Aslantürk ÖS, 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. *Biologia*. 62: 292–296.
- Chaisson EJ, 2014. The Natural Science Underlying Big History. *Scientific World J*. 2014: 384912.

- Chalise K, Acharya N, Gurung, RP, et al, 2010. Antioxidant activity and polyphenol content in edible wild fruits from Nepal. *Int J Food Sci Nutr*. 61: 425-432.
- Chamdit S, Siripermool P, 2012. Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol Univ J Pharm Sci*. 39: 28-36.
- Chang H T, Hsu S S, Chou C T, et al, 2011. Effect of thymol on Ca homeostasis and viability in MG63 human osteosarcoma cells. *Pharmacol*. 88: 201-212.
- Chaouki W, DY. Leger, J. Eljastimi, JL. Et al, 2010. Hmamouchi, Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. *Pharm Biol*. 48: 269-274.
- Chaouki W, Meddah B, Hmamouchi M, 2015. Antiproliferative activity of *Origanum compactum* extract on lung cancer and hepatoma cells. *Arab J Med Plant*. 1: 1-13.
- Chaouki WB, Meddah M, 2015. Hmamouchi, Antiproliferative activity of *Origanum compactum* extract on lung cancer and hepatoma cells. *Arab J. Med Plant*. 1: 1.
- Charpentier B, 2008. New therapeutic targets for antibodies and recombinant proteins in organ transplantation. *Bull Acad Natl Med*. 192:883-93.
- Chatoui K, Talbaoui A, Aneb M, et al, 2016. Phytochemical Screening, Antioxidant and Antibacterial activity of *Lepidium sativum* seeds from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*. 7: 2938-2946.
- Chaudhary AS. 2016. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 6: 552-556.
- Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, et al, 1989. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 264: 7483-9.
- Chemat F, Abert-Vian M, Fernandez X, 2013. Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. In: Chemat F (ed). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice*. Springer, New York, pp 53-66.
- Chen CZ, Stuart LC, 2002. Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials*. 23: 3359-3368.
- Chen W, Lu Y, Wu J, et al, 2011. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 67: 799-808
- Chen Y, Xie H, Gao Q, 2017. Colon cancer associated transcripts in human cancers. *Biomed and Pharmacol*. 94: 531-540.
- Cherrat L, Espina L, Bakkali M, et al, 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 22: 221-229.
- Chin L, 1998. Pomerantz J, DePinho R: The INK4a/ ARF tumor suppressor: one gene, two products, two pathways. *TIBS*. 23:291.
- Claus R, Lübbert M, 2003. Epigenetic target in hematopoietic malignancies. *Oncogene*. 22: 6489-96.
- Cole R A, Bansal A, Moriarty DM, et al, 2007. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica. *J. Nat Med*. 61: 414-417.
- Connolly JD, Hill RA, 1991. Dictionary of terpenoids., vol. 1: Mono- and sesquiterpenoids, vol. 2: Di- and higher terpenoids, vol. 3: Indexes. Chapman & Hall London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.
- Cook NC, Sammam S, 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutrit. Biochem*. 7: 66-76.
- Coutard F, Crassous P, Droguet M, et al, 2007. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation ? *ISME*. 1: 111-120.
- Cowan MM, 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb. Biol. Rev*. 10: 564-582.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL, 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol*. 91: 492-499.

- Crisp AP, Ganguly D, Eichten SR, et al, 2016. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sci. Adv.* 2. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1501340>.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG, 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA, pp: 1250–68.
- Da Silva Filho AA, Costa ES, Cunha WR, 2008. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). *Phytother. Res.* 22: 1307-1310.
- Da Silva PPJ, Meijer L, 2012. Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique. *Med Sci.* 28 : 534-42.
- Darra E, Abdel-Azeim S, Manara A, et al, 2008. Insight into the apoptosis-inducing action of alpha-bisabolol towards malignant tumor cells: involvement of lipid rafts and Bid. *Arch Biochem Biophys.* 476: 113–23
- De Feo V, De Simone F, Senatore F, 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochem.* 61:573–8
- De Paoli, Carbone A, 2015. Microenvironmental abnormalities induced by viral cooperation: Impact on lymphomagenesis. *Semin Cancer Biol.* 34:70-80.
- Deb Dipanwita D, Parimala G, Saravana Devi S, et al, 2011. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. *Chem Biol Interact.* 193: 97–106.
- Debrabant A, Joshi MB, Pimenta PF, et al, 2004. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *International JParasitology.* 34: 205-17.
- Demain AL, Fang A, 2000. The Natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotech.* 69: 1-39.
- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, et al, 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4863-4870.
- Dorman HJ, Deans SG, 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 88: 308-16.
- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, 2003. Characterization of the antioxidant properties of deodorised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* 83: 255-262.
- Doyle MP, 2006. *Antimicrobial resistance: implications for the food system*. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 5: 71-137.
- Dubey VS, Bhalla R, Luthra R, 2003. An overview of the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci.* 28:637–46.
- Duncan RC, Salotra P, Goyal N, 2004. The application of gene expression microarray technology to kinetoplastid research. *Current molecular medicine.* 2004: 4: 611-21.
- Dung NT, Kim JM, Kang SC, 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food Chem Toxicol.* 46: 3632-3639.
- Duquenois P, Anton R, 1968. Search for derivatives of anthracene in 2 African Cassia: *Cassia nigricans* Vahl et *Cassia podocarpa* Guill. *Ann Pharm Fr.* 26: 607–14.
- Dzidic S, Suskovic J, Kos B, 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol.* 46: 11-21.
- Eddouks M, M. Ajebli, M. Hebi, 2017. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilalet region (Province of Errachidia), Morocco, *J. Ethnopharmacol.* 198: 516-530.
- Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, et al, 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol.* 82: 97-103.

- Egger G, Liang G, Aparicio A, et al, 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 429: 457-63.
- Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, et al, 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol*. 40: 193-236.
- El Babili F, Bouajila J, Souchard JP, et al, 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J. Food Sci*. 76: 512-518.
- El Bairi KA, El-Meghawry El-Kenawy R, Heshu A, et al, 2016. Natural products against cancer angiogenesis. *Tumor Biol*. 37 : 14513-14536.
- El Hafian M, Benlamdini N, Elyacoubi H, et al, 2014. Étude Floristique et Ethnobotanique Des Plantes Médicinales Utilisées Au Niveau de La Préfecture D' Agadir-Ida-Outanane (Maroc), *J Appl Biosc*. 81 : 7198-7213.
- El Jemli M, K. Kamal, I. Marmouzi, et al, 2016. Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetralinis articulata* L. *J. Trad & Compl Medi*. 1-7.
- El Moussaoui N, Sanchez G, Khay EO, et al, 2013. Antibacterial and Antiviral Activities of Essential Oils of Northern Moroccan Plants *British Biotechnology Journal*. 3 : 318-331.
- El Rhaffari L, Hammani K, Benlyas M, et al, 2001. Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet (Frensh).
- El yahyaoui O, Ait ouaaziz N, Sammama A, 2015. Etude Ethnobotanique : Plantes Médicinales Commercialisées À La Province de Laâyoune ; Identification et Utilisation, *Intern J Innova Appl Studies*. 12: 533-541.
- El-Hilaly J, M. Hmamouchi, B. Lyoussi, 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco), *J. Ethnopharmacol*. 86: 149-158.
- Elizabetsky E. Shanley P, 1994. Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. *Pharmacology and Therapeutics*. 64 : 201-214.
- Elzaawaly AA, Xuan TD, Koyouma H, 2007. Antioxidants activity and contents of essential oils and phenolic compounds in flowers and seeds of alpine zerumbet. *Food Chem*. 104 : 1648-1653.
- Ennabili A, E. El Hamdouni, N. Gharnit, Intérêts socio-économiques du caroubier et des plantes médicinales, aromatiques et mellifères à Mokrisset et Bab Taza (NW du Maroc), Rapport Agence de Développement Local de Chefchaouen, Maroc, 1997.
- Ennabili A, Gharnit N, Maach Y, et al, 2006. Exploitation des plantes médicinales et alimentaires du bassin versant de l'oued Laou (Nord ouest du Maroc), *J. Bot. Soc. Bot*. 36 : 71-79.
- Ennabili A, N. Gharnit, EL. El Hamdouni, 2000. Inventory and social interest of medicinal, aromatic and Honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco), *Stud Bot*. 19: 57-74.
- Ennabili A, Nabil L, Ater M, 1996. Importance socio-économique des hygrophytes au NW du Maroc. *Al Biruniya, Al Biruniya Rev. Mar. Pharm*. 12: 95-120.
- Enomoto M, Vaughen J, Igaki T, 2015. Non-autonomous overgrowth by oncogenic niche cells: Cellular cooperation and competition in tumorigenesis. *Cancer Sci*. 106: 1651-8.
- Essid R, Rahali FZ, Msaada K, et al, 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Indus Crop & Prod*. 77: 795-802.
- Esteller Fahrner JA, Baylin, SB, 2003. Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad. *Genes Dev*. 17: 1805-12.
- Et-Touys A, Fellah H, Mniouil M, et al, 2016. Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. Extracts from Morocco. *British Microbiology Research Journal*. 16:1-10.
- Et-Touys A, Fellah H, Sebti, et al, 2016. *In vitro* Antileishmanial Activity of Extracts from Endemic Moroccan Medicinal Plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *verbenaca* Maire (*S. clandestina* Batt. non L). *Euro J Medi Plan*. 16, 1-8.

- Fakchich J, Elachouri M, 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J Ethnopharmacol.* 28: 76-87.
- Fallah Y, Brundage J, Allegakoen P, 2017. MYC-Driven Pathways in Breast Cancer Subtypes. *Biomolecules.* 11: 53.
- Fearon ER, 1990. Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61:759-767.
- Fennane M, Ibn Tattou M, 2005. Flore vasculaire du Maroc, inventaire et chorologie, *Trav. Inst. Sci. Rabat.* 1 : 37.
- Fennane M, Ibn Tattou M, Mathez J, et al, 1999. Flore Pratique du Maroc, *Trav. Inst. Sci. Rabat.* 1 : 36.
- Fennane M, Ibn Tattou M, Ouyahya A, et al, 2007. Flore Pratique du Maroc, *Trav. Inst. Sci. Rabat.* 2 : 38.
- Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, et al, 2016. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol.* 31; 6:77.
- Field JA, Lettinga G, 1992. Toxicity of tannic compounds to microorganisms. *Plants Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance.* *Basic Life Sci.* 59: 673-692.
- Finland M, 1979. *Emergence of antibiotic resistance in hospitals 1935-1975.* *Rev Infect Dis.* 1:4-22.
- Foti MC, Ingold KU, 2003. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by gamma-terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. *J Agric Food Chem.* 51:2758-65.
- Franke EN, Mayer AS, 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci Food Agric.* 80: 1925-1941.
- Friedrich H, 1976. Phenylpropanoid constituents of essential oils. *Lloydia.* 39:1-7.
- Gallusci P, Dai Z, Génard M, 2017, Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends in Plant Science.* 22: 610-623.
- Galmarini D, Galmarini CM, Galmarini FC, 2012. Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. *Crit Rev Onco Hematol.* 84: 181-199.
- Gao M, Teplitski M, Robinson JB, et al, 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 827-834.
- Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, et al, 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chem* 107. 1120-1130.
- Gelsomino F, Berbolin M, Spallanzani A, 2016. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* 51:19-26.
- Ghorbani A, 2005. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran:(Part 1): General results. *Journal of Ethnopharmacol.* 102: 58-68.
- Giancinti C, Giordano A, 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene.* 25: 5220-5227.
- Giedraitiene A, Vitkauskienė A, Naginiene R, et al, 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina.* 47:137-146
- Gius D, Cui H, Bradbury CM, et al. 2004. Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. *Cancer Cell.* 6: 361-71.
- Goeke A, 2002. Sulfur-containing odorants in fragrance chemistry. *J Sulfur Chem.* 23:243-78.
- Goodman SN, Gerson J, 2013. Mechanistic Evidence in Evidence-Based Medicine: A Conceptual Framework. Agency of Healthcare Research and Quality. 13-EHC042-EF.
- Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, et al, 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study *Lancet.* 365: 579-587.
- Grassmann J, Hippeli S, Estner EF, 2002. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plan Physio Biochem.* 40: 471-478.

- Grativo C, Hemerly AS, Cavalcanti P, 2012. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Bioch. Biophys. Acta-Gene Regulatory Mechanisms*. 1819: 176-185.
- Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL, 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance J*. 14:322-32.
- Guirado OAA, Cuéllar AC, 2008. Strategies for the selection of medicinal plants to be studied. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 13.
- Gull K, 2001. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and postgenomics. *International journal for Parasitol*. 31: 443-52.
- Hafshejani TM, Zamanian A, Venugopal JR, 2017. Antibacterial glass-ionomer cement restorative materials: A critical review on the current status of extended release formulations. *J. Contro Rele*. 262, 317-328.
- Halkier BA, Gershenzon J, 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Ann Rev Plant Biol* 57:303-33.
- Han N, M. Bakovic, 2015. Biologically active triterpenoids and their cardioprotective and anti-inflammatory effects. *J. Bioanal & Biomed*. 12: 1-11.
- Hanahan D, Weinberg RA, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-74.
- Heath RJ, Rock CO, 2004. Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin. Invest. Drugs*. 5: 146-153.
- Heim KE, Tahliaferro AR, Bobilya DJ, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*. 13: 572-584.
- Heinrich M, 2001. *Ethnopharmazie und Ethnobotanik. Eine Einführung*. Stuttgart Germany.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Heinrich M, Kufer J, Leonti M, et al, 2006. Ethnobotany and Ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J. Ethnopharm*. 107: 157-160.
- Heinrich MA, Ankil B, Frei C, 1998. Wiemann, V. Stricher, Medicinal plants in Mexico: healer's consensus and cultural importance, *Soc. Sci. Med*. 47: 1859-1871.
- Hertzog DI, OS. Tica, 2012. Molecular mechanisms underlying the anti-cancerous action of flavonoids. *Current Health Sci. J*. 38: 145-149.
- Hoerauf A, Rascher C, Bang R, et al, 1997. Host-cell cyclophilin is important for the intracellular replication of *Leishmania major*. *Molecular microbiol*. 24: 421-9.
- Holley RA, Patel D, 2005. Improvement of shelflife and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22: 273-292.
- Holmes AJ, Gillings MR, Nield BS, et al, 2003. *The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution*. *Environ. Microbiol* 5:383-394.
- Hooper DC, 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*. 2: 38-55.
- Hou J, Sun T, Hu J, et al, 2007. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata*. *Food Chem*, 103: 355-358.
- Houbairi S, Elmiziani I, Lamiri A, 2015. Comparison of the antioxidant activity of aromatic medicinal plants of Moroccan origin. *Eur J Med Plants*. 2015; 10: 1-10.
- Hsu SS, Lin K L, Chou CT, et al, 2011. Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in human glioblastoma cells. *Eur J Pharmacol*. 670: 85-91.
- Huber B, Eberl L, Feucht W, et al, 2003. Influence of polyphenols on bacterial biofilms formation and quorum-sensing. *Z. Naturforsch*. 58: 879-884.
- Hung SH, Chih-Wen Yu CW, Ho Lin C, 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *G et al. Bot. Bull. Acad. Sin*. 46: 1-10.
- Hunter T, 1991. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64:249-270.

- Hussain A, Brahmabhatt K, Priyani A, et al, 2011. Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. *Cancer Biotherapy Radiopharm.* 26: 519–527.
- Iguermia S, Harmouche T, Mikou O, 2011. Mucocutaneous leishmaniasis in Morocco, evidence of the parasite's ecological evolution. *Med Mal Infect:* 41: 47-48.
- Inoue M, Suzuki R, Koide T, 1994. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. *Biochem, Biophys. Res. Comm.* 204:898.
- Islam MK, Saha I, Mahmud K, 2014. An ethnobotanical study of medicinal plants used by tribal and native people of Madhupur forest area, Bangladesh, *J Ethnopharmacol.* 151: 921-930.
- Isman MB, 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19:603–8.
- Ives A, Ronet C, Prevel F, 2011. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science.* 2011, 331: 775-8.
- Jaafari A, Tilaoui M, AitMouse HA, et al, 2012. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 22: 534–540.
- Jafri S H., Glass J, Shi R, et al, 2010. Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29: 87
- Jinesh GG, Sambandam V, Vijavaghavan S, 2017. Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2017.377.
- Jouad H, Haloui M, Rhiauani H, 2001. Eddouks, Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiacandrenal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane), *J Ethnopharmacol.* 77: 175-182.
- Julian D, Dorothy D, 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular biology reviews.* 74: 417-433.
- Kadir MF, Bin Sayeed MS, Mia M, 2013. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers in Bangladesh for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 147: 148-156.
- Kar S, Deb M, Sengupta D, et al, 2012. An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function. *Epigenetics.* 7: 994-1007.
- Katyal P, Bhardwaj N, Khajuria R, 2014. Flavonoids and their therapeutic potential as anticancer agents; biosynthesis, metabolism and regulation. *World J Pharmacy & Pharmac Sci.* 3: 2188-2216.
- Kaur G, Athar M, Alam MS, 2010. Eugenol precludes cutaneous chemical carcinogenesis in mouse by preventing oxidative stress and inflammation and by inducing apoptosis. *Mol Carcinog.* 49: 290–301.
- Kayani S, Ahmad A, Sultana S, et al, 2014. Ethnobotany of medicinal plants among the communities of Alpine and Sub-alpine regions of Pakistan, *J. Ethnopharmacol.* 164: 186–202.
- Kaye P, Scott P, 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 9: 604-15.
- Keszei A, Brubaker CL, Foley WJ, 2008. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Aust J Bot.* 56:197–213.
- Khafagi I. Dewedar A., 2000. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. *J. Ethnopharmacol.* 71: 365-376.
- Khan UA, Shanholtz CB, McCurdy MT, et al, 2017. Oncologic Mechanical Emergencies. *Hematol Oncol Clin Am.* 31: 927-940.
- Khay EO, Bouyahya A, El Issaoui K, et al, 2016. Study of Synergy between *Mentha pulegium* Essential Oil, Honey and Bacteriocin-like Inhibitory Substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12. *Int. J.Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3: 29-35.
- Kim S H, Park E J, Lee CR., et al, 2012. Geraniol induces cooperative interaction of apoptosis and autophagy to elicit cell death in PC-3 prostate cancer cells. *Int J Oncol* 40: 1683–1690.

- Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, et al, 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem.* 13:54–60.
- Koechlin-Ramonatxo C, 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme.* 20 : 165–177.
- La Fontaine S, Nakamoto SS, Page MD, et al, 2002. Copper-dependent iron assimilation pathway in the model photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell.* 1: 736-57.
- Laciar A, Ruiz ML, Flores RC, et al, 2009. Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Rev Argent Microbiol.* 41: 226-231.
- Laghmouchi Y, Belmehdi O, Bouyahya A, et al, 2017. Effect of temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum compactum*. *Biocat & Agric Biotech.* 10:156-160.
- Lagrouh F, Dakka N, Bakri Y, 2017. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de mycologie médicale.* 27, 303-311.
- Lahlou M, 2013. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacol Pharmacy .* 4: 17-31.
- Lamaison, J.L.C. and Carnet, A. (1990) Teneurs en Principaux Flavonoides des fleurs de *Crataegus Monogyna* Jacq et de *Crataegus Laevigata* (Poiret D. C) en Fonction de la Vegetation. *Pharmaceutica Acta Helvetia*, 65, 315-320.
- Lee JH, Park JH, Cho HS, et al, 2013. Antibiofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling.* 29:491–499.
- Leopoldini M, Morono T, Russo N, et al, 2004. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *J. Phys. Chem A.* 108: 4916-4922.
- Levy SB, 1992. Antibiotic resistance, chapter in book: The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle. Plenum Press, New York, p: 67-103
- Li F, Rajendran P, Sethi G, 2010. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *British Journal of Pharmacol.* 161: 541–554
- Li L, Song X, Jia R, et al, 2016. The antibacterial activity and action mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis in vitro*. *Microbiol Res.* 186-187:139-45.
- Liang WZ, Lu CH, 2012. Carvacrol-induced [Ca²⁺] rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sci.* 90: 703–11.
- Liebert CA, Hall RM, Summers AO, 1999. *Transposon Tn21, flagship of the floating genome*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 507-522.
- Lin J, Yao DM, Qian J, et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* 2012;91(4):519-525.
- Liu J, Zhang Y, Qu J, et al (2011). β -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. *BMC Cancer* 11: 183.
- Luciardi MC, Blázquez MA, Cartagena E, et al, 2016. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT-Food Science and Technology.* 68: 373-380.
- Luengo A, Gui DY, Heiden MGV, 2017. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. 24: 1161-1180.
- Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, et al, 2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedensis*.47: 119-125.
- Luís A, Duarte A, Gominho J, et al, 2016. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products.* 79: 274-282.
- Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsini RV, et al, 2010. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sci* 86: 936–941.
- Mann CM, Markham JL, 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol.* 84: 538-544.

- Mans DR, da Rocha AB, Schwartzmann G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 2000; 5: 185-98.
- Marchese A, Orhan IE, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi O, Nabavi SM. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 210, 402-216.
- Marmouzi I, Kaddafi A, Harhar H, et al, 2016. Functional composition, antibacterial and antioxidative properties of oil and phenolics from Moroccan *Pennisetum glaucum* seeds. *J Sau Soc Agri Sci.* 6: 305-10.
- Marshall BM, Ochieng DJ, Levy SB (2009) Commensals: unappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe.* 4:231-238.
- Mathesius U, Mulders S, Gao M, 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 1444-1449.
- Mayer J, Murray SL, Berger DK, 2017. Signals that stop the rot: Regulation of secondary metabolite defences in cereals. *Physiol Molec Plant Pathol.* 92: 156-166.
- McDowell MA, Sacks DL, 1999. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. *Current opinion in microbiology* 2: 438-43.
- McGwire BS, Chang KP, Engman DM, 2003. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and immunity* . 71: 1008-10.
- Meissner U, Juttner S, Rollinghoff M, et al, 2002. mediated killing of *Leishmania major* by macrophages is independent of reactive nitrogen and endogenous TNF-alpha and is not inhibited by IL-10 and 13. *Parasitol Res.* 89: 221-7.
- Merghoub N, Benbacer L, Amzazi S, et al, 2009. Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines. *J Med Plan Res.* 3: 1045-1050.
- Merghoub N, Benbacer L, El Btaouri H, et al, 2011. *in vitro* antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Cell Mol Biol.* 57: 1581-1591.
- Merghoub N, El Btaouri H, Benbacer L, et al, 2016. *Inula Viscosa* Extracts Induces Telomere Shortening and Apoptosis in Cancer Cells and Overcome Drug Resistance. *Nutrition Cancer* 68: 131-143.
- Merghoub N, El Btaouri H, Benbacer L, et al, 2017. Tomentosin Induces Telomere Shortening and Caspase-Dependant Apoptosis in Cervical Cancer Cells. *J Cell Biochem.* 118: 1689-1698.
- Merzouki A, Ed-derfoufi F, Molero-Mesa J, 2003. Contribution to the knowledge of rifian traditional medicine III: phytotherapy of diabetes in chefchaouen province (North of Morocco), *Ars. Pharmaceutica.* 44: 59-67.
- Merzouki A, Ed-derfoufi, Molero Mesa FJ, 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district NW Morocco, *Fitoterapia.* 21: 278-307.
- Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, et al, 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Muta Res.* 629: 100-110.
- Mideo N, Nelson WA, Reece SE, 2011. Bridging scales in the evolution of infectious disease life histories: application. *Evolution.* 65: 3298-3310.
- Miller DM, Thomas SD, Islam A, et al, 2012. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 18: 5546-53.
- Mkaddem M, Boussaid M, Ben Fadhel N, 2007. Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). *J Essent Oil Res* 19 211-214.
- Moroccan Ministry of Health, 2013. A report on progress of control programs against parasitic diseases. Rabat: Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health.
- Musa, M.S. Abdelrasool FE, Elsheikh EA, et al, 2011. Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, Southeastern Sudan, *J. Med. Plant Res.* 5: 4287-4297.

- Musk DJ, Hergenrother PJ, 2006. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: Effective compounds and promising targets. *Current Medicinal Chemistry*. 13: 2163-2177.
- Myszka K, Schmidt MT, Majcher M, et al, 2016. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 114: 252-259.
- Nagata S, 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365.
- Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, 2004. Susceptibility of methicilin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Letter*. 230 : 191-195.
- Nozais JP, Datry A, Danis M, 1996. *Traité de parasitologie médicale*, Editions Pradel, Paris.
- O'Toole G, Kolter R, 2002. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. 28: 449-461.
- Oke JM, Hamburger MO, 2002. Screening of some nigarian medicinal plants for antioxidant activity using 2,2-diphenyl-picryl-hydrazyl radical. *Afr J Biomed Res*. 5: 77-79.
- Olivero J, Pajaro N, Stashenko E, 2011. Anti-quorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus *Piper*. *Vitae*. 18: 77-82.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G, 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical microbiology reviews*. 18: 293-305.
- Ong TP, Heidor R, De Conti A, et al, 2006. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis*. 27: 1194-1203.
- Orch H, Zidane L, Douira A, 2017. Ethnobotanical study of the plants used in the treatment of the digestive diseases by the riverine population of the forest of Izarène. *Int J Recent Sci Res*. 8: 15213-19.
- Ouedrhiri W, Balouiri M, Bouhdid S, et al, 2016. Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. *Ind. Crops Prod*. 89: 1-9.
- Ouhaddou H, Boubaker H, Msanda F, et al, 2014. An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants of the Agadir Ida Ou Tanane Province (Southwest Morocco). *Journal of Applied Bioscience*. 84: 7707-7722.
- Oyaizu M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japn. J. Nutri*. 44: 307-315.
- Palumbi SR, 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 293:1786-1790.
- Park K R, Nam D, Yun HM, 2011. β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Lett* 312: 178-88.
- Pascussi JM, Giraud J, Samalin E, et al, 2016. Bases fondamentales du processus métastatique. *Bulletin du Cancer*. 103 : 39-47.
- Pengelly A, 2004. *The constituents of medicinal plants*. 2nd ed, Allen & Unwin, Sydney, Australia
- Petrovs BB, 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev*. 6: 1-5.
- Pieroni A, 2002. Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbëreshë) of northern Basilicata, Italy. *Fitoterapia*. 73: 217-241.
- Pinder AR, 1960. *The chemistry of terpenes*. Chapman & Hall London, New York
- Porter WL, 1993. Paradoxal behavior of antioxidants in food and biological systems. In: *antioxidants: chemical, physiological, nutritional and toxicological aspects*: Wiliam, GM, ed: Princeton Scientific, Princeton, 9: 23-1222.
- Prudhomme J, G unay F, Rahola N, et al, 2012. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. *J Vector Ecol*. 37: 137-147.

- Rahmé R, Esnault C, de Thè H, 2017. Arsenic Overcomes Retinoic Acid-Resistance Conferred by FLT3-ITD in a Mouse Model of Acute Promyelocytic Leukemia (APL). *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*.17: 271-272.
- Rajput, S, Kumar BN, Dey KK, et al, 2013. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sciences*. 93: 783-790.
- Ramaoui K, Guernaoui S, Boumezzough A, 2008. Entomological and epidemiological study of a new focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Parasitol Res* .103: 859-863.
- Rangasamy K, Athiappan M, Devarajan N, 2017. Emergence of multi drug resistance among soil bacteria exposing to insecticides. *Microbial Pathog*. 105, 153-165.
- Rasamiravaka T, El Jaziri M, 2016. Quorum-Sensing Mechanisms and Bacterial Response to Antibiotics in *P. aeruginosa*. *Curr Microbiol*. 73: 747-753.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, et al, 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 56:3-12.
- Raut JS, Karuppayil SM, 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Indus Crop Prod*. 62: 250-264.
- Ray S, Majunder HK, Chakravarty AK, et al, 1996. Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from *Leishmania donovani* . *Nat. Prod*. 59: 27.
- Reading NC, Sperandio V, 2006. Quorum sensing: The many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 254: 1-11.
- Remmal A, Tantaoui-Elaraki A, Bouchikhi T, et al, 1993. improve method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Ess Oils Res*. 5: 179-184.
- Renaudineau Y, Devauchelle-Pensec V, Hanrotel C, et al, 2009. Mécanismes de l'action des anticorps monoclonaux anti-CD20 et surveillance biologique de leurs effets. *Revue du Rhumatisme*. 76 : 826-832.
- Rhajaoui M, 2011. Human leishmaniasis in Morocco: a nosogeographical diversity. *Pathol Biol (Paris)*. 59: 226-9.
- Rhajaoui M, Nasereddin A, Fellah H, 2007. New Clinico-epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis, Morocco. *Emerg Infect Dis*. 13: 1358-60.
- Rhajaoui M, Sebti F, Fellah H, et al, 2012. Identification of the causative agent of cutaneous leishmaniasis in Chichaoua Province, Morocco. *Parasite* 19: 81-84.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, et al, 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radi Resea*. 22: 375-83.
- Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R, 2016. Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol*. 1304:53-61.
- Rioux JA, Lanotte G, Maazoun R, 1980. *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, the agent of the autochthonous oriental sore. Apropos of the biochemical identification of 2 strains isolated in the eastern Pyrenees. *C R Seances Acad Sci D*. 291: 701-3.
- Rioux JA, Lanotte G, Petter F, et al, 1986. Les leishmanioses cutanees du bassin Mediterranéen occidental. De l'identification enzymatique a l'analyse eco-epidemiologique. L'exemple de trois foyers, tunisien, marocain et francais. L'Institut Mediterranéen d'Etudes Epidemiologiques et Ecologiques (IMEEE), Montpellier. p. 365-95.
- Rioux JA, Mahjour J, Gallego M, et al, 1996, Leishmaniose cutanee humaine a *Leishmania infantum* Mon 24 au Maroc. *Bull Soc Fran Parasito*. 14: 2.
- Robert B, 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Med Sci*. 22 : 266-72.
- Rochette L, Zaller M, Cottin Y. 2014. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Bioch. Biophys. Acta*.1840: 2709-2729.

- Rokaya MB, Z. Münzbergová, B. Timsina, Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal, *J Ethnopharmacol.* 130 (2010) 485-504.
- Rowan NJ, 2004. Viable but nonculturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis ? *Trends Food Sci. Technol.* 15, 462-467.
- Rowe SE, Conlon BP, Keren L, et al, 2016. Persisters: Methods for Isolation and Identifying Contributing Factors--A Review. *Methods Mol Biol.* 1333: 17-28.
- Ruzicka L, 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Cell Mol Life Sci* 9:357-67.
- Sa G, Das T, 2008. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div*, 3: 14.
- Santoyo S, Cavero S, Jaime L, et al, 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J Food Prot.* 68:790-5.
- Satooka H, Kubo I, 2012. Effects of thymol on B16-F10 melanoma cells. *J Agric Food Chem.* 60: 2746-2752.
- Sbayou, H., Boumaza, A., Hilali, et al, 2016. Antioxidant properties of *Artemisia herba-alba* Asso., *Mentha pulegium* L. and *Origanum compactum* Benth. Essential oils. *J. Mater. Environ. Sci.* 7: 2908-2912.
- Schlagenhauf E, Etges R, Metcalf P, 1993. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure* (London, England : 1993) 1998: 1035-46.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G, 2007. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 7: 295-308.
- Schuler P, 1990. Natural Antioxidants Exploited Commercially. In *Food Antioxidants*. Hudson BJB (ed.). Elsevier, London, pp. 99-170.
- Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB, 2008. Targeting nuclear factor- κ B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Molecular Cancer Research.* 6: 1059-1070.
- Sijelmassi A, 2003. *Les plantes médicinales du Maroc*, Edition Fenugrec, Casablanca, 285 pp.
- Simões ER, Santos EA, de Abreu MC, et al, 2015. Biomedical properties and potentiality of *Lippia microphylla* Cham. and its essential oils. *J Intercult Ethnopharmacol.* 4: 256-263.
- Singleton VL, Rossi JA, 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*, 16: 144-158.
- Sommer MOA, Dantas G, Church GM, 2009. *Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora*. *Science.* 325:1128-1131.
- Soobratte MA, Needghen VS, Luximon-Ramma A, et al, 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mut Res Fund Mol Mech Mutag.* 579: 200-213.
- Soosaraei M, Fakhar M, Teshnizi SH, et al, 2017. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery.* 21: 63-80.
- Springman AC, Lacher DW, Milton GWN, et al, 2009. *Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes*. *J Bacteriol.* 191: 5419-5427.
- Stagos D, Portesis N, Spanou C, et al, 2012. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology.* 50: 4115-4124.
- Suhaj M, 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J Food Comp Anal.* 19: 531-537.
- Sutterwala FS, Mosser DM, 1999. The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. *Journal of leukocyte biology.* 65: 543-51.
- Swinnen IA, Bernarts K, Dens EJ, Geeraerd AH, Van Impe JF, 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *Int J Food Microbiol.* 94: 137-159.
- Szabo MA, Hohmann GZ, Schelz J, 2003. Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytother Res.* 24: 782-786.
- Tabuti J, S.S. Dhillon, K. Lye, 2003. Traditional medicine in Bulamogi County, Uganda: its practitioners, uses and viability, *J. Ethnopharmacol.* 85: 119-129.

- Taganna J, Quanico J, Perono R, et al, 2011. Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilms maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*. J Ethnopharmacol. 134: 865-871.
- Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, 2007. B. Lyoussi, Ethnobotanical survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province), J Ethnopharmacol. 110: 105-117.
- Takebayashi J, Chen J, Tai A. 2010. A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. Methods Mol Biol. 594: 287-96.
- Talbaoui A, El Hamdaoui L, El Moussaouiti M, et al, 2016., GC-MS analysis and antibacterial activity of hydro-distillation oil from *Tetraclinis articulata* wood grown in Khemisset (Morocco), J. Indian Acad. Wood Sci. <http://dx.doi.org/10.1007/s13196-016-0173-7>.
- Talbaoui A, Jamaly N, Aneb M, 2012. Idrissi A, Bouksaim M, Gmouh S, Amzazi S, El Moussaouiti M, Benjouad A and Bakri Y. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. J M Plan Res. 6: 4593-4600.
- Tallman MS, 2008. What is the role of arsenic in newly diagnosed APL ? Best Practice Res Clin Haematog. 21: 659-666.
- Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, et al, 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem. 104: 1372-1378.
- Teixidor-Toneu I, Martin GJ, A. Ouhammou A, 2016. An ethnomedicinal survey of a Tashelhit-speaking community in the High Atlas, Morocco, J. Ethnopharmacol. 188: 96-110.
- Teklehaymanot T, 2009. Ethnobotanical study of knowledge and medicinal plants use by the people in Dek Island in Ethiopia, J Ethnopharmacol. 124: 69-78.
- Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnel CP, 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. J. Agric Food Chem 57: 5987-6000.
- Topc G, Goren AC, Bilsel G, et al, 2005. Cytotoxic activity and essential oil composition of leaves and berries of *Juniperus excelsa*. Pharm. Biol. 43: 125-128.
- Trosko JE, 2016. Evolution of Microbial Quorum Sensing to Human Global Quorum Sensing: An Insight into How Gap Junctional Intercellular Communication Might Be Linked to the Global Metabolic Disease Crisis. Biology (Basel) 5: 29. doi: 10.3390/biology5020029.
- Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, 2009. *In vitro* cytotoxic effects of *Senecio stabianus* Lacaita (Asteraceae) on human cancer cell lines. Natural Products Research. 23: 1707-1718.
- Turgis M, Han J, Caillet S, et al, 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. Food Control. 20:1073-1079.
- Turkmen N, Sari F, Velioglu YS, 2006. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. Food Chemistry. 99: 838-841.
- Turner M, 2011. *E. coli* outbreak caused by previously unknown strain. Nature. doi:10.1038/news.2011.345.
- Van Zandbergen K, Klinger G, Mueller M, 2004. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J. Immunol. 173: 6521-5.
- Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, et al, 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. Fitoterapia. 78: 302-310.
- Vélez-Cruz R, Johnson DG, 2017. The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts. Int J Mol Sci. 18, doi: 10.3390/ijms18081776.
- Vernieri C, Nichetti F, Raimondi A, 2018. Diet and supplements in cancer prevention and treatment: Clinical evidences and future perspectives. Crit Rev Oncol Hematol. 123, 57-73.
- Vidhya N, Devaraj SN, 2011. Induction of apoptosis by eugenol in human breast cancer cells. Indian J Exp Biol. 49: 871-878.

- Viju N, Satheesh S, Vincent S, 2013. Antibiofilm activity of coconut (*Cocos nucifera* Linn.) husk fibre extract. *Saudi J Biol Sci.* 20: 85-91.
- Villar-Garea A, Esteller M, 2003. DNA demethylating agents and chromatin-remodelling drugs: which, how and why. *Curr Drug Metab.* 4: 11-31.
- Vitalini S, Iriti M, Puricelli C, 2013. Traditional knowledge on medicinal and food plants used in Val San Giacomo (Sondrio, Italy)-An alpine ethnobotanical study, *Journal of Ethnopharmacology.* 145:517-529.
- Vriet C, Hennig L, C. Laloi, 2015. Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement, *Cell Mol. Life Sci.* 72: 1261-1273.
- Waglechner N, Wright GD, 2017. Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse? *BMC Biol.* 15, 84.
- Wall ME, Wani MC, 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J. Ethnopharmacol.* 51, 239-254.
- Wang W, Li N, Zu Y, et al, 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules.* 17: 2704-2713.
- Wansi JD, Chiozem DD, Tcho AT, Devkota KP, Ndjakou BL, Wandji J, Sewald N. 2010. Antimicrobial and antioxidant effects of phenolic constituents from *Klainedoxa gabonensis*. *Pharm Biol*, 48:1124-9.
- Want MY, Yadav P, Afrin F, 2016. Nanomedicines for Therapy of Visceral Leishmaniasis. *J Nanosci Nanotechnol.* 16: 2143-2151.
- Waris G, H. Ahsan H, 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J. Carcinogen.* 5: 14.
- Weinberg RA: Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989, 49:3713-3721.
- White DG, Alekshun MN, McDermott PF, 2005. *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart BLevy.* ASM Press, Washington, DC
- Wilken R, Veena MS, Wang MB, 2011. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 10: 12.
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization.
- Wu WS., 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 695-705.
- Wu X, Cheng J, Wang X, 2017. Dietary Antioxidants: Potential Anticancer Agents. *Nutr Cancer.* 69, 521-533.
- Xu GM, 2016. Relationships between the Regulatory Systems of Quorum Sensing and Multidrug Resistance. *Front Microbiol.* 7: 958.
- Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N, 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 47: 174-9.
- Yaseen G, Ahmad M, Sultana S, et al, 2015. Ethnobotany of medicinal plants in the thar desert (Sindh) of Pakistan, *J. Ethnopharmacol.* 63: 43-59.
- Yazan LS, K.Ng W, Al-Naqeeb G, et al, 2009. Cytotoxicity of thymoquinone (TQ) from *Nigella sativa* towards human cervical carcinoma cells (HeLa). *Journal of Pharmacy Research.* 2: 585-589.
- Yin QH, Yan FX, Zu XY, et al, 2012. Anti-proliferative and pro apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnol.* 64: 43-51
- Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Hayyan A, 2017. Anti-inflammatory phenylpropanoids and phenolics from *Ficus hirta* Vahl. *Fitoterapia.* 121: 229-234.
- Zainol MK, Abd-Hamid A, Yusof S, 2003. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Food Chemistry.* 81: 575-581.
- Zhai L, Blom J, Brogger Chrinstensen S, 1995. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *A. Antimicrob. Agents Chemotherap.* 39: 2742.

- Zhang YB, Liu XY, Wang YF, et al, 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Food Control. 59: 282-289.
- Zhong Z, Chen X, Tan W, et al, 2011. Germacrone inhibits the proliferation of breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest and promoting apoptosis. Europ Journal Pharmacology 667: 50-55.
- Zhou D, Wang DM, Yang LN, et al, 2015. A Modified and Improved Assay Based on Microbial Test System (MTS) to Evaluate Antioxidant Activity. Food Anal. Methods. DOI 10.1007/s12161-015-0266-8.
- Zhou L, Elias RJ, 2012. Factors influencing the antioxidant and pro-oxidant activity of polyphenols in oil-in-water emulsions. J Agric Food Chem. 60: 2906-15.
- Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H , 1997. A. Dassouli, M. Serhrouchni, W. Benjelloun, Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, J Ethnopharmacology. 45: 45-54.
- Zogli P, Libault M, 2017. Plant response to biotic stress: Is there a common epigenetic response during plant-pathogenic and symbiotic interactions? Plant Science. 263: 89-93.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Milieu Luria-Broth (LB)

Tryptone	10.0 g/L
Extrait de levure	5.0 g/L
NaCl	10.0 g/L
pH final 7,0	

Gélose Mueller-Hinton (Mueller-Hinton Agar, MHA)

Infusion de viande bovine	2.5 g/L
Hydrolysate acide de caséine	17.5 g/L
Amidon soluble	1.5 g/L
pH final 7,0	

Plate Count Agar(PCA)

Peptone pancréatique de caséine	5.0 g/L
Extrait de levure déshydraté	2,5 g/L
Glucose anhydre	1.0 g/L
Agar	15.0 g/L
pH final 7,0	

Bouillon cœur cerveau (Brain-Heart infusion, BHI)

Extrait de cerveau de veau	12.5 g/L
Extrait de cœur de veau	5.0 g/L
Peptone	10.0 g/L
Dextrose	2.0 g/L
Chlorure de sodium	5.0 g/L
Phosphate di-sodique	2.5 g/L
pH final 7,0	

Modified Eagle's Medium (MEM)

MEM Eagle's salt	500 mL
SVF 10%	50 mL
Pénicilline-Streptomycine	10 mL
Hèpès	5 mL
L-Glutamine	5 mL

Annexe 2: **1)** *Origanum compactum* (Benth), **2)** *Lavandula stoechas* (L), **3)** *Ajuga iva* (L.) Schreb, **4)** *Mentha pulegium* (L), **5)** *Salvia officinalis* (L), **6)** *Mentha viridis* (L), **7)** *Rosmarinus officinalis* (L), **8)** *Eucalyptus globulus* L, **9)** *Myrtus communis* (L), **10)** *Arbutus unedo* L, **11)** *Cistus monspeliensis* L, **12)** *Cistus albidus* (L), **13)** *Centaureum erythraea* (Raf), **14)** *Cistus crispus* L, **15)** *Daphne gnidium* (L).





Research paper

Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities

Abdelhakim Bouyahya^{a,b,*}, Jamal Abrini^b, Abdeslam Et-Touys^a, Youssef Bakri^a, Nadia Dakka^a^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, and Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco^b Biology and health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Ethnobotanical survey
Ouezzane
Morocco
Medicinal plants
Informant consensus factor
Antioxidant activity
Antibacterial activity

ABSTRACT

Introduction: This study is the first ethnopharmacological survey that investigates the traditional uses of medicinal plants in the province of Ouezzane (North-West of Morocco) as well as the indigenous knowledge related to the use of this natural resource in healthcare by the local population in order to preserve and protect this invaluable inheritance. We aimed also to reveal the *in vitro* pharmacological activities of some reported medicinal plants in this study.

Methods: In the survey, 113 informants (local inhabitants and herbalists) were interviewed using the semi-structured and unstructured methods and using a stratified sampling technique. Data collected were analyzed calculating three quantitative parameters: Use Value (UV), Fidelity Level (FL) and Informant Consensus Factor (ICF). Pharmacological properties of some reported medicinal plants were evaluated. The antioxidant activity was estimated by the DPPH radical scavenging assay and the antibacterial activity was evaluated using agar well diffusion assay and microtitration method.

Results: The results showed that 11% of the local population use traditional medicine, against 67% who use both traditional and modern medicine. The ethnomedicinal uses of 44 medicinal species representing 28 families were reported on. Lamiaceae were the most representative and include 32% of the identified species. The medicinal use revealed that leaves are the most used part of plants to prepare drugs, the decoction is the most widely used preparation method and remedies are often administered orally. The highest value of MUV was obtained for *Origanum compactum* Benth. (MUV = 0.62) and *Myrtus communis* L. (MUV = 0.52). In addition, the highest value of FL was recorded for *Origanum compactum* Benth. (100%), *Myrtus communis* L. (93.50%) and *Arbutus unedo* L. (93.50%). While, the highest value of ICF was mentioned for respiratory system diseases (ICF = 0.69), dermatocosmetology (ICF = 0.68), digestive system problems (ICF = 0.63) and nervous system disorders (ICF = 0.69). Plant extracts and essential oils showed important antibacterial properties against pathogenic strains and significant antioxidant capacities.

Conclusions: The ethnopharmacological data documented in this work revealed the use of medicinal plants in North-West of Morocco to fight against diseases. Therefore, efforts are needed for improving the level of the documentation, the conservation and standardisation of these species, and to preserve the transmission of traditional healing knowledge. Also, further studies testing other plant extracts in other pharmacological systems are needed to explore the scientific biological potential of these plants.

1. Introduction

Humans have always sought to use the plants in order to survive and to develop remedies to treat disease. The term ethnobotany was introduced by John Harshburger (an American botanist) in 1896. Although, the definition of this discipline has changed it now reflects the way in which people know the plants and their diversities in their localities as well as all the ancestral knowledge about them [1].

Medicinal plants are mostly used to prepare drugs used for the treatment against several diseases [2–4]. Moreover, ethnobotanical approaches reveal the importance of medicinal species within the local socio-cultural context. In fact, these studies may furthermore support the socioeconomic conditions of the region, preserve the indigenous knowledge of the local communities, and conserve its global heritage [5].

Medicinal plants are commonly used as remedies in developing countries. In Africa for example, more than 80% of the populations

* Corresponding author at: Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av. Ibn battouta, BP1014 Rabat, Morocco.
E-mail address: boyahyaa-90@hotmail.fr (A. Bouyahya).

depend on traditional medicines for their medication [6,4]. Similarly, the African continent is rich in diverse of plant species, most of which are used as medicines. Indeed, among 300.000 plant species found on the planet, more than 200,000 species are found live in tropical Africa and have medicinal properties. Morocco is characterised by having a good geographical position which has allowed it to be a veritable area of plants diversity [7,8]. Morocco as a Mediterranean country has a long traditional medicine and knowledge of medicinal plants. Effectively, amongst 5000 species and subspecies listed in North Africa, 4200 species grow in Morocco, which at least 500 are potentially medicinal and 250 are already being used [9].

Herbal medicine is an important cultural tradition in Morocco [10] and plays a central role in the daily life of many rural and urban Moroccans [11–17]. Ethnopharmacological studies conducted across Morocco showed that studies for medicinal plants nationwide remain fragmented. Besides, the expertise is currently held only by few people [18,19]. The natural species in Morocco are currently experiencing a very intense and thorough degradation; because of the intensive exploitation of these species for medical needs. Indeed, almost all of the medicinal and aromatic species used in Morocco come from wild sources, medicinal plant cultivation remain relatively limited, thus, the exploitation of these species in Morocco is far from rational. Several studies conducted in various Moroccan areas revealed that the traditional applications of Moroccan medicinal plants [10,20–22,14,16,13] have scientifically studied the traditional pharmacopoeia in Morocco.

The ethnobotanical local knowledge from several regions of Morocco, particularly in the North, still remains poor [21,23]. This is the case for medicinal plant knowledge in the region of Ouezzane (North-West of Morocco). On the other hand, the understanding of the traditional local uses of plants may offer social, economical and public health implications in this region [23]. Indeed, the documentation of the extent of reliance on medicinal plants is very important because this traditional local knowledge of medicinal plants become in loss in developing countries like Morocco [17,24].

The province of Ouezzane (NW of Morocco) belongs to Tanger-Tetouan-Al Hoceima region of Morocco. It also belongs to the southern margins of the country Jbala whose great tribes are: Masmouda, Rhouna, Ghzaoua, Seta and Beni Mestara. It is surrounded by five other provinces: Larache, Kenitra, Sidi Kacem, Taounate and Chefchaouen (Fig. 1).

According to High Commission for Planning (2014), Kingdom of Morocco, The province of Ouezzane possesses an area of 2 km², a density of 140.4 in./km² and a population of 300.637 censuses. The economy of this province is mainly depending on natural resources,

especially the pastoral activity and arboriculture (e.g., Carob tree, Oliver and Fig tree). While, marketing of other natural resources like medicinal plants take secondary place in the local economy [25–27].

Furthermore, the province of Ouezzane (North-West of Morocco) has a particular climate with ecological zones and topographical regions that offer a good diversity of vegetation such as aromatic and medicinal species [25–27]. Moreover, different conditions have seriously depleted the indigenous knowledge of the local population of Ouezzane province such as deforestation, famines, and ignorance in the past regarding ethnobotanical documentation. There is not much data about traditional plants of the North-West of Morocco and some studies carried out by our team have started to evaluate the pharmacological properties of some medicinal plants [28–31].

This is the first ethnopharmacological survey that has been conducted for documenting and analyzing the traditional medicine in the Ouezzane province. This study was aimed to document the traditional use of North-West Moroccan medicinal plants and its associated knowledge. For analyzing the data and exploring significant findings, statistical parameters were used such as ICF, FL and MUV. Finally, *in vitro* antioxidant and antibacterial properties of some selected plant extracts and essential oils were evaluated.

2. Methods

2.1. Study area

The province of Ouezzane is a region that lies in the North-West of Morocco, in the pre-Rif, south of Wadi Loukkous. It is one of the biggest provinces of the Moroccan Tanger-Tetouan region. This area is located at 34°47'50" N and 5°34'56" W. The studied areas of Ouezzane province are characterized by having a high relief, acting as a constraint for its development. The climate is of Mediterranean type, particularly sub-humid according to the classification of EMBERGER. It is characterized by a dry summer with temperatures ranging between 19 °C and 32 °C and a cold winter with mild temperatures between 6 °C and 14 °C. The humidity index shows an annual average of 800 mm, unevenly distributed. Soils are different depending on the areas. In addition, soil erosion has increased due to man's activities, i.e. overgrazing and clearing the forests. Agriculture is considered as the principal economic sector in this province and their products constitute the main source of life for the population. These products are essentially based on the cereal-based subsistence farming, the livestock and the arboriculture, mainly olive (*Olea europaea* L.) and fig trees (*Ficus carica* L.).

The province of Ouezzane is characterized by a diversity of plant

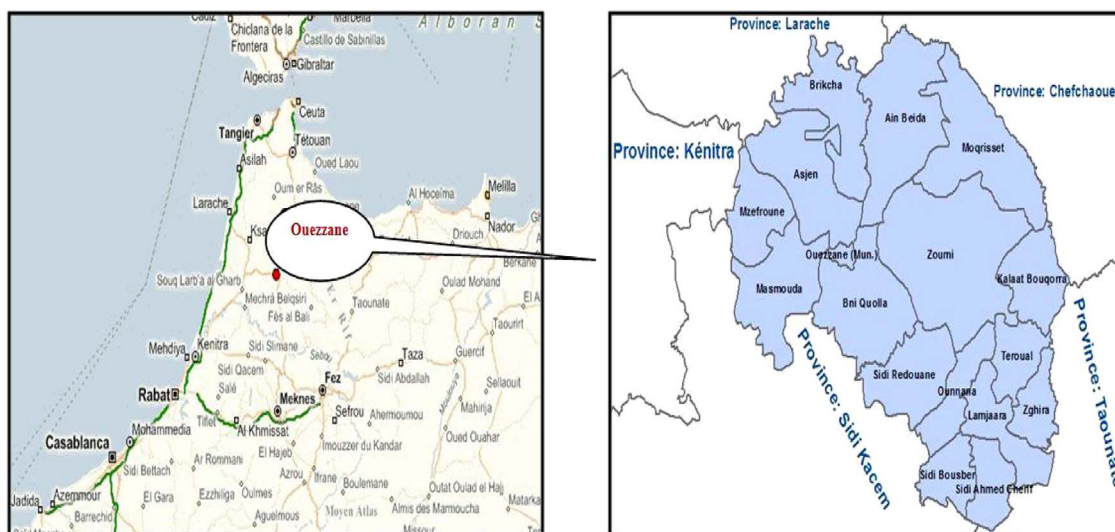


Fig. 1. Province of Ouezzane (North-West of Morocco).

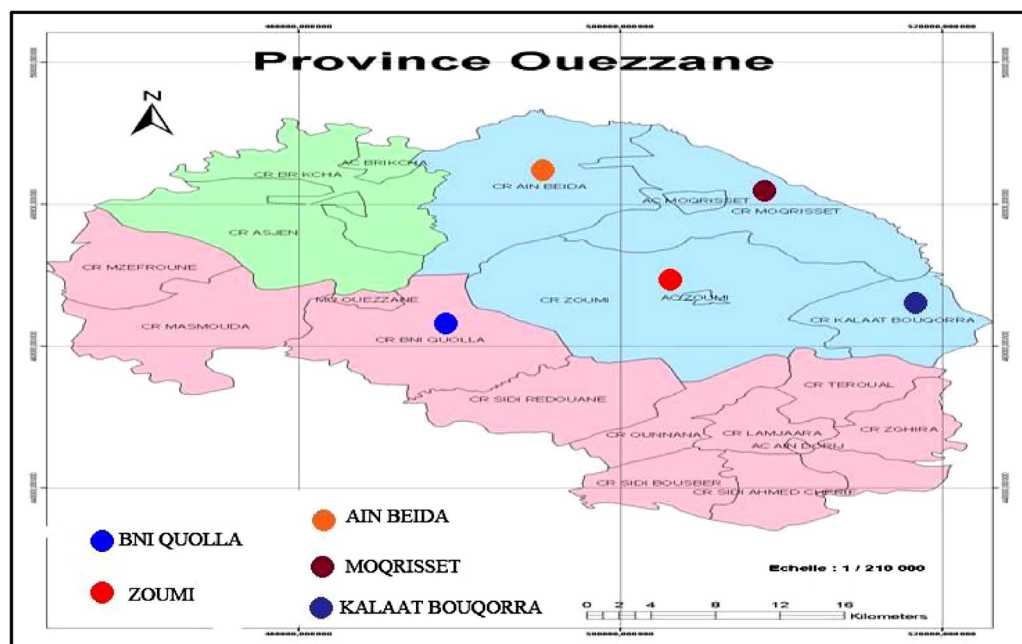


Fig. 2. Map represents the study area (Ouezzane province). The ethnopharmacological survey was carried out in five districts (Zoumi, Moukrisset, Ain beida, Kalaat Boukorra, Bni Quolla). Cycle on map represents the location areas of ethnobotanical survey.

genetic resources, climate and hydro-geographical characteristics. Its Mediterranean wet climate reflects the richness of the area with spontaneous and sometimes endemic medicinal plants. Therefore, it is one of many Moroccan rural regions remaining unexplored in terms of ethnobotanical research, even though it might have an important phytotherapeutic potential.

The ethnopharmacological survey was carried out in five districts, ZOUMI (34.797876N, –5.3472519W), MOKRISSET (34.921883, –5.353045), AIN BEIDA (35.018091, –5.526273), KALAAT BOUKORRA (34.7479952N –5.1995802W) and BNI QUOLLA (34.741734, –5.539904) from Ouezzane province (Fig. 2).

2.2. Data collection

In order to document local knowledge in terms of plants exploitation, we used a pre-established survey which had been used in other studies on plants used in Morocco, including medicinal plants [27,12,15,32,33]. Several field trips were carried out to compile ethnobotanical data on the uses of medicinal plants. The total duration of the field study was approximately 8 months, from January 2015 to August 2015. The method used for data collection was based on semi-structured interviews [15], group discussions, and field walks. A total of 113 informants, were interviewed. Interviews were conducted after obtaining an informed consent (IC) from the interviewees. Various techniques were used to selecting informants with traditional knowledge regarding the use of each medicinal plant [34]. The questionnaire used for collecting data had two main objectives. To begin with data about demographic informations of the local informants were collected. In the second part of the survey, information about medicinal plants used by informants was collected. These data concerned the local names of the plants, the parts used, the mode of preparation, the route of administration, the mode of utilization and the diseases treated.

2.3. Identification of medicinal plant species

During this study, identification of each plant was based on the local names of plants identified with the help of local knowledgeable informants. The cited plants have been collected and their taxonomic identification was carried out by Pr. Ennabili Abdessalam (PAMSN Laboratory, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fes-Morocco) and the confirmation

of some species was later made by means of the literature: Moroccan Flora' [35,36]; 'Vascular Flora of Morocco, Inventory and Chorology' [37], The traditional Moroccan pharmacopoeia [38], The healing plants of Morocco [39], Healing plants in the Maghreb and the basic care [40].

2.4. Quantitative data analysis

2.4.1. Informant consensus factor (ICF)

The ICF is mostly used to measure the agreement between informants and plants used for each disease [41]. In this study, the ICF was calculated as described by Kayani et al. [42] using the following formula:

$$ICF = (Nur - Nt) / (Nur - 1).$$

Where: **Nur** is the number of use reports for a particular use category and **Nt** is the number of taxa used for a particular use category by all informants

The ICF results range between 0 and 1, where low values (near 0) show that plants are either chosen randomly or there is no exchange of information about their use amongst informants. While high values (approaching 1) are obtained when there is a well-defined selection criterion in the community and/or if information is exchanged between informants.

2.5. Medicinal use value (MUV)

The MUV of reported species was calculated using the following formula [43]:

$$MUV = U/n$$

MUV: the medicinal use value of species,

U: the total number of use reports per species,

n: the total number of informants interrogated for a given plant.

The MUV value will be higher if there are many use reports for a plant, implying that the plant is important, whereas they will be near zero if there are few reports related to its use [34].

2.6. Fidelity level (FL)

The FL is used to treat a particular disease. It reflects the degree of the preference for one species over others [44]. It is calculated using the

following formula [34]:

$$FL = Ip/Iu \times 100$$

Where

Ip is the number of informants stating the use of a species for a particular ailment category

Iu is the number of informants stating the use of that plant for any ailment category.

High values of FL (near 100%) are obtained from plants for which almost all use reports mentioned using it in nearly the same way, whereas low FL values are obtained from plants that are used for many different purposes. Similarly, the high FL confirms high usage of the plant species for a particular ailment, whereas low FL confirms a wide range of medicinal uses but with a low frequency for each ailment [34].

2.7. Identification of new medicinal plant citations and pharmacological property

A literature search was carried out in order to identify new citations and uses for medicinal plants in Morocco and pharmacological properties of all plants around the world. The searches were carried out using various databases, including PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), Science Direct (<http://www.sciencedirect.com/>), Scopus (<http://www.scopus.com/>) and Google Scholar (<http://www.scholar.google.com/>).

2.8. Phenol content and in vitro pharmacological properties of some reported medicinal plants

Some of reported medicinal plants have been collected, air dried and extracted. Extracts and essential oils from these plants have been tested for their antioxidant and antibacterial activities.

2.9. Determination of total phenolic content

The concentration of the phenolic in the plant extracts was determined using the Folin Ciocalteu assay. The results were expressed as the gallic acid equivalent/per gram of extract (mg of GAE/g of extract) [29–31].

2.10. Determination of total flavonoids content

The total flavonoid content of the extracts was determined using the aluminium chloride assay. The results were expressed as the quercetin equivalent per gram of extract (mg of QE/g of extract) [29–31].

2.11. In vitro biological activities

2.11.1. Antioxidant activity

The antibacterial activity of plant extracts was carried out using DPPH assay as described by our several studies [30].

2.11.2. Antibacterial activity

The screening of the antibacterial activity of plants extracts and essential oils was evaluated against several photogenic bacteria using agar well diffusion assay [29,31]. The minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration were determined using the microtitration assay [31].

3. Results and discussion

3.1. Ethno-demographic characteristics of participants

The informant is a central element in the ethnobotanical survey. Therefore, a better understanding of informants ensures good and

Table 1

Demographic data of participants in the North-West of Morocco.

Specifications	Numbers	(%)
●Users of traditional medicine	11	9.73
●Users of modern medicine	41	36.28
●Users of traditional and modern medicine	61	53.98
Ages		
●18–33 years	19	16.81
●33–45 years	24	21.23
●45–60 years	33	29.20
● > 60 years	37	32.74
Sex		
●Female	86	76.10
●Male	27	23.89
Education level		
●Illiterate	27	23.89
●Primary	29	25.66
●Secondary	35	30.97
●University	22	19.46

reliable study. Consequently, collecting sociodemographic information (age, gender, study level,) about participants is very useful in such investigations and this factor plays an important role in order to analyze and interpret responses obtained. Table 1 illustrates the general profile of the respondents. In the present survey, 113 persons were questioned; ten percent (10%) use only the phytotherapy and two medicines at the same time (54%) giving a cumulative percentage of 73%. These results proved that the phytotherapy has always been practiced by the population of Ouezzane province. The reasons of medicinal plant use can be due to the lowest cost of these natural remedies compared to modern medicine. The most informants declared that the most reported medicinal plants are used in the past than new. Results are due to the different factors influencing spontaneous vegetation such as degradation, deforestation, and acculturation.

The loss of some species may be related to the associated knowledge of some people. For example, an informant reported that a species (the name of the plant is not given) has been lost because of the problem of the deforestation in this area. This plant had been used to treat fever. Another problem that participates in the disappearance of this traditional knowledge is the lack of passage of this science from generation to the next generation. In our study several informants have declared that this transmission is not properly passed between generations because the healers want mostly to keep their knowledge secret. Indeed, some informants remembered that some of the holders kept their knowledge secret and died without giving any information about some medicinal plants which were used to treat snakebites.

Examination of the results (Table 1) shows that women use more phytotherapy (76.10%) than men (23.89%), reflecting a clear trend towards valuing the work of women. These results confirm those obtained by several Moroccan ethnobotanical surveys [45–48]. Indeed, women are more interested in preparing the drugs for themselves and their children. While, men are rather busy working out of the house to support the family. These results show that this traditional knowledge was and will be mostly transmitted by women. In fact, several hypotheses may be involved to give an interpretation of this result: the relative frequency of analphabetism of women in the society, the attachment of the women to traditional knowledge [43] and the possibility that women were most often at home during the hours of the survey [14]. Our results are in agreement with previous studies carried out in other Moroccan areas that revealed that there were more women compared to men with knowledge of traditional medicine [17,16,24].

Regarding the educational level and living standards, nearly 23.89% of the interviewees were illiterate. Poverty remains widespread among the studied population. These data are comparable to the results of official reports made by the High Commissioner to the Moroccan state plan on the study area.

Table 2
Ethnopharmacological data on medicinal plants used in Ouezane province.

Scientific name	Vernacular name	Part used	Mode of preparation, route of administration and main diseases	FL	UV	FC	Recorded literature thnomedicinal uses inside in Morocco	Pharmacological properties
<i>Origanum compactum</i> Benth. (Lamiaceae, RAB01)	Za'ar	Leaf Flowering top	The decoction is used orally against stomach disorders and febrifuge	100	0.62	92	Diabetes [51] Pathologies of the digestive system, cold problems and diabetes [13] Rheumatism and asthma [51]	Antioxidant and antibacterial activities [52] Antiproliferative effect [53] Antimutagenic effect [54] Antibacterial activity [29]
<i>Lavandula stoechas</i> L. (Lamiaceae, RAB02)	Halhal	Flowering top	The decoction is used orally against digestive disorders	83.92	0.43	47	Rheumatism and digestive system [12] Pathologies of the digestive system and diabetes [13] Rheumatism, allergy and cancer [51] Narcotic [12] Cardiovascular diseases, pathologies of the digestive system and pathologies of the respiratory system [13] Cold, respiratory canals [12] Pathologies of the digestive system, cold problems and pathologies of the respiratory system [13]	Antibacterial activity [29] Antihyperglycemic activity [55,56] Antioxidant and antimicrobial activities [57] Antioxidant and antimutagenic activities [58]
<i>Ajuga iva</i> (L.) Schreb. (Lamiaceae, RAB03)	Chandgora	Leaf	The decoction is used orally against metabolic disorders	87.29	0.30	43	Cardiac disease, hypertension and diabetes [11] Asthma and inflammation [51] Chill, rheumatism, cough [12] Diabetes, cardiovascular diseases and pathologies of the digestive system [13] Cold, system digestive [12] Pathologies of the urinary system, pathologies of the respiratory system and dermatocosmetology [13] Allergy, cardiovascular diseases and pathologies of the urinary system [13] Against mosquito, sinusitis and tachycardia [10]	Antioxidant, antibacterial and anti-leishmanial activities [59]
<i>Mentha pulegium</i> L. (Lamiaceae, RAB04)	Fliyou	Leaf Flowering top	The decoction and powder are used orally against stomach disorders, cooling and respiratory diseases such as influenza, colds and bronchitis	74.05	0.36	57		Antibacterial activity [60]
<i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae, RAB05)	Salmia	Leaf	The decoction is used orally to reduce the hypoglycemic level	87.24	0.11	29		Antibacterial activity of essential oil [60] Antioxidant activity [61]
<i>Mentha viridis</i> L. (Lamiaceae, RAB06)	Na'ar	Leaf	The decoction is used orally against stomach disorders	82.73	0.03	7		Antimicrobial and antifungal activities [63] Antibacterial and antiviral activities [64]
<i>Ocimum basilicum</i> L. (Lamiaceae, RAB07)	Lahbaq	Leaf	The decoction is used against digestive disorders and aphrodisiac	79.02	0.08	9		Antibacterial activity [60]
<i>Mentha suaveolens</i> L. (Lamiaceae, RAB08)	Mchehtro	Leaf	The decoction is used orally against cooling	68.54	0.23	4		Antibacterial activity [60]
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae, RAB09)	Azir	Leaf	The infusion is taken orally in the morning before breakfast against stomach disorders and cooling The infusion is drunk orally at the rate of one glass to facilitates childbirth	74.18	0.28	53	Pathologies of the digestive system, allergy and diabetes [13] Gastric problems, anti-diarrhoea, antihemorrhoidal and analgesic [62] Cardiac disease, hypertension and diabetes [11] Allergy, asthma, cancer, infections and immune system depression [51] Pathologies of the digestive system, allergy and dermatocosmetology [13] Diabetes [14] Problems of hearing and the ear, problems of the sphere buccodentaire and diabetes [13] Diabetes [11] Asthma [51] Not cited	Antioxidant and antimicrobial activities [66] Antibacterial activity [67] Hypoglycemic activity [68] Antioxidant activity [69] Antibacterial, antifungal, anticandidal, insecticidal, acaricidal, antitrypanosomal and herbicidal activities [70,71] Antioxidant activity [72]
<i>Mentha absinthium</i> L. (Lamiaceae, RAB10)	chiba	Leaf	The decoction is taken orally with milk against cooling	81.04	0.19	13		Antibacterial activity [30] Anti-genotoxic effect [73]
<i>Eucalyptus globulus</i> L. (Myrtaceae, RAB11)	kelitto	Stem with leaves	The steam is against influenza	73.88	0.05	27		(continued on next page)
<i>Eucalyptus citriodora</i> L. (Myrtaceae, RAB12)	kelitto	Leaf	The powder in oil poultice is applied on hair and scalp before sleeping for softening	65.32	0.02	2		
<i>Myrtus communis</i> L. (Myrtaceae, RAB13)	Rihàn	Leaf	The powder in oil poultice is applied on hair and scalp before sleeping for fall protection	93.50	0.52	73	Cardiac disease, hypertension and diabetes [11] Cardiac weakness, digestive system [12] Pathologies of the digestive system allergy	

Table 2 (continued)

Scientific name	Vernacular name	Part used	Mode of preparation, route of administration and main diseases	FL	UV	FC	Recorded literature thnomedicinal uses inside in Morocco	Pharmacological properties
<i>Hordeum vulgare</i> L. (Poaceae, RAB14)	Chaâir	Seed	The powder in milk is taken orally before breakfast against digestive disorders	75.25	0.07	11	Diabetes, allergy and fever [13]	Hypoglycemic effect [74]
<i>Cynodon dactylon</i> L. (Poaceae, RAB15)	Njem	Stem with leaves	The decoction is taken orally to fight against cold	64.78	0.03	3	Cardiovascular diseases, Pathologies of the reproductive system and Pathologies of the circulatory system [13]	Antidiabetic and antiproliferative properties [75]
<i>Pinus halepensis</i> L. (Pinaceae, RAB16)	Taydâ	Leaf	The decoction of leaves is taken orally against toothache	76.15	0.14	6	Against microbial infections and eczema [51]	Antidiabetic effect [76]
<i>Ficus carica</i> L. (Moraceae, RAB17)	Karmôs	Leaf	The powder is taken orally with milk against cold and for improving sexual potency	83.40	0.26	10	Digestive system [12] Pathologies of the digestive system, pathologies of the circulatory system and cardiovascular diseases [13]	Antibacterial activity [77] Antifungal and herbicidal activities [78] Anticancer activity [79] Hepatoprotective effect [80]
<i>Olea europaea</i> L. (Oleaceae, RAB18)	Zitoun	Leaf	The infusion of leaves is taken orally as hypotensive and antidiabetic	86.52	0.21	13	Cardiac disease, hypertension and diabetes [11] Nervousness, anthelmintic, diabetes, eye infection and dry cough, grippe [12] Dermocosmetology, diabetes and pathologies of the respiratory system [13]	Anti-acne activity [81] Antioxidant, antihypertensive, antiatherogenic, anti-inflammatory and hypoglycemic properties [82]
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Cesalpiniaceae, RAB19)	kharoub	Seed aerial part	The titration is taken orally to fight against stomach and bowel pain The decoction is taken orally against respiratory and digestive disorders	81.05	0.16	17	Rheumatism [51] Intestinal parasites, digestive system and anti-diarrheal [12]	Cytotoxicity and antimicrobial activities [83]
<i>Allium cepa</i> L. (Amaryllidaceae, RAB20)	Bsal	Bulb	The maceration of the bulb is taken orally before sleeping as antipyretic	70.65	0.28	13	Inflammation and rheumatism [51] Skin absces [12] Head problems, pathologies of the respiratory system and pathologies of the urinary system [13]	Antimicrobial activity [84] Antioxidant activity [85]
<i>Juniperus phoenicea</i> L. (Cupressaceae, RAB21)	Ar'ar	Stem with leaves	The powder is taken orally with honey before breakfast against stomach disorders and constipation	82.34	0.03	5	Asthma, hepatitis and rheumatism [51]	Antibacterial activity [86]
<i>Agave americana</i> L. (Agavaceae, RAB22)	Sabra	Leaf	The infusion is applied on the hair to promote hair growth	67.52	0.04	9	Not cited	Antibacterial activity [87]
<i>Cuminum cyminum</i> L. (Apiaceae, RAB23)	Kammun	Seed	The cooking is taken orally against diarrhea	72.84	0.02	14	Diabetes, cardiovascular diseases and pathologies of the digestive system [13]	Antimicrobial and cytotoxic activities [88]
<i>Cariandrum sativum</i> L. (Apiaceae, RAB24)	kozber	Seed	The fumigation is inhaled against cold	75.18	0.09	3	Cardiac disease and hypertension [11]	Antioxidant effect [89]
<i>Petroselinum sativum</i> L. (Apiaceae, RAB25)	Maâdnoûs	Aerial part	The decoction is taken orally against diarrhea	66.32	0.01	7	Cardiac disease and hypertension [11]	Protection of gastric mucosal damage [90]
<i>Nerium oleander</i> L. (Apocynaceae, RAB26)	Dafia	Leaf	The decoction is taken orally against kidney stones	74.95	0.01	2	Allergy [51]	Antioxidant and antibacterial activities [91]
			The infusion is taken orally as natural antidiabetic	74.95	0.01	2	Cardiac disease, hypertension and diabetes [11] Asthma and cancer [51]	Antioxidant, antimicrobial and antitumor activities [92]
<i>Chamaerops humilis</i> L. (Arecaceae, RAB27)	Doum	Rhizome	The infusion is taken orally as neuromodulator for the treatment of neuronal diseases	68.46	0.03	16	Diabetes, pathologies of the urinary system and skeleton-muscular system problems [13]	Antioxidant activity [93]
<i>Allium sativum</i> L. (Liliaceae, RAB28)	Touna	Bulb	The cooking is applied with oil on the eye against visual diseases	72.30	0.07	23	Bile stones, liver diseases and diabetes [12]	Hypoglycemic and hypolipidemic effects [94]
<i>Punica granatum</i> L. (Lythraceae, RAB29)	Romman	Bark	The decoction is taken orally against stomach disorders	76.86	0.02	15	Scorpion and snake bite [12] Diabetes, dermocosmetology and pathologies of the digestive system [13] Diabetes and digestive system [12] Diabetes, cardiac and renal diseases [14]	Antioxidative and antigenotoxic effects [95]
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Drou	Leaf	The decoction is taken orally against stomach	88.55	0.36	24	Digestive diseases and evil eye [12]	Antioxidant and antibacterial activities [96] Antibacterial activity [97]

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Scientific name	Vernacular name	Part used	Mode of preparation, route of administration and main diseases	FL	UV	FC	Recorded literature thnomedicinal uses inside in Morocco	Pharmacological properties
(Anacardiaceae, RAB30)			disorders				Pathologies of the digestive system, diabetes and cardiovascular diseases [13]	
<i>Quercus ilex</i> L. (Fagaceae, RAB31)	Al-bali'ut	Root	The decoction is taken orally against stomach disorders	64.28	0.02	9	Magic, oral hygien and cardiac stimulant [10]	Antibacterial activity [99]
<i>Nicotiana tabacum</i> L. (Solanaceae, RAB32)	Tabba	Leaf	The maceration is applied locally on the skin against alopecia and scabies	63.57	0.03	11	Not cited	Antibacterial activity [100]
<i>Arbutus unedo</i> L. (Ericaceae, RAB33)	Senou	Leaf	The decoction is taken orally as natural antidiabetic drugs	92.85	0.11	37	Kidney diseases [12]	Antibacterial and antioxidant activities [30]
							Cardiovascular diseases and pathologies of the digestive system [13]	
							Hypertension [20]	
<i>Citrus limon</i> L. (Rutaceae, RAB34)	El Hâmméd	Fruit	The juice is mixed with honey and taken orally against respiratory disorders	89.71	0.22	29	Ears for hearing loss, cold and head problems [13]	Hepatoprotective Activity [101]
<i>Salix alba</i> L. (Salicaceae, RAB35)	Ud el-mâ	Leaf	The decoction is taken orally as natural antidiabetic	61.36	0.05	6	Cosmetic, headache and fever [12]	Antibacterial activity [102]
<i>Vitis vinifera</i> L. (Vitaceae, RAB36)	La'anb	Leaf	The poultice powder is applied on the head as febrifuge	72.92	0.02	17	Skeleton and muscular system problems [13]	Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities [103]
<i>Cannabis sativa</i> L. (Cannabaceae, RAB37)	L-kif	Seed	The powder in oil poultice is applied on the hair as softener	67.58	0.01	3	Head problems and allergy [13]	Antimicrobial and antioxidant activities [104]
							Narcotic, skin diseases and hair strengthening [12]	Antimicrobial activity [105]
							Dermocosmetology and problems of the nervous system [13]	
<i>Cistus monspeliensis</i> L. (Cistaceae, RAB38)	Cheppa	Leaf	The poultice is applied locally on the skin against wounds	79.26	0.06	32	Not cited	Antibacterial activity [29]
<i>Cistus albidus</i> L. (Cistaceae, RAB39)	Cheppalbeida	Flowering top	The decoction is taken orally against respiratory disorders	81.75	0.03	52	Not cited	Antioxidant activity [106]
<i>Cistus crispus</i> L. (Cistaceae, RAB40)	Ouekir	Leaf	The poultice is applied on the skin against wounds	85.04	0.07	39	Not cited	Antibacterial activity [29]
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq. (Rosaceae, RAB41)	Lhbak	Fruit	The decoction is used orally against respiratory disorders	74.68	0.12	34	Not cited	Antibacterial activity [107]
<i>Centaurium erythraea</i> Rafn. (Gentianaceae, RAB42)	Korsat Ihaya	Flowering top	The maceration is used against skin diseases by external use	89.24	0.28	37	Hepatitis, asthma and rheumatism [51]	Antioxidant activity [108]
							Digestive system and kidney diseases [12]	Antioxidant activity [109]
							Allergy and increasing energy [13]	Anti-hyperglycemic activity [110]
<i>Daphne gnidium</i> L. (Thymelaeaceae, RAB43)	Metnan	Leaf	The powder in oil poultice is applied on the hair and scalp	75.93	0.04	28	Hair care and hair strengthening [12]	Diuretic effects [65]
							Hair-care, abortive and dyeing of hair [10]	Antibacterial activity [29]
							Dermocosmetology, fever and head problems [13]	Antioxidant and antigenotoxic activities [111]
<i>Myoporum laetum</i> G. (Forst) (Scrophulariaceae, RAB44)	Defla	Leaf	The maceration is applied on the skin against allergy	64.52	0.02	22	Not cited	Hepatoprotective activity [112]

The traditional practice was reported in almost in all age groups (Table 1). People that were over 50 years old had a utilization of 32.74%, followed by [45–60 years], [33–45 years] and [18–33] with a respective percentages of 29.20%, 21.23% and 16.81%. Previous research has revealed that the practice of phytotherapy is always more important for older people than for younger people [43,48]. In another study, Ziyat et al. [20] reported that old people are more exposed to different diseases and young generation is more exposed to modernization [49]. This result reflects the image of the transfer of traditional practices from one generation to another. Unfortunately, the transmission of this knowledge is currently at risk because it is not always assured [50].

3.2. Medicinal plant diversity

The traditional medicine in different areas of Morocco disposes of several plant remedies. These plants come from the diversity of environment and flora of Morocco. Moreover, numerous ethnopharmacological surveys have revealed that phytotherapy research in Morocco is very empirical and should be proved scientifically by future studies. The results obtained on medicinal plants documented in our study are given in Table 2, which contain information about families with plant species, local names; parts used, ailments, methods of preparation and administration, traditional use in other Moroccan areas and pharmacological properties (Table 2).

We have found that 44 plant species were reported by the informants for several medicinal applications (Table 2), representing 28 families (Table 2 and Fig. 3). The Lamiaceae family was represented by ten species. While, Cistaceae, Myrtaceae, Apiaceae families were represented by only three species each. Two medicinal species are belonged to the Poaceae family and the 23 remaining plants are only represented by one species each. Many researchers have demonstrated that the percentage use of Moroccan medicinal plants ranges from 55% to 90% depending on the area where the survey was undertaken [38].

The diversity of Moroccan medicinal plants is due to the variations in topography and climate Morocco. On the other hand, the Mediterranean climate of the North-West of Morocco explains this floristically diversity [43]. In Morocco, the number of species is approximately 500 and a significant number is common or endemic to North Moroccan areas. For the best analysis and estimation of quantitative data collecting concerning the use of species by people, we have calculated medicinal use value (MUV) (Table 2).

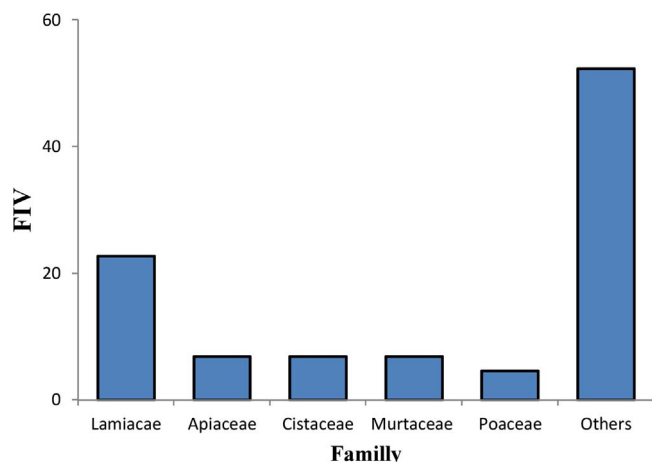


Fig. 3. Family Importance Value (FIV) of medicinal plants of study area. Plants used. The identification of each plant was carried out by Pr. Ennabili Abdessalam, and species were then classified into their family. The most cited was the Lamiaceae family -10 species.

3.3. Medicinal use value (MUV)

This index has used for determining some relative prominence of the used species, there are more use reports indicated by informants. Its values were ranged between 0.01 and 0.62 (Table 2). The species that possess the highest use value are: *Origanum compactum* (MUV = 0.62), *Myrtus communis* (MUV = 0.52), *Lavandula stoechas* (MUV = 0.43), *Mentha pulegium* (MUV = 0.36), *Pistacia lentiscus* (MUV = 0.36) and *Centaureum erythraea* (MUV = 0.28). These species have been used in traditional medicine in numerous Moroccan areas and other Mediterranean countries. In addition, extracts and essential oils from these species have showed several pharmacological properties (Table 2).

Our results have shown that the medicinal plants that possess the higher MUV value are used frequently in other ethnopharmacological surveys in different areas of Morocco. The chemical composition of these medicinal plants should be screened. Furthermore, the pharmacological properties should be also evaluated in several pharmacological systems such as antibacterial, antioxidant and anticancer effects to develop new drugs [113]. The MUV value of some species can be explained in some cases by the less knowledge of informants about such species.

3.4. Traditional medicine knowledge

3.4.1. Plant parts used, modes of preparation and routes of administration

Several parts were used (Fig. 4), the most frequent being leaves (47.16%) followed by seeds (11.32%), roots (9.43%), tops (7.54%), stems with leaves (7.54%), and bulbs (6.55%). The plant parts used (fruit, bark, aerial parts and roots) are represented by a cumulative percentage of 13.19%. The high use of leaves as remedies explains the fact that these are the center of bio-organic metabolism and the of secondary metabolite storage in some species especially aromatic plants. It could be explained also by the quickness and ease of medicinal plants harvesting and by the fact that aerial parts of plants are the center of the photosynthetic phenomenon [114]. However, picking leaves should not be done in an anarchic way; only should not pull the whole plant and thus contributes to deforestation. Leaves are used because they allow the preservation of the plant. Indeed, collection of roots can kill the plant and endanger the species [115]. Several previous studies carried out in Morocco and in populations in different areas of the world have reported the use of leaves for the preparation of drugs [116,117].

The preparation of drugs from medicinal plants is represented by several methods such as the decoction, the infusion and the powder. Fig. 5 summarizes the methods of preparation found in this survey.

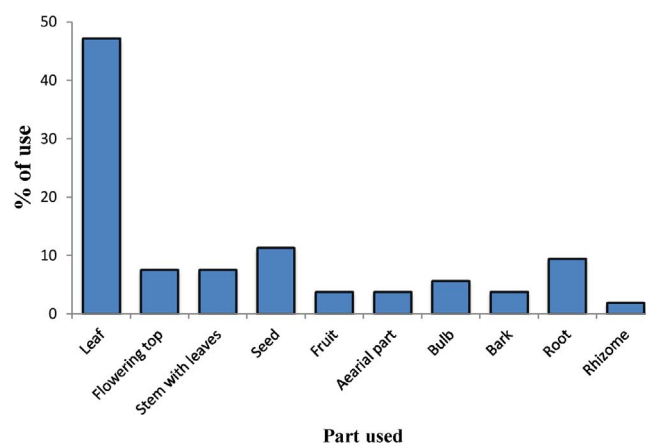


Fig. 4. Plant of medicinal plants used by participants. Different plant parts are used for the treatment of diseases: leaves are the most useful as source of therapeutic drugs (47.16%). Flowing by seed (11.32%), root (9.43%), flowering top (7.54%) and stem with leaves (7.54%).

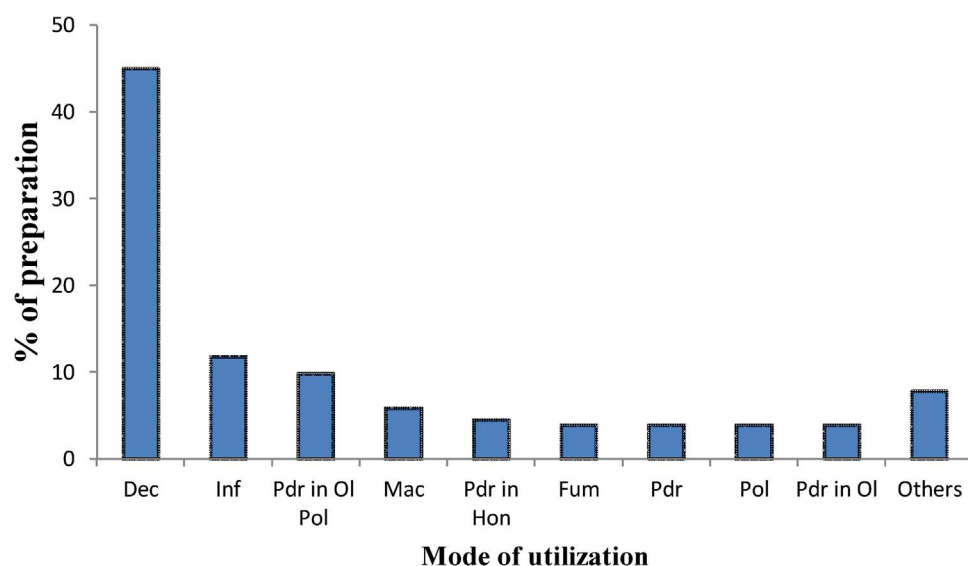


Fig. 5. Mode of preparation of medicinal plants. The methods found are: Dec: decoction (45%); Inf: infusion (11.76%); Pdr in Ol Pol: powder in oil Poulitice (9.80%); Mac: maceration (5.88%); Pdr in Hon: powder in honey, Pdr: powder, Fum: fumation, Pdr in Ol: powder in oil and Poulitice (3.92% for each); Others (7.84%).

Several modes of preparation were identified. The most common method was decoction (45%), followed by infusion (11.76%), powdered preparation in oil poulitice (9.8%), maceration (5.88%) and the powder preparation in oil, the poulitice, powder, fumigation, and preparing powdered honey (3.92%). The other modes (poulitice in oil, juice mixed in honey poulitice powder and triturated) represent a cumulative percentage of 7.84%. The mode of preparation is related to the type of use (external or internal), normally for an external mask use, massage or as suppositories which are applied, while decoction, infusion, maceration, and the other modes are used for internal use. Our results are congruent with other studies carried out across Morocco regions [45,48]. Most drug preparation methods used water as diluents [21,118].

On the other hand, some are prepared based on some foods such as milk, olive oil and honey. This preparation is related to relationship between these food, especially honey and olive oil, with the population of North-West of Morocco. Otherwise, honey and olive used in several cases as remedies against several diseases.

Almost sixty-five percent (65.38%) of the medicines were administered orally. Application on the hair, application on scalp, local application, application on the back (13.46% for each mode), inhalation, eye drops (3.84%), and used as applications on the head, feet bath (1.92% for each mode) (Fig. 6). This result is in agreement with similar surveys conducted in other areas of Morocco, which also reported that

oral administration is the most common route of administration [45,48].

In some situation, informants have reported the use of some additives to improve the acceptability of several oral drugs. For example, some people use juice with milk to reduce the bitterness of the preparation. On the other hand, some restrictions must be taken into consideration; this is the case of a drug prepared from leaves of *M. communis* against snakebites. The person who takes this drug should not sleep after treatment. In fact, the sleep reduces the efficacy of this drug.

3.5. Fidelity level

The FL values in our study varied from 61.36% to 100% (Table 2). For all documented medicinal plants, we found only 17 had a high FL values (FL of $\geq 80\%$) on the other hand, a maximum FL value for the plants showed the specific choice of an informant to treat a specific complication [116]. In this study, we have noted that the species that possess an important FL value are the most reported to be useful. On the other hand, the species that possess important FL value are the most reliable for treating the diseases. For example, *Origanum compactum* (FL = 100%) is well known in some regions of Morocco as remedy against several disorders and possesses numerous *in vitro* biological activities (Table 2).

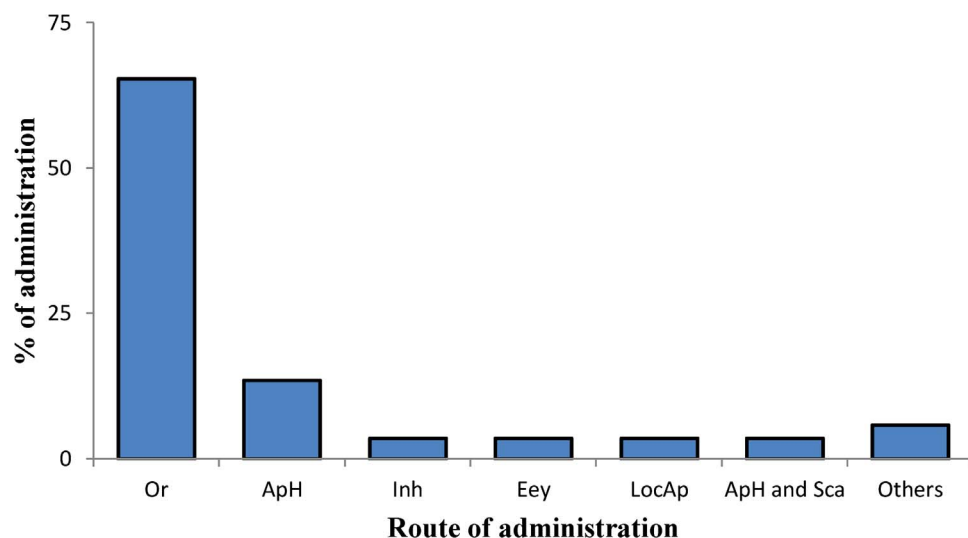


Fig. 6. Route of administration of medicinal plant drugs. There are several types of applications. Or: Oral; ApH: Application on the hair; Inh: Inhalation; Eey: Eyewash; local application; Application on the hair and scalp; Others applications (Application on the head, external use; FB: Foot Bath). The oral administration is found to be the most useful way.

Table 3

ICF value of medicinal plants used for treatment of various diseases.

Category of diseases	Number of use reports	% age of use reports	Number of taxa used	% age of taxa	ICF
Respiratory system diseases	67	15.78	21	15.23	0.69
Dermocosmetology	51	12.28	17	13.53	0.68
Digestive system problems	91	26.31	34	32.41	0.63
Nervous system disorders	13	10.52	6	11.06	0.58
Ear, eye and nose problems	18	8.77	11	7.64	0.41
Hair loss	21	7	13	2.80	0.4
Cardiovascular system problems	20	5.65	14	2.74	0.38
Blood and nutritional problems	15	4.82	11	2.37	0.28
Microbial infections	16	3.46	13	2.17	0.2
Skeleton-muscular system problems	9	3.07	8	1.72	0.12
Other	11	1.79	10	8.53	0.1

ICF = Informant Consensus Factor.

3.6. Informant consensus factor (FIC)

Diseases recorded in our survey were regrouped into 11 main categories. Table 3 summarizes these categories with their% age of use reports, % age of taxa and ICF. The ICF is established to reveal whether a category of ailment is commonly treated with herbs by the local population. The ICF values were ranged between 0.1 and 0.69, with an average of 0.40. Diseases with highest values of informant consensus factor were: respiratory system diseases (ICF = 0.69), dermocosmetology (ICF = 0.68) digestive system disorders (ICF = 0.63) and nervous system disorders (ICF = 0.58).

In the study area, we have generally observed some common disorders, because the population lives on the intake of low-quality foods. On the other hand, the higher ICF values for respiratory and digestive disorders have also been reported in several previous studies carried out in Morocco [21,23,46] and other parts of the world [98,119]. Thus, illnesses related to digestive system, respiratory system, nervous system and dermocosmetology were the most treated by medicinal plants in the whole world, because this category of diseases is known since antiquity.

However, the ICF values of other diseases such as microbial infections (ICF = 0.2) and skeleton-muscular system problems (ICF = 0.12) were lowest. This result due to the lowest knowledge related to the popular healing of these illnesses by the local population of Ouezzane. For example, the lowest ICF value found for microbial infections does not reflect the importance of this ailment because digestive, respiratory and skin diseases may be caused by microbial agents. This result indicates the ignorance of the informants about the etiologies of diseases.

3.7. Previously unreported medicinal plants in Morocco

In searching for some new medicinal plants used in phytotherapy in Morocco, the species reported in this work were compared to other previously studies conducted in some Morocco areas [11,13,14,20,51,60,62]. We found that eating plants (18.18%) used traditionally in our study had not been reported in the previous studies (Table 2).

On the other hand, the literature review revealed some pharmacological effects of eight new reported citations in Morocco. These citations support the results obtained in our studies for *Eucalyptus citriodora* [70,71], *Agave Americana* [88], *Nicotiana Tabacum* [100], *Cistus monspeliensis*, *Cistus albidus* and *Cistus crispus* [29] and *Crataegus monogyna* [99].

3.8. Phenolic and flavonoid contents

The phenol and flavonoid content of some medicinal plants extracts was determined. The Table 4 summarizes the results expressed as mg GAE/g extract for phenol content and mg QE/g of extract for flavonoid content. All plants extracts contain important charges of phenol and

Table 4

Total phenol and total flavonoid contents.

Plant species	Extracts	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg QE/g extract)	References
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	141.72 ± 0.56	31.61 ± 0.59	[30]
	EtOH	133.61 ± 0.45	21.61 ± 1.65	
	n-hexane	94.51 ± 0.08	24.76 ± 0.70	
	EtOAc	107.84 ± 2.04	17.48 ± 1.02	
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	153.27 ± 0.68	52.72 ± 0.72	[120]
	EtOH	117.60 ± 1.12	27.60 ± 0.32	
	n-hexane	105.54 ± 0.35	29.64 ± 0.85	
	EtOAc	119.22 ± 0.96	24.31 ± 0.69	
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	137.46 ± 0.35	27.24 ± 0.83	[31]
	EtOH	126.41 ± 1.03	18.41 ± 0.43	
	n-hexane	122.72 ± 1.16	31.24 ± 1.23	
	EtOAc	86.31 ± 0.89	14.31 ± 1.09	
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	53.27 ± 0.68	11.72 ± 0.72	[121]
	EtOH	37.60 ± 1.12	07.60 ± 0.32	
	n-hexane	35.54 ± 0.35	9.64 ± 0.85	
	EtOAc	19.22 ± 0.96	02.31 ± 0.69	
<i>Salvia officinalis</i>	MeOH	115.23 ± 0.82	31.05 ± 0.62	[59]
	EtOH	102.04 ± 2.00	26.13 ± 2.96	
	n-hexane	111.40 ± 1.53	33.64 ± 1.02	
<i>Daphne gnidium</i>	EtOH	83.46 ± 1.12	17.68 ± 1.23	[29]
<i>Ajuga iva</i>	EtOH	49.75 ± 2.08	11.97 ± 0.42	
<i>Lavandula stoechas</i>	EtOH	34.64 ± 1.16	9.28 ± 1.37	
<i>Cistus albidus</i>	EtOH	112.48 ± 1.75	24.55 ± 0.58	
<i>Cistus monspeliensis</i>	EtOH	79.19 ± 2.42	19.43 ± 1.34	

MeOH: Methanol extract.

EtOH: Ethanol extract.

EtOAc: Ethyl acetate extract.

flavonoid contents. The TPC ranged from 153.27 ± 0.68 to 34.64 ± 1.16 g GAE/g extract, while flavonoid content ranged from 52.72 ± 0.72 to 02.31 ± 0.69 QE/g extract. According to these results, it should be noted that the selected medicinal plants have a good amount of polyphenols and flavonoids which varies according to the solvent polarity. Based on the results of Tawaha et al. that have estimated that the amount of this group of chemical content is considered very high if it is higher than 20 mg GAE/g extracts [22], our tested medicinal plants present a very important source of phenolic compounds. On the other hand, these plants have higher phenolic contents than other plants tested in other areas of Morocco [123–125]. It can be concluded that the medicinal plants in Ouezzane province possess high amounts of phenolic and flavonoid content.

Several studies have focused on natural products from medicinal plants for identification and isolation of new natural bioactive compounds. Phenolic compounds such as polyphenol and flavonoids are complex molecules with several pharmacological properties such as

antioxidant, antimicrobial and antitumor [123–126]. Moreover, Morocco is rich in medicinal plants that have showed numerous pharmacological properties such as antimicrobial, antioxidant and antiproliferative [127]. In addition, some studies have established the correlation between the consumption of these molecules and the prevention of some diseases such as cancer, heart disease, inflammation, arthritis, immune related diseases, neurodegenerative diseases and diabetes [128].

Several factors such as climate have been shown able to modulate the synthesis of phenolic compounds by many epigenetic modifications such as DNA methylation, histone modifications and remodeling of chromatin [129,130]. Furthermore, the presence of Mediterranean climate in Ouezzane region may explain the observation about the richness of our studied medicinal plants in phenolic contents. The richness of plant extracts by secondary metabolites may be explained by the geographical location of Ouezzane province (Mediterranean climate). However, this variability of phenolic and flavonoid content depends on plant species which are affecting phenological stage, climate and organs of extraction [131].

3.9. In vitro pharmacological properties of some reported medicinal plants

3.9.1. Antioxidant activity

The antioxidant activity of medicinal plant extracts was evaluated using DPPH scavenging activity assay. The results expressed in IC_{50} values are summarized in Table 5. The plant extracts and essential oils have showed significant antioxidant activities. Indeed, the essential oil *Myrtus communis* and *Salvia officinalis* showed an IC_{50} value of 0.24 and 0.46 mg/mL respectively. On the other hand, organic extracts of *Origanum compactum* had higher antioxidant capacities than other plant extracts. The IC_{50} values of *n*-hexane and the methanol extract were 39.83 and 48.34 μ g/mL respectively. The capacity of plants extracts to reduce the DPPH radical is correlated with the total flavonoid contents. Indeed, several studies have demonstrated the role as antioxidants agents. The antioxidant activity of Moroccan medicinal plants has been tested in several studies [127].

Numerous studies have focused on phenolic compounds such as polyphenols and flavonoids from medicinal plants. Indeed, these components have revealed strong efficacies reducing reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and thus prevent cell damage [133]. The anti-radical activity is very important due to the deleterious role of the

free radicals in food and biological systems generating thus oxidative stress related diseases. Therefore, we have selected the test of DPPH to reveal the anti-radical activity of selected medicinal plants. The choice of DPPH assay was based on three advantages: it is quick, easy to implement and carried out at room temperature (it eliminates any risk of thermal degradation of the tested molecules).

The observed antioxidant activity is certainly due to the high amount of phenolic contents found in plant extracts. These components have shown important antioxidant properties by several mechanisms [134]. In fact, the DPPH assay evaluates the H donating and the radical scavenging capacity. On the other hand, it has been shown that phenolic components neutralize free radicals by donating one of their own electrons thereby stopping the reaction by chain propagation during the lipid oxidation process. The phenolic compounds contain hydroxyl groups responsible for their antioxidant properties. On the other hand, the ability of these components to scavenge free radicals increase with the number of hydroxyl groups' catechol moieties in the molecule [135]. In addition, to the antioxidant activities these, compounds are influenced by the position of the hydroxyl groups in the molecules [136].

3.9.2. Antibacterial activity

The results of antibacterial effects of essential oils and extracts are summarized in Table 6. Preliminary results are shown by the well diffusion method which results in the appearance of an inhibitory zone around the wells; they were expressed as the diameters of inhibitory zone in mm (Table 6). It has been noticed that the diameters of the inhibitory zones have changed between bacterial species and from one extract to another, because the composition of extracts depends on the plant species. Plant extracts and essential oils showed important antibacterial effects against tested bacteria. Regarding the antibacterial activity of plant extracts, the ethanol extract of *Arbutus unedo* and methanol extract of *Myrtus communis* revealed the best diameter of inhibition of $\varnothing = 41 \pm 0.67$ mm and $\varnothing = 39 \pm 0.57$ mm respectively against *Listeria monocytogenes*. For the antibacterial activity of essential oils, the highest diameter of inhibition ($\varnothing = 23 \pm 0.00$ mm) was shown by *Salvia officinalis* essential oil against *Bacillus subtilis*. MICs values were determined using micro-dilution assay and MBCs were determined on the solid medium. The results of MIC and MBC values of selected medicinal plant extracts and essential oils are listed in Table 6. The results showed that some tested extracts and essential oils were active against studied bacteria, but the extent of this activity was depending on the type of plant extract and bacterial strains.

It was observed that the Gram-positive bacteria were more sensitive to the action of extracts and essential oils than Gram-negative. These findings corroborate with almost all studies on the antibacterial activities of medicinal plants products [52,127]. The resistance of Gram-negative bacteria is due to the outer membrane surrounding the cell wall which restricts the diffusion of hydrophobic compounds through the lipo-polysaccharide. In addition, the periplasmic space contains enzymes, which are able to break down foreign molecules introduced from outside [137]. On the other hand, *Pseudomonas aeruginosa*, a strain known for its multi-antibiotic-resistance, was inhibited by *n*-hexane extract of *Myrtus communis* at low concentrations ($\varnothing = 21 \pm 0.77$ mm, MIC = 0.25 mg/mL and MBC = 0.5 mg/mL). Our results showed that in almost all cases, the MIC values are not equal to MBC values indicating a bacteriostatic action of extracts at the MIC values. However, some extracts had a bactericidal action at MIC values indicating thus a specific action that lead to growth death of bacteria. On the other hand, results have not shown a correlation between phenolic content and antibacterial effects. Indeed phenolic components often showed a synergistic action against bacteria [138]. Our results are significantly important compared with previous ones on the same plants collected from other Moroccan areas [72,107,139,140]. The variability of results may be attributed to the difference of chemical composition, which depends on the geographical location of the collected plants. Moreover,

Table 5
Antioxidant activity of some reported medicinal plants.

Species	Extracts	IC_{50} (μ g/mL)	References
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	53.95 $\pm$ 7.55	[121]
	EtOH	222.46 $\pm$ 8.4	
	<i>n</i> -hexane	109.43 $\pm$ 9.53	
	EtOAc	276.82 $\pm$ 8.08	
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	48.34	[120]
	EtOH	74.25	
	<i>n</i> -hexane	39.83	
	EtOAc	137.35	
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	95.25	[30]
	EtOH	280.50	
	<i>n</i> -hexane	73.73	
	EtOAc	276.15	
<i>Salvia officinalis</i>	MeOH	65.655	[59]
	EtOH	201.192	
	<i>n</i> -hexane	133.423	
<i>Salvia officinalis</i>	Essential oil	0.46	[132]
<i>M. viridis</i>	Essential oil	≥ 2.5	
<i>E. globulus</i>	Essential oil	2.37	
<i>M. communis</i>	Essential oil	0.24	
Controls	Ascorbic acid	27.20 $\pm$ 0.17	
	Trolox	43.72 $\pm$ 0.31	

Table 6
Antibacterial activities of some reported medicinal plants.

Species	Types of extracts	Tested bacteria	Effects	References
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 10 \pm 0.65$	[121]
		<i>S. aureus</i>	MIC = > 8	
			$\emptyset = 25 \pm 0.81$	
			MIC = 1	
		<i>L. monocytogenes</i>	MBC = 4	
			$\emptyset = 21 \pm 0.52$	
			MIC = 8	
			MBC > 8	
	EtOH	<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = \text{na}$	
			MIC = 1	
			MBC = 4	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 12 \pm 0.59$	
		<i>S. aureus</i>	MIC > 8	
			$\emptyset = 29 \pm 0.07$	
			MIC = 2	
			MBC = 2	
	n-hexane	<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 29 \pm 1.24$	
			MIC = 8	
			MBC > 8	
		<i>P. aeruginosa</i>	MIC > 8	
<i>Origanum compactum</i>		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 14 \pm 0.78$	[120]
		<i>S. aureus</i>	MIC > 8	
			$\emptyset = 22 \pm 42$	
			MIC = 3	
		<i>L. monocytogenes</i>	MBC > 8	
			$\emptyset = 31 \pm 0.92$	
			MIC = 1	
			MBC = 2	
		<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 13 \pm 1.34$	
			MIC = 2	
			MBC = 4	
	EtOAc	<i>E. coli</i> K12	na	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 15 \pm 0.73$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 22 \pm 1.33$	
			MIC = 1	
		<i>P. aeruginosa</i>	MBC = 2	
			na	
<i>Cistus albidus</i>	MeOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 8 \pm 2.4$	[120]
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 14 \pm 0.75$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 26 \pm 2$	
		<i>P. aeruginosa</i>	na	
	EtOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 15 \pm 4.4$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 17 \pm 1.5$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 19 \pm 2$	
		<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 7 \pm 1.5$	
	n-hexane	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 11 \pm 1.8$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 24 \pm 1.3$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 28 \pm 5$	
		<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 9 \pm 1.5$	
	EtOAc	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 19 \pm 2.8$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 17 \pm 2$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 34 \pm 3$	
		<i>P. aeruginosa</i>	na	
<i>Cistus monspeliensis</i>	EtOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 9 \pm 0.86$	[29]
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 17 \pm 1.86$	
<i>Lavandula stoechas</i>	EtOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 9 \pm 1.33$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 16 \pm 0.83$	
<i>Ajuga iva</i>	EtOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 8 \pm 0.33$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 11 \pm 1.23$	
<i>Daphne gnidium</i>	EtOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 17.5 \pm 0.86$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 21 \pm 1$	
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 11 \pm 1.12$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 15 \pm 1.33$	
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 12 \pm 0.91$	[30]
			MIC = 8	
			MBC > 8	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 14 \pm 0.72$	
			MIC = 0.5	
			MBC = 0.5	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 27 \pm 1.04$	
			MIC = 0.5	
			MBC = 1	

(continued on next page)

Table 6 (continued)

Species	Types of extracts	Tested bacteria	Effects	References
<i>Myrtus communis</i>	EtOH	<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 13 \pm 0.95$ MIC = 0.5 MBC = 2	[31]
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 9 \pm 1.35$ MIC > 8 MBC > 8	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 17 \pm 0.51$ MIC = 1 MBC = 4	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 41 \pm 0.67$ MIC = 1 MBC = 4	
	n-hexane	<i>P. aeruginosa</i>	MIC = 8 MBC > 8	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 23 \pm 0.00$ MIC = 2 MBC = 4	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 34 \pm 0.26$ MIC = 0.25 MBC = 0.5	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 40 \pm 0.19$ MIC = 0.25 MBC = 1	
	EtOAc	<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 19 \pm 0.97$ MIC = 1 MBC = 1	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 21 \pm 1.09$	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 14 \pm 0.19$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 38 \pm 0.84$	
	MeOH	<i>P. aeruginosa</i>	na	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 13 \pm 1.2$ MIC > 8	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 25 \pm 0.29$ MIC = 0.5 MBC = 2	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 39 \pm 0.57$ MIC = 0.5 MBC = 0.5	
	EtOH	<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 17 \pm 0.72$ MIC = 0.5 MBC = 4	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 12 \pm 0.8$ MIC = > 8	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 28 \pm 0.46$ MIC = 0.5 MBC = 4	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 27 \pm 0.54$ MIC = 4 MBC > 8	
	n-hexane	<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 15 \pm 0.60$ MIC = 4 MBC > 8	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 17 \pm 0.12$ MIC = 4 MBC = 4	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 29 \pm 0.31$ MIC = 0.25 MBC = 0.5	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 33 \pm 0.61$ MIC = 0.25 MBC = 0.5	
	EtOAc	<i>P. aeruginosa</i>	$\emptyset = 21 \pm 0.77$ MIC = 0.25 MBC = 0.5	
		<i>E. coli</i> K12	na	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 14 \pm 0.20$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 23 \pm 0.35$	
<i>Salvia officinalis</i>	MeOH	<i>P. aeruginosa</i>	na	[59]
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 12 \pm 0.55$ MIC = 8	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 22 \pm 0.81$ MIC = 2 MBC = 2	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 11 \pm 0.22$	

(continued on next page)

Table 6 (continued)

Species	Types of extracts	Tested bacteria	Effects	References
<i>Mentha viridis</i>	EtOH	<i>E. coli</i> K12	MIC = 4 MBC = 4 $\emptyset = 11 \pm 0.89$ MIC > 8 $\emptyset = 19 \pm 0.24$	[132]
		<i>S. aureus</i>	MIC = 4 MBC = 8	
	n-hexane	<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 19 \pm 1.64$	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 15 \pm 0.98$ MIC = 4 MBC = 4	
		<i>S. aureus</i>	$\emptyset = 22 \pm 82$ MIC = 8 MBC > 8	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 21 \pm 0.42$ MIC = 2 MBC = 4	
	Essential oil	<i>S. aureus</i> MBLA	$\emptyset = 18 \pm 1.34$	
		<i>S. aureus</i> 976	$\emptyset = 09 \pm 1.9$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 21 \pm 3.11$	
		<i>S. aureus</i> 994	$\emptyset = 07 \pm 0.66$	
<i>S. officinalis</i>	Essential oil	<i>B. subtilis</i> 6633	$\emptyset = 15 \pm 0.80$	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 09 \pm 0.65$	
		<i>P. aeruginosa</i> IH	na	
		<i>P. mirabilis</i>	$\emptyset = 19 \pm 0.41$	
		<i>S. aureus</i> MBLA	$\emptyset = 14 \pm 0.81$	
		<i>S. aureus</i> 976	$\emptyset = 07 \pm 0.6$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 10 \pm 1.55$	
		<i>S. aureus</i> 994	NA	
		<i>B. subtilis</i> 6633	$\emptyset = 23 \pm 0.00$	
		<i>E. coli</i> K12	na	
<i>E. globulis</i>	Essential oil	<i>P. aeruginosa</i> IH	na	
		<i>P. mirabilis</i>	$\emptyset = 16 \pm 0.83$	
		<i>S. aureus</i> MBLA	$\emptyset = 13 \pm 0.46$	
		<i>S. aureus</i> 976	$\emptyset = 8 \pm 2.33$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 9 \pm 1.42$	
		<i>S. aureus</i> 994	$\emptyset = 07 \pm 0.98$	
		<i>B. subtilis</i> 6633	na	
		<i>E. coli</i> K12	na	
		<i>P. aeruginosa</i> IH	na	
		<i>P. mirabilis</i>	$\emptyset = 14 \pm 3.21$	
<i>M. communis</i>	Essential oil	<i>S. aureus</i> MBLA	$\emptyset = 11 \pm 0.34$	
		<i>S. aureus</i> 976	$\emptyset = 08 \pm 1.3$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 14 \pm 0.89$	
		<i>S. aureus</i> 994	na	
		<i>B. subtilis</i> 6633	na	
		<i>E. coli</i> K12	na	
		<i>P. aeruginosa</i> IH	$\emptyset = 09 \pm 0.75$	
		<i>P. mirabilis</i>	$\emptyset = 21 \pm 2.23$	
	Controls	<i>S. aureus</i> MBLA	$\emptyset = 29 \pm 1.75$	
		<i>S. aureus</i> 976	$\emptyset = 33 \pm 0.5$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 27 \pm 2.33$	
		<i>S. aureus</i> 994	$\emptyset = 36 \pm 1.7$	
		<i>B. subtilis</i> 6633	$\emptyset = 17 \pm 0.25$	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 33 \pm 0.5$	
		<i>P. aeruginosa</i> IH	$\emptyset = 21 \pm 1.5$	
		<i>P. mirabilis</i>	nd	
	Erythromycin	<i>S. aureus</i> MBLA	$\emptyset = 26 \pm 3.0$	
		<i>S. aureus</i> 976	$\emptyset = 28 \pm 1.5$	
		<i>L. monocytogenes</i>	$\emptyset = 24 \pm 1.66$	
		<i>S. aureus</i> 994	$\emptyset = 27 \pm 1.25$	
		<i>B. subtilis</i> 6633	na	
		<i>E. coli</i> K12	$\emptyset = 21 \pm 2.66$	
		<i>P. aeruginosa</i> IH	na	
		<i>P. mirabilis</i>	na	

$\emptyset$: diameter of inhibition (mm).

MIC: minimum inhibitory concentration (mg/mL for extracts and% (v/v)).

MBC: minimum inhibitory concentration (mg/mL for extracts and% (v/v)).

nd (not determined), na (not active).

the antibacterial activity does not only depend on the chemical composition of extracts or essential oils but it is also related to the nature of the strain tested, the experimental method used and the chemical composition of extracts [27].

On the other hand, our study revealed the importance of ethnomedicinal use in pharmacological effects such as antibacterial activity. Indeed, some drugs are taken orally with honey or milk to reduce some disorder like stomach disorders. We have evaluated the antibacterial activity of *Mentha pulegium* essential oils (plant widely used alone and with food to fight against several disorders) with honey provided from the same region [141]. The MIC values of *Mentha pulegium* against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* were MIC = 0.5% (Table 6). While, the combination between this oil and honey showed inhibition values at MIC = 0.25% and MIC = 0.125% against these two strains respectively. The obtained results indicate a synergetic link between honey and the essential oil of *Mentha pulegium*. Regarding to all of these findings, we can note that the medicinal plants from the North-West of Morocco possess a promising source of antibacterial agents. However, our study also showed the importance of the ethnomedicinal use as an approach for studying the pharmacological properties of medicinal plants.

4. Conclusion

Based on the obtained results and the suggested discussions, the province of Ouezzane is rich in traditional knowledge. The traditional medicine of medicinal plants constitutes a very rich heritage as important source for the population to fight against several diseases. We suggest that medicinal and aromatic plants from Ouezzane province possess a high medicinal value. The *in vitro* antioxidant and antibacterial effects of selected medicinal plant extracts and essential oils showed pharmacological properties that possess these plants. However, other biological investigation by testing other plant extracts on several pharmacological systems is necessary to explore these medicinal plant products in therapeutical approaches. Other future works should be conducted for exploring their pharmacological potential in the treatment against several complications.

Financial support

None.

Ethical approval

The survey was carried out with the local population and was duly approved by the ethical committees of the Department of Biology, Faculty of Science, Mohamed VI University of Rabat, Morocco, and the Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaâdi University of Tetouan, Morocco. All informants have accepted the publication of these results.

Conflicts of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Acknowledgements

We thank the National Center for Scientific and Technical Research (CNRST) from Morocco for the support of the doctoral grant of Bouyahya Abdelhakim. We thank also the local population of the Ouezzane province for helping us in this study by accepting to respond on our questions.

References

- [1] A.A. Aiyelaja, O.A. Bello, Ethnobotanical potentials of common herbs in Nigeria: a case study of enugu state, Educ. Res. Rev. (2006) 16–22.
- [2] A. Lardos, Arabian drugs in early medieval mediterranean medicine. Edinburgh Studies in Classical Islamic History and Culture, Zohar Amar Efraim Lev. Edinburgh University Press, J. Ethnopharmacol. 203 (2017) 212–213.
- [3] C.T. Pedrollo, V.F. Kinupp, G. Shepard, M. Heinrich, Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: ethnobotanical survey and environmental conservation, J. Ethnopharmacol. 186 (2016) 111–124.
- [4] L. Komoreng, O. Thekiso, S. Lehasa, T. Tiwan, N. Mziz, N. Mokoena, N. Khambule, S. Ndebele, N. Mdletshe, An ethnobotanical survey of traditional medicinal plants used against lymphatic filariasis in South Africa, S. Afr. J. Bot. 111 (2017) 12–16.
- [5] A. El-Gharbaoui, G. Benitez, M.R. Gonzalo-Tejedo, J. Molero-Mesa, A. Merouki, A Comparison of Lamiaceae medicinal uses in eastern Morocco and eastern Andalusia and in Ibn al-Baytar's Compendium of Simple Medicaments (13th century CE), J. Ethnopharmacol. 18 (2017) 208–224.
- [6] E. Mpondo, S.D. Dibong, Traditional knowledge on medicinal plants use by ethnic communities in Douala Cameroon, Eur. J. Med. Plant 2 (2012) 159–176.
- [7] A.M.R. Scherrer Mottir, C.S. Weckerle, Traditional plant use in the areas of monte vesole and ascea, cilento national park (Campania, southern Italy), J. Ethnopharmacol. 96 (2005) 129–143.
- [8] M. Ghanmi, B. Satrani, M. Aberchane, M.R. Ismaili, A. Aafi, A. El Abid, Plantes Aromatiques Et Médicinales Du Maroc, Les Milles Et Une Vertu, Centre de Recherche Forestière, Rabat, Maroc, 2011 pp: 130.
- [9] A. Sijelmassi, Les Plantes médicinales Du Maroc, 6ème édition, Fennec. Casablanca, 1993 pp: 285.
- [10] J. Bellakhdar, R. Claisse, J. Fleurentin, C. Younos, Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia, J. Ethnopharmacol. 35 (1991) 123–143.
- [11] M. Eddouks, M. Maghrani, A. Lemhadri, M.L. Ouahidi, H. Jouad, Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilaleet), J. Ethnopharmacol. 82 (2002) 97–103.
- [12] J. El-Hilaly, M. Hmamouchi, B. Lyoussi, Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco), J. Ethnopharmacol. 86 (2003) 149–158.
- [13] J. Fakchich, M. Elachouri, Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments, J. Ethnopharmacol. 28 (2014) 76–87.
- [14] H. Jouad, M. Haloui, H. Rhiouani, J. El-Hilaly, M. Eddouks, Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane), J. Ethnopharmacol. 77 (2001) 175–182.
- [15] A. Merzouki, F. Ed-derfoufi, J. Molero-Mesa, Contribution to the knowledge of rifian traditional medicine III: phytotherapy of diabetes in chefchaouen province (North of Morocco), Ars. Pharmaceutica. 44 (2003) 59–67.
- [16] A. Tahraoui, J. El-Hilaly, Z.H. Israili, B. Lyoussi, Ethnobotanical survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province), J. Ethnopharmacol. 110 (2007) 105–117.
- [17] M. Eddouks, M. Ajbli, M. Hebi, Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilaleet region (Province of Errachidia) Morocco, J. Ethnopharmacol. 198 (2017) 516–530.
- [18] J. Bammi, A. Douira, Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, Maroc), Acta Botanica Malacitana 27 (2002) 131.
- [19] O. Benkhniq, L. Zidane, M. Fadli, Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc), J. Acta Bot. Barc. 53 (2011) 191–216.
- [20] A. Ziyyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni, W. Benjelloun, Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, J. Ethnopharmacol. 45 (1997) 45–54.
- [21] A. Merzouki, F. Ed-derfoufi, J. Molero Mesa, Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakkir district NW Morocco, Fitoterapia 21 (2000) 278–307.
- [22] F. El Azzouzi, L. Zidane, La flore Médicinale traditionnelle de La Région de Béni-mellal (Maroc), J. Appl. Biosci. 91 (2015) 8493–8502.
- [23] A. Ennabili, N. Gharnit, E.L. El Hamdouni, Inventory and social interest of medicinal, aromatic and honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco), Stud. Bot. 19 (2000) 57–74.
- [24] I. Teixidor-Toneu, G.J. Martin, A. Ouhammou, R.K. Puri, J.A. Hawkins, An ethnomedicinal survey of a Tashelhit-speaking community in the High Atlas Morocco, J. Ethnopharmacol. 188 (2016) 96–110.
- [25] A. Ennabili, L. Nabil, M. Ater, Importance socio-économique des hygrophytes au NW du Maroc. Al Biruniya, Al Biruniya Rev. Mar. Pharm. 12 (1996) 95–120.
- [26] A. Ennabili, E. El Hamdouni, N. Gharnit, Intérêts socio-économiques du caroubier et des plantes médicinales, aromatiques et mellifères à Mokrisset et Bab Taza (NW du Maroc), Rapport Agence de Développement Local de Chefchaouen, Maroc, 1997.
- [27] E. Ennabili, N. Gharnit, Y. Maach, A. El Meskaoui, D. Boust, Exploitation des plantes médicinales et alimentaires du bassin versant de l'oued Laou (Nord ouest du Maroc), J. Bot. Soc. Bot. 36 (2006) 71–79.
- [28] F. Fadel, D. Ben Hmamou, R. Salghi, B. Chebli, O. Benali, A. Zarrouk, E.E. Ebenso, A. Chakir, B. Hammouti, Antifungal activity and anti-corrosion inhibition of *Origanum compactum* extracts, Int. J. Electrochem. Sci. 8 (2013) 11019–11032.
- [29] A. Bouyahya, J. Abrini, A. El-Baâbou, Y. Bakri, N. Dakka, Determination of phenol

- content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from North-West of Morocco, *J. Plant Pathol. Microbiol.* 7 (2016) 107–111.
- [30] A. Bouyahya, N. El Moussaoui, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts, *Br. Biotechnol. J.* 14 (14) (2016) 1–10.
 - [31] A. Bouyahya, J. Abrini, E.O. Khay, S. Charfi, N. Boujida, A.E.L. Harsal, A. Talbaoui, A. Et-Touys, Y. Bakri, N. Dakka, *In vitro* antibacterial of organic extracts from North-West Moroccan medicinal plant *Myrtus communis* (L.), *Biotechnol. J. Intern.* 16 (2016) 1–9.
 - [32] L. El Mansouri, A. Ennabili, D. Boustia, Socioeconomic interest and valorization of medicinal plants from the Rissani oasis (SE of Morocco), *Bol. Latinoam Caribe Plant Med. Aromat.* 10 (2011) 30–45.
 - [33] M. Libiad, A. Khabbach A, A. Ennabili, Exploitation of plants from upstream of the Sebou-wadi watershed (province of Taounate, North of Morocco), *Biol. Divers. Conserv.* 4 (2011) 81–91.
 - [34] G. Yaseen, M. Ahmad, S. Sultana, A.S. Alharrasi, J. Hussain, M. Zafar, S. Ur-Rehman, Ethnobotany of medicinal plants in the thar desert (Sindh) of Pakistan, *J. Ethnopharmacol.* 63 (2015) 43–59.
 - [35] M. Fennane, M. Ibn Tattou, J. Mathez, A. Ouyahya, J. El Oualidi, Flore Pratique du Maroc, *Trav. Inst. Sci. Rabat.* 1 (1999) 36.
 - [36] M. Fennane, M. Ibn Tattou, A. Ouyahya, J. El Oualidi, Flore Pratique du Maroc, *Trav. Inst. Sci. Rabat.* 2 (2007) 38.
 - [37] M. Fennane, M. Ibn Tattou, Flore vasculaire du Maroc, inventaire et chorologie, *Trav. Inst. Sci. Rabat.* 1 (2005) 37.
 - [38] J. Bellakhdar, La pharmacopée marocaine, traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, Saint-Etienne, Edit. Ibis Press, 1997, 2017 pp: 764 (Ed. Le Fennec. Casablanca, Maroc. 129–533).
 - [39] A. Sijlmassi, Les plantes médicinales du Maroc, Edition Fenugrec, Casablanca, 2003 285 pp.
 - [40] J. Bellakhdar, Plantes médicinales au Maghreb et soins de base. Précis de phytothérapie moderne. Editions Le Fennec, Casablanca, Maroc, 2006 (pp: 386.
 - [41] M. Heinrich, A. Ankil, B. Frei, C. Wiemann, V. Stricher, Medicinal plants in Mexico: healer's consensus and cultural importance, *Soc. Sci. Med.* 47 (1998) 1859–1871.
 - [42] S. Kayani, M. Ahmad, S. Sultana, Z. Shinwari, M. Zafar, G. Yaseen, M. Hussain, T. Bibi, Ethnobotany of medicinal plants among the communities of Alpine and Sub-alpine regions of Pakistan, *J. Ethnopharmacol.* 164 (2014) 186–202.
 - [43] J. Tabuti, S.S. Dhillon, K. Lye, Traditional medicine in Bulamogi County, Uganda: its practitioners, uses and viability, *J. Ethnopharmacol.* 85 (2003) 119–129.
 - [44] M.S. Musa, F.E. Abdelrasool, E.A. Elsheikh, L. Ahmed, A.L.E. Mahmoud, S.M. Yagi, Ethnobotanical study of medicinal plants in the Blue Nile State, Southeastern Sudan, *J. Med. Plant Res.* 5 (2011) 4287–4297.
 - [45] N. Benlamdini, M. Elhafian, A. Rochdi, L. Zidane, Étude Floristique et Ethnobotanique de La Flore Médicinale Du Haut Atlas Oriental (Haute Moulouya), *J. Appl. Biosci.* 78 (2014) 6771–6787.
 - [46] M. El Hafian, N. Benlamdini, H. Elyacoubi, L. Zidane, Étude Floristique et Ethnobotanique Des Plantes Médicinales Utilisées Au Niveau de La Préfecture D' Agadir-Ida-Outanane (Maroc), *J. Appl. Biosci.* 81 (2014) 7198–7213.
 - [47] N. Tahri, A. El basti, L. Zidane, A. Rochdi, A. Douira, Etude Ethnobotanique Des Plantes Médicinales Dans La Province De Settat (Maroc), *J. For. Fac Kastam Univ.* 12 (2012) 192–208.
 - [48] O. El yahyaoui, N. Ait ouaaziz, A. Sammam, S. Kerroui, B. Bouabid, L.A. Lrhorf, L. Zidane, R. Bengueddour, Etude Ethnobotanique: Plantes Médicinales Commercialisées À La Province de Laâyoune; Identification et Utilisation, *Intern. J. Innov. Appl. Stud.* 12 (2015) 533–541.
 - [49] H. Ouhaddou, H. Boubaker, F. Msanda, A. El Mousadik, An ethnobotanical study of medicinal plants of the agadir ida ou tanane province (Southwest Morocco), *J. Appl. Biosci.* 84 (2014) 7707–7722.
 - [50] C. Anyinam, Ecology and ethnomedicine. Exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices, *Soc. Sci. Med.* 4 (1995) 321–329.
 - [51] A. El Hamsa El Youbi, I. Ouahidi, L.E.L. Mansouri, A. Daoudi, D. Boustia, Ethnopharmacological survey of plants used for immunological diseases in four regions of Morocco, *Eur. J. Med Plant.* 13 (2016) 1–24.
 - [52] S. Bouhdid, S.N. Skali, M. Idaomar, J. Zhiri, A. Baudoux, J. Abrini, Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil, *Afr. J. Biotechnol.* 7 (2008) 1563–1570.
 - [53] W. Chaouki, D.Y. Leger, J. Eljastimi, J.L. Beneytout, M. Hmamouchi, Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7, *Pharm. Biol.* 48 (2007) 269–274.
 - [54] N. Mezzoug, A. Elhadri, A. Dallouh, S. Amkiss, N.S. Skali, J. Abrini, A. Zhiri, D. Baudoux, B. Diallo, A. El Jaziri, Investigation of the mutagenic and anti-mutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents, *Mutat. Res.* 629 (2007) 100–110.
 - [55] J. El Hilaly, B. Lyoussi, Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.* 80 (2002) 109–113.
 - [56] J. El-Hilaly, A. Tahraoui, Z.H. Israili, B. Lyoussi, Acute hypoglycaemic, hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effects of continuous intravenous infusion of a lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* L. Shreber Whole plant in streptozotocin-induced diabetic rats, *Pak J. Pharm Sci.* 20 (2007) 261–268.
 - [57] H. Hajlaoui, H.H. Mighri, E.E. Noumi, M.M. Snoussi, N.N. Trabelsi, R.R. Ksouri, A. Bakhruf, Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio* spp. Strains, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 2186–2192.
 - [58] O. Yumuutas, S.D. Saygideger, Determination of antioxidant and antimutagenic activities of *Phlomis armeniaca* and *Mentha pulegium*, *J. Appl. Pharm. Sci.* 2 (2012) 36–40.
 - [59] A. Et-Touys, H. Fellah, M. Mniouil, A. Bouyahya, N. Dakka, E.H. Abdennebi, A. Sadak, Y. Bakri, Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco, *Br. Microb. Res. J.* 16 (16) (2016) 1–10.
 - [60] A. Talbaoui, N. Jamaly, M. Aneb, A. Il Idrissi, M. Bouksaim, S. Gmouh, S. Amzazi, M. El Moussaoui, A. Benjouad, Y. Bakri, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants, *J. Med. Plant Res.* 6 (2012) 4593–4600.
 - [61] I. Gülçin, M. Elmastag, Y.H. Aboul-Enein, Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies, *Phytother. Res.* 21 (2007) 354–361.
 - [62] S. Ghoulami, A. Il Idrissi, S. Fkih-Tetouani, Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morocco, *Fitoterapia* 72 (2001) 596–598.
 - [63] H. Oumzil, S. Ghoulami, M. Rhajaoui, A. Ildrissi, S. Fkih-Tetouani, M. Faid, A. Benjouad, Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*, *Phytol. Res.* 16 (2002) 727–731.
 - [64] N. El Moussaoui, G. Sanchez, E. Khay, M. Idaomar, M. Ibn Mansour, J. Abrini, R. Aznar, Antibacterial and antiviral activities of essential oils of Northern Morocco plant, *Br. Biotechnol. J.* 3 (2013) 318–331.
 - [65] M. Haloui, L. Louedec, J.B. Michel, B. Lyoussi, Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 465–472.
 - [66] I. Karabegovic, M. Nikolova, D. Velickovic, S. Stojicevic, V. Veljkovic, M. Lazic, Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques, *Chin. J. Chem. Eng.* 19 (2011) 504–519.
 - [67] G. Bachir Raho, M. Benali, Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2 (2012) 739–742.
 - [68] A. Jouad, M. Maghrani, R.H. El Hassani, M. Ed-douks, Hypoglycemic activity of aqueous extract of *E. globulus* in normal and streptozotocin-Induced diabetic rats, *J. Herbs Med. Plants* 10 (2003) 462–464.
 - [69] H.P. Singh, S. Kaur, K. Negi, S. Kumari, V. Saini, D.R. Batish, R.K. Kohli, Assessment of *in vitro* antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents, *LWT-Food Sci. Technol.* 48 (2012) 237–241.
 - [70] D.R. Batish, H.P. Singh, R.K. Kohli, S. Kaur, Eucalyptus essential oil as a natural pesticide, *For. Ecol. Manag.* 256 (2008) 2166–2174.
 - [71] N. Habila, A.S. Agbaji, Z. Ladan, I.A. Bello, E. Haruna, M.A. Dakare, Evaluation of *in vitro* activity of essential oils against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma evansi*, *J. Paras Res.* 2010 (2010) 1–5.
 - [72] M. Amensour, E. Sendra, J. Abrini, S. Bouhdid, J.A. Pérez-Alvarez, J. Fernández-López, Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts, *Nat. Prod. Commun.* 4 (2009) 819–824.
 - [73] N. Hayder, A. Abdelwahed, S. Kilani, R.B. Ammar, A. Mahnoud, K. Ghedira K, Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*, *Mutat. Res.* 564 (2004) 89–95.
 - [74] A. Sepici, I. Gurbuz, C. Cevik, E. Yesilada, Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits, *J. Ethnopharmacol.* 93 (2004) 311–318.
 - [75] T. Madhujith, F. Shahidi, Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein LDL cholesterol oxidation, *J. Agric. Food. Chem.* 55 (2007) 5018–5024.
 - [76] S.K. Singh, P.K. Rai, S. Mehta, R.K. Singh, G. Watal, Curative effect of cynodon dactylon against stz induced hepatic injury In diabetic rats, *Ind. J. Clin. Biochem.* 24 (2009) 410–413.
 - [77] N. Fekih, H. Allali, S. Merghache, F. Chaïb, D. Merghache, M. El Amine, N. Djabou, A. Muselli, B. Tabti, J. Costa, Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria, *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4 (2014) 97–103.
 - [78] I. Amri, L. Hamrouni, M. Hanana, S. Gargouri, T. Fezzani, B. Jamoussi, Chemical composition physicochemical properties, antifungal and herbicidal activities of *Pinus halepensis* Miller essential oils, *Biol. Agric. Hort.* 29 (2013) 91–106.
 - [79] S.A. Hashemi, S. Abediankenari, Suppressive effect of fig (*Ficus carica*) latex on esophageal cancer cell proliferation, *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 30 (2013) 93–96.
 - [80] N. Aghel, H. Kalantari, S. Rezazadeh, Hepatoprotective effect of *Ficus carica* leaf extract on mice intoxicated with carbon tetrachloride, *Iran J. Pharm. Res.* 10 (2011) 63–68.
 - [81] M.C. Vaghiasya, V. Bhatt Parth, J. Pandya Devang, Evaluation of anti-acne activity of *Ficus carica* as an evidence of current usage in herbal formulations, *Int. J. PharmTech Res.* 8 (2015) 356–359.
 - [82] N. Sedef, S. El, Karakaya, Olive tree (*Olea europea*) leaves: potential beneficial effects on human health, *Nutr. Rev.* 67 (2009) 632–638.
 - [83] H. Anis Ben, T. Mohamed, M. Riadh Ben, M.J. Raoudha, D. Mohamed, J. Samir, Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonila siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat, *Int. J. Food Microbiol.* 148 (2011) 66–72.
 - [84] J. Bakht, K. Shehla, M. Shafi, Antimicrobial potentials of fresh *Allium cepa* against gram positive and gram negative bacteria and fungi, *Pak. J. Bot.* 45 (2013) 1–6.
 - [85] A. Helen, K. Krishnakumar, P. Vijayammal, K. Augusti, Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa* Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol, *Toxicol. Lett.* 116 (2000) 61–68.
 - [86] E. Derwich, Z. Benziane, A. Boukir, Chemical composition of leaf essential oil of

- Juniperus phoenicea* and evaluation of its antimicrobial activity, *Int. J. Agri Biol.* 12 (2010) 199–204.
- [87] M.T.J. Khan, K. Ahmad, M.N. Alvi, N. Amin, B. Mansoor, F.Z. Asif, M. Khan, M. Jamshaid, Antibacterial and irritant activities of organic solvent extracts of agave americana linn., *Albizia lebbeck* benth. *Achyranthes aspera* linn. and *Abutilon indicum* linn – a preliminary investigation, *Pak. J. Zool.* 42 (2010) 93–97.
- [88] A. Abbaszadegan, A. Gholami, Y. Ghahramani, R. Ghareghan, M. Ghareghan, A. Kazemi, A. Iraj, Y. Ghasemi, Antimicrobial and cytotoxic activity of *Cuminum cyminum* as an intracanal medicament compared to chlorhexidine gel, *Iran Endod J.* 11 (2016) 44–50.
- [89] B. Deepa, C.V. Anuradha, Antioxidant potential of *Coriandrum sativum* L. seed extract, *Indian J. Exp. Biol.* 49 (2011) 30–38.
- [90] I.A. Al-Mofleh, A.A. Alhaide, J.S. Mossa, M.O. Al-Sohaibani, S. Rafatullah, S. Qureshi, Protection of gastric mucosal damage by *Coriandrum sativum* L. pre-treatment in Wistar albino rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22 (2006) 64–69.
- [91] P.Y.Y. Won, D.D. Kitts, Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts, *Food Chem.* 97 (2006) 505–515.
- [92] R.S. Suganya, K. Priya, B.S. Roy, Phytochemical Screening and antibacterial activity from *Nerium oleander* and evaluate their plant mediated Nanoparticle synthesis, *Int. Res. J. Pharm.* 3 (2012) 285–288.
- [93] A. Benahmed-Bouhafoun, S. Djed, F. Mouzaz, M. Kaid-harche, Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of *chamaerops humilis* L. extracts, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5 (2013) 741–744.
- [94] F. Gaamoussi, Z.H. Israili, B. Alyoufi, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of an aqueous extract of *Chamaerops humilis* leaves in obese, hyperglycemic and hyperlipidemic Meriones shawi rats, *Pak. J. Pharm. Sci.* 23 (2010) 212–219.
- [95] C. Nencini, A. Menchiari, G.G. Franchi, L. Micheli, *In vitro* antioxidant activity of aged extracts of some Italian allium species, *Plant Foods Hum. Nutr.* 66 (2011) 11–16.
- [96] M. Reddy, S. Gupta, M. Jacob, S. Khan, D. Ferreira, Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L, *Planta Med.* 73 (2007) 461–467.
- [97] E. Derwich, A. Manar, Z. Benziane, A. Boukir, GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco, *World Appl. Sci. J.* 8 (2010) 1267–1276.
- [98] T. Teklehaymanot, Ethnobotanical study of knowledge and medicinal plants use by the people in Dek Island in Ethiopia, *J. Ethnopharmacol.* 124 (2009) 69–78.
- [99] A. Berahou, A. Auhmanib, N. Fdil, A. Benharref, M. Jana, C.A. Gadhi, Antibacterial activity of *Quercus ilex* bark's extracts, *J. Ethnopharmacol.* 212 (2006) 426–429.
- [100] B.J. Azra, M. Shafi, Antimicrobial activity of *Nicotiana tabacum* using different solvents extracts, *Pak. J. Bot.* 44 (2012) 459–463.
- [101] S.K. Bhavsar, J.K. Shah JK, B. Mamta, Investigation into hepatoprotective activity of citrus limon, *Pharm. Biol.* 45 (2007) 303–3011.
- [102] S.A. Shinkafi, H. Ndanusa, Antibacterial activity of *citrus limon* on *Acne vulgaris*, *Int. J. Sci. Invent Today* 2 (2013) 397–409.
- [103] G.M. Sulaiman, N.N. Hussien, T.R. Marzoog, H.A. Awad, Phenolic content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanolic extract of *salix alba*, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 9 (2013) 41–46.
- [104] M. Nassiri-Asl, H. Hosseinzadeh, Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds, *Phytother. Res.* 23 (2009) 1197–1204.
- [105] J. Novak, K. Zitterl-Eglseer, S.G. Deans, C.M. Franz, Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity, *Flav. Fragr J.* 16 (2001) 259–262.
- [106] M. Nicoletti, C. Toniolo, A. Venditti, M. Bruno, M. Jemica, Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian *Cistus*: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*, *Nat. Prod. Res.* 29 (2015) 223–230.
- [107] I. Talibi, N. Amkraz, L. Askarne, F. Msanda, B. Saadi, E.H. Boudyach, H. Boubaker, B. Bouizgarne, A. Ait Ben Aoumar, Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker, *J. Med. Plant Res.* 5 (2011) 4332–4338.
- [108] T. Bahorun, E. Aumjaud, H. Ramphul, M. Rycha, A. Luximon-Ramma, F. Trotin, O.I. Arouma, Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts, *Nahrung* 47 (2003) 191–198.
- [109] P. Valentao, E. Fernandes, F. Carvalho, P.B. Andrade, R.M. Seabra, M.L. Bastos, Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity, *J. Agric. Food. Chem.* 49 (2001) 3476–3479.
- [110] L.M. Benhamza, Z. Djerrou, Y.H. Pacha, Evaluation of anti-hyperglycemic activity and side effects of *Centaureum erythraea* (L.) Pers. in rats, *Afr. J. Biotechnol.* 12 (2013) 6980–6985.
- [111] F. Chaabane, J. Boubaker, A. Loussaif, A. Neffati, S. Kilani-Jaziri, K. Ghedira, L. Chekir Ghedira, Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *Daphne gnidium* leaf extracts, *BMC Compl. Altern. Med.* 12 (2012) 153–163.
- [112] M. Samy, M. Emad, A. Khaled, A. Mohamed, M. Azza, Investigation of flavonoidal constituents and hepatoprotective activity of myoporium laetum, *Int. J. Acad. Res.* 3 (2011) 528–533.
- [113] R. Qureshi, G.R. Bhatti, R.A. Memon, Ethnomedicinal uses of herbs from northern part of Nara desert. Pakistan, *Pak. J. Bot.* 42 (2010) 839–851.
- [114] A. Ghorbani, Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra: north of Iran:(Part 1): general results, *J. Ethnopharmacol.* 102 (2005) 58–68.
- [115] M.F. Kadir, M.S. Bin Sayeed, M. Mia, Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers in Bangladesh for gastrointestinal disorders, *J. Ethnopharmacol.* 147 (2013) 148–156.
- [116] M.K. Islam, S. Saha, I. Mahmud, K. Mohamad, K. Awang, S. Jamal-Uddin, M.M. Rahman, J.A. Shilpi, An ethnobotanical study of medicinal plants used by tribal and native people of Madhupur forest area Bangladesh, *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 921–930.
- [117] A.M. Abbasi, M.A. Khan, M.H. Shah, M.M. Shah, A. Pervez, M. Ahmad, Ethnobotanical appraisal and cultural values of medicinally important wild edible vegetables of Lesser Himalayas-Pakistan, *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 9 (2013) 66.
- [118] S. Vitalini, M. Iriti, C. Puricelli, D. Ciuchi, A. Segale, G. Fico, Traditional knowledge on medicinal and food plants used in Val San Giacomo (Sondrio, Italy)-an alpine ethnobotanical study, *J. Ethnopharmacol.* 145 (2013) 517–529.
- [119] M.B. Rokaya, Z. Münzbergová, B. Timsina, Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal, *J. Ethnopharmacol.* 130 (2010) 485–504.
- [120] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activity of *Origanum compactum* extracts, *Phytotherapie* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1101-8>.
- [121] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Talbaoui, A. Et-Touys, K. Chatoui, H. Harhar, Y. Bakri, N. Dakka, Phytochemical screening: antiradical and antibacterial activities of *Cistus crispus* from Morocco, *J. Mater. Environ. Sci.* 8 (2017) 1560–1566.
- [122] A. Khouchlaa, A. El-Mehyaoui, A. Bouyahya, M. Tijane, Determination of phenol content and evaluation of in vitro litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract, *Phytotherapie* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1106-3>.
- [123] A. Khouchlaa, A. Bouyahya, S. Ait Lahcen, B. Youssef, D. Nadia, M. Tijane, Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *zizyphus lotus* l. extracts, *World J. Pharm. Res.* 6 (2017) 1354–1367.
- [124] A. Et-Touys, H. Fellah, F. Sebti, M. Mniouil, M. Aneb, H. Elboury, A. Talbaoui, N. Dakka, A. Sadak, Y. Bakri, *In vitro* antileishmanial activity of extracts from endemic moroccan medicinal plant *Salvia verbenaca* (L.) briq. ssp verbenaca maire (*S. eldestina* batt. non L), *Eur. J. Med. Plan.* 16 (2016) 1–8.
- [125] K. El Bairi EL-Meghawry, A. EL-Kenawy, R. Heshu, A. Guaadaoui, N. Gagnieszka, Natural products against cancer angiogenesis, *Tumor Biol.* 37 (2016) 14513–14536.
- [126] A. Bouyahya, Y. Bakri, E.O. Khay, F. Edaoudi, A. Talbaoui, A. Et-Touys, J. Abrini, N. Dakka, Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review, *Asian Pac. Trop. Dis.* 7 (2017) 57–64.
- [127] K. Chalise, N. Acharya, R.P.R. Gurung Bhusal, N.P. Gurung Skalko-Basnet, Antioxidant activity and polyphenolcontent in edible wild fruits from Nepal, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61 (2010) 425–432.
- [128] Z. Avramova, Transcriptional 'memory' of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes, *Plant J.* 83 (2015) 149–159.
- [129] C. Vriet, L. Hennig, C. Laloi, Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement, *Cell Mol. Life Sci.* 72 (2015) 1261–1273.
- [130] M. Alipor, M.J. Saharkhiz, Phytotoxic activity and variation in essential oil content and composition of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) during different phenological growth stages, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7 (2016) 271–278.
- [131] A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, A. El Yahyaoui El Idrissi, J. Abrini, N. Dakka, *In vitro* screening of antibacterial and antioxidant activities of essential oils from four moroccan medicinal plants, *Microbiol. Res. J. Int.* 18 (2017) 1–10.
- [132] R.A.A. Mothana, Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of the endemic Soqatraen *Boswellia elongata* Balf. f. and *Jatropha unicostata* Balf. f. in different experimental models, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 2594–2599.
- [133] A. Durazzo, Study approach of antioxidant properties in foods: update and considerations, *Foods* 6 (2017) 17–24.
- [134] W.M. Wu, L. Lu, Y. Long, T. Wang, L. Liu, Q. Chen, R. Wang, Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: a structure-activity insight, *Food Chem.* 105 (2007) 107–115.
- [135] E. Gregoris, E.R. Stevanato, Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 76–82.
- [136] A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini, N. Dakka, Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria, *Phytotherapie* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>.
- [137] V.A.C. Campos, M.J. Helvécio, D.F. Oliveira, H.W.P. Carvalho, A.R.T. Machado, A.A. Tirelli, Antibacterial activity of propolis produced by *Frieseomelitta varia*, *Cienc. Agrotecnol.* 35 (2011) 1043–1049.
- [138] H. Shbayou, B. Ababou, K. Boukachabine, A. Manresa, K. Zerouali, A. Souad, Chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia herbaalba* and *Mentha pulegium* essential oils, *J. Life Sci.* 8 (2014) 35–41.
- [139] E. Inaam, H. Sara, L. Saadia, E. Mohamed, L. Abdeslam, Study of antioxidant activity of essential oils extracted from Moroccan medicinal and aromatic plants, *Eur. J. Med. Plants* 10 (2015) 1–12.
- [140] E.O. Khay, A. Bouyahya, K. El Issaoui, S. Zinebi, J. Abrini, Study of synergy between *Mentha pulegium* essential oil, honey and bacteriocin-like inhibitory substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12, *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3 (2016) 29–35.



Research paper

***In vitro* antiproliferative activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco on several cancer cell lines**

Abdelhakim Bouyahya^{a,b,*}, Youssef Bakri^a, Abdeslam Et-Touys^a,
Inès Christelle Chadon Assemian^a, Jamal Abrini^b, Nadia Dakka^a

^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^b Biology and Health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek, Essaadi University, Tetouan, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Cancer
Oxidative stress
Medicinal plants
Anticancer activity
Antioxidant activity

ABSTRACT

Introduction: Ethnomedicinal and ecological approaches have been important in drug discovery, especially for medicinal plants. The North-West of Morocco (Ouezzane) has a Mediterranean climate and is characterized by a good ecological diversity. Traditionally, several medicinal plants that have been used to treat various diseases can be found in this region. The pharmacological valorization of these species could provide opportunities for different diseases including cancer. The aim of this study was to screen for anticancer and antioxidative properties of selected medicinal plants from this area of North-West of Morocco.

Methods: Organic extracts of five selected medicinal plants (*Origanum compactum* Benth., *Cistus crispus* L., *Centaurium erythraea* Rafin., *Myrtus communis* L. and *Arbutus unedo* L.) were tested for their anticancer and antioxidant properties. The anticancer activity was tested on three cancerous cell lines L20B, RD and Vero using MTT assay and the pharmacological selectivity index (PSI) was calculated using PBMC as the normal cell line. The antioxidant activity was evaluated using FRAP and ABTS assays.

Results: All plant extracts showed important anticancer activities with some variability. The *n*-hexane extract of *C. crispus* exhibited remarkable cytotoxic and specific effects on RD (IC₅₀ = 0.475 µg/mL; PSI = 36.48) and L20 B cell lines (IC₅₀ = 0.716 µg/mL; PSI = 24.20). Moreover, *O. compactum* *n*-hexane extract showed a selective antiproliferative activity on Vero cell line (IC₅₀ = 13.72 µg/mL; PSI = 11.46). Regarding the antioxidant activity, *M. communis* methanol extract showed an important antioxidant capacity measured by ABTS and ferric-reducing power assays with IC₅₀ values of 16.59 ± 0.12 µg/mL and 57.83 ± 0.76 µg/mL, respectively.

Conclusions: The findings did not reveal any correlation between antioxidant and anticancer effects thus showing specific targeted action against cancer cell lines. Based on the obtained results, these species could be considered as potential sources of anticancer and antioxidant compounds. However, further studies are necessary for the chemical characterization of the bioactive compounds and more investigation on their pharmacological properties is needed.

1. Introduction

Cancer is a complex disease characterized by various etiologies and multiple stages induced by the deregulation in genetic and epigenetic programs via several factors such as microbial infections, chemical carcinogenesis and hormonal perturbation [1–3]. When cells become cancerous, they continue to divide eternally without any response of signaling apoptosis or senescence. The treatment is actually based on chemotherapy and radiotherapy which target cells with rapid division and therefore cause several side effects on normal cells which are characterized also by rapid division [4]. Today, new approaches targeting tumor cells without affecting normal cells are needed. Targeted

cancer therapies based molecules from diverse sources that may target specific signaling molecular pathways in tumor cells without affecting normal cells.

On the other hand, oxidative stress caused by the excessive rate of reactive oxygen species such as superoxide anion (O₂⁻), nitric oxide (NO), hydroxy radical (OH) and peroxy radical (ROO) are involving in the pathogenesis of several pathologies including cancer [5]. Indeed, these reactivities induce DNA mutations and in the case of deficient DNA repairs or DNA damage, it becomes a prognostic or etiological role in cancer [6,7]. Targeting oxidative stress by antioxidants may also reduce the risk of cancer genesis. Therefore, the researches of antioxidants from natural sources play an interesting role in drug discovery.

* Corresponding author at: Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av Ibn battouta BP1014 Rabat, Morocco.
E-mail address: boyahya-90@hotmail.fr (A. Bouyahya).

Medicinal plants have shown several biological benefits against several diseases such as microbial infections, urolithiasis, cancer and oxidative stress-related diseases [8–16]. Pharmacological properties such as cancer chemopreventive and cytotoxic effects of medicinal plants are attributed to various phytochemical compounds such as flavonoids, alkaloids and terpenes present in its metabolites [17]. Polyphenol and flavonoid components are amongst the most widely occurring phytochemicals that have antioxidant properties [13]. Moreover, these compounds may scavenge the ROS by their antioxidant capacity and thus prevent the carcinogenesis [14]. In addition, several studies have shown their anticarcinogenic or anticancer activities by their capacity to induce apoptosis in numerous cancer cell lines due to their pro-oxidant effect [18–20].

The screening of new drugs from medicinal plants leads to the discovery of various bioactive molecules that possess antioxidant and anticancer properties. These discoveries were usually carried out using three philosophical approaches mainly used for drugs discovery from nature: the geographical approach, the ethnomedicine approach and the randomized approach [21–24]. The province of Ouezzane (North-West of Morocco) contains a wide variety of vegetation including medicinal plants. This richness of vegetation is due to its ecological variability and its Mediterranean climate. Moreover, we have underlined in a recent study the indigenous knowledge of medicinal plants in this area [25]. We have also shown the importance of this ethnomedicine approach to the success of pharmacological properties of selected medicinal plants [26–29]. Some of these species showed interesting anticancer properties. For example, *Origanum compactum* extracts inhibited the breast cancer line MCF7 [10]. The ethyl acetate extract from *O. compactum* proved cytotoxic effects against two human tumor lines (A549 lung tumor cell line and SMMC-7721 hepatic tumor cell line) [10]. Therefore, based on ecological and ethnomedicinal approaches, the aim of this study was the screening of medicinal plants from the province of Ouezzane with anticancer and antioxidative properties, to validate the ecological and ethnomedicinal approaches in anticancer drugs discovery. The antiproliferative activity was evaluated on two Embryonal Rhabdomyosarcoma cancerous (RD human and L20 B rat) and Monkey kidney cancerous cell lines (Vero). These cell lines are usually used in our laboratory for the preliminary screening of antiproliferative activities.

2. Materials and methods

2.1. Collection of plant material and preparation of organic extracts

Medicinal plants were collected from the province of Ouezzane (North-West of Morocco: 34° 47' 50" N and 5° 34' 56" W). The taxonomic identification was carried out by Pr. Ennabili Abdessalam (PAMSN Laboratory, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fes-Morocco) and the confirmation of some species was later made by means of the literature as described in our previous study [25]. Table 1 summarizes the scientific names, vernacular names, collected parts of the plant, medicinal use by the population of Ouezzane and other pharmacological effects related to these species. The collected parts were dried in dark at room temperature and were then ground to obtain the powder. This later has been extracted by maceration using *n*-hexane, ethanol and methanol. After 72 h of maceration, the plant extracts were filtered and the solvent was eliminated from the filtrate using a rotary evaporator (Heidolph Collegiate, LV28798826, New Jersey, USA).

2.2. Total phenolic and flavonoid contents

The total phenolic contents (TPC) and total flavonoid contents were determined using our previously reported method [31–34]. The TPC was estimated by the Folin Ciocalteu (AOCS, 1990) assay using gallic acid as standard. The TFC was estimated by the aluminum chloride (AlCl₃) colorimetric assay using quercetin as standard. The results of TPC are expressed as equivalent gallic acid/g of extract and the TFC are expressed as equivalent quercetin/g of extract.

Table 1
Medicinal plants studied (scientific name, family, part plant collected, medicinal use and pharmacological property).

Species (Family, Voucher specimen)	Vernacular name	Part plant collected	Medicinal use in Ouezzane province	Pharmacological properties
<i>M. communis</i> L. (Myrtaceae, RAB13)	Rihan	Leaves	The powder in oil poultice is applied on hair and scalp before sleeping for fall protection [25]	Antibacterial and antileishmanial effects [30,31]
<i>Arbutus unedo</i> L. (Ericaceae, RAB33)	Senou	Leaves	The decoction is taken orally as natural antidiabetic drugs [25]	Antibacterial and antioxidant activity [10]
<i>Gistus crispus</i> L. (Cistaceae, RAB40)	Ouekir	Leaves	The poultice is applied on the skin against wounds [25]	Antibacterial and antioxidant activity [32] Antileishmanial activity [10]
<i>Origanum compactum</i> Benth. (Lamiaceae, RAB01)	Za'ar	Flowering top	The decoction is used orally against stomach disorders and febrifuge [25]	Antibacterial and antioxidant activity [33] Antileishmanial activity [10]
<i>Centaureum erythraea</i> Rafin. (Gentianaceae, RAB42)	Gosset El Haya	Aerial part	The maceration is used against skin diseases by external use [25]	Antibacterial and antioxidant activity [34] Antileishmanial activity [10]
				Antibacterial, antileishmanial and antioxidant activity [35]

2.3. Antiproliferative activity

2.3.1. Cancer cell lines and culture medium

Tumor cell lines tested in this study were: RD: Human Embryonal Rhabdomyosarcoma cancerous cell lines (ATCC N^oCCL-136), L20B: Rat Embryonal Rhabdomyosarcoma cancerous cell lines (3T6Swiss albino, ATCC CCL96) and Vero: Monkey kidney cancerous cell lines (ATCC N^oCCL-81). These three species were obtained from the National Institute of Health, Rabat-Morocco. These species were cultivated as described by Aneb et al. [20]. Briefly, cells were grown as monolayers in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of Penicillin-Streptomycin mixture. PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) isolated and purified from human blood were used as positive control. Immediately after collection, blood samples were diluted with an equal volume of minimal essential medium RPMI and layered onto Ficoll (Pancoll, Biotect) for gradient separation of cells. The buffy coat layer was collected after centrifugation at 300 g for 30 min and then washed twice with RPMI. These cells were cultivated in RPMI supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of Penicillin-Streptomycin mixture. Cultures were maintained at 37 °C in 5% CO₂ and 100% of relative humidity atmosphere.

2.3.2. Cytotoxic activity of extracts

Before evaluating the anticancer activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density reached a sub-confluence threshold, cells were detached by trypsin-EDTA, washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 150 rpm for 15 min (4 °C). Cells were then resuspended in a fresh culture medium (MEM). The enumeration of cells was made by Malassez cell count using the trypan blue as exclusion coloring. Briefly, 100 µL of medium containing $3-4 \times 10^6$ cells/mL were placed in each well and cultured at 37 °C in 5% CO₂/humidified air for 24 h. After 24 h of incubation, cells were treated with crude extracts. Briefly, 100 µL of various concentrations of extracts (from 3.5 to 250 µg/mL; dissolved in 1% DMSO) were added to each well. Each concentration was tested in triplicate. DMSO was used as a final concentration never exceeding 1% which is not toxic to cells [35–37]. Microplates (96 well plates) were then incubated for 48 h at 37 °C in air condition of 5% CO₂. Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls. After 48 h of cells incubation with extracts, the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma) assay was used in order to evaluate the cell cytotoxicity. The test based on the biotransformation of the MTT into formazan crystals by mitochondrial deshydrogenases of living cells. The absorbance of the formazan will then be quantified by spectrophotometry at 550 nm. Optical density values (OD) are directly correlated with the metabolized intracellular MTT concentrations and are therefore proportional to the number of living cells. Briefly, 20 µL of MTT (5 mg/mL) were added to each micro-well and incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO₂. Tetrazolium salts are cleaved to formazan and the reaction was stopped by addition of 100 µL of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazan formed after tetrazolium dye reduction. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 550 nm using an ELISA plate reader. Cell viability was evaluated by determination of the percentage of cytotoxicity using the followed formula. The concentrations that inhibit the half of the cell population (IC₅₀) were obtained by modeling the % of cytotoxicity versus the concentration of extracts.

Cytotoxicity (%) = $100 \times (\text{Absorbance of untreated cells} - \text{Absorbance of treated cells}) / \text{Absorbance of untreated cells}$.

2.3.3. Determination of the pharmacological selectivity index

The pharmacological selectivity index (PSI) is an interesting

parameter that defines the balance between pharmacological effect of compounds and their toxicity. It corresponds to the highest active concentration against cancer cells without toxicity against normal cells. It was expressed as the ratio IC₅₀ normal cells (PBMC)/IC₅₀ cancer cell lines [37].

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. ABTS radical scavenging activity

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical-scavenging activity of the extract was determined according to the method described by El Jemli et al. [38] with some modifications. The ABTS radical cation was produced by the reaction between 5 mL of ABTS stock solution and 5 mL of 2.45 mM potassium persulfate (K₂S₂O₈) solution, stored in the dark at room temperature for 16 h. Before use, this solution was diluted with water to get an absorbance of 0.700 ± 0.015 at 734 nm and equilibrated at 30 °C. The plant extract at various concentrations were diluted with dimethyl sulfoxide (DMSO) to get sample solution. 5 mL of sample solution was homogenized with 195 mL of ABTS solution, the mixture was incubated at room temperature for 6 min and its absorbance was recorded at 734 nm. Blanks were run in each assay. ABTS scavenging ability was expressed as IC₅₀ (µg/mL) and the inhibition percentage calculated using the following formula: ABTS scavenging activity (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$. Where: A₀ is the absorbance of the control, and A₁ is the absorbance of the sample.

2.4.2. Reducing power assay

The ferric-reducing antioxidant power of plant extracts was investigated using the potassium ferricyanide-ferric chloride method as described by Bey-Ould Si Said et al. [39] and El Jamli et al. [38]. Briefly, one mL of the extract at different dilutions in pure methanol (10, 20, 30, 40 and 50 mg/mL) was mixed with phosphate buffer (1 mL, 0.2 M 'w/v', pH 6.6) and potassium ferri-cyanide [K₃Fe (CN)₆] (1 mL, 1% 'w/v'). The obtained mixture was incubated at 50 °C for 20 min to reduce ferricyanide into ferri-cyanide. A volume of 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added to the solution and centrifuged at 1000 rpm for 10 min. The supernatant was gathered and mixed with distilled water (1.5 mL) and FeCl₃ (150 µL, 0.1% 'w/v'), and the absorbance was recorded at 700 nm. The sample concentration providing 0.5 of absorbance (IC₅₀) was calculated by plotting absorbance against the corresponding sample concentration. Ascorbic acid and Trolox were used as standard compounds. The test was carried out in triplicate and IC₅₀ values were reported as means $\pm$ SD.

2.5. Data analysis

The statistical analysis was performed by a one-way ANOVA analysis of variance. The difference is considered as significant for $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Phenolic and flavonoid contents

The TPC and TFC of extracts are summarized in Table 2. All plant extracts possess important amounts of phenolic and flavonoid contents. However, we have noted variability between these amounts that depend on the plant extracts and the used solvents. Extracts from *A. unedo*, *O. compactum* and *M. communis* revealed more significant contents in TPC and TFC than extracts of *C. crispus* and *C. erythraea*. On the other hand, methanol extracts possess higher concentrations in TPC and TFC than ethanol and *n*-hexane extracts.

3.2. Anticancer activity

The evaluation of anticancer activity of five Moroccan medicinal

Table 2
Total Phenol Content (TPC) and Total Flavonoid Content (TFC).

Species	Extract	TPC	TFP	References
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	137.46 ± 0.35	27.24 ± 0.83	[31]
	EtOH	126.41 ± 1.03	18.41 ± 0.43	
	n-hexane	122.72 ± 1.16	31.24 ± 1.23	
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	141.72 ± 0.56	31.61 ± 0.59	[32]
	EtOH	133.61 ± 0.45	21.61 ± 1.65	
	n-hexane	94.51 ± 0.08	24.76 ± 0.70	
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	153.27 ± 0.68	52.72 ± 0.72	[34]
	EtOH	117.60 ± 1.12	27.60 ± 0.32	
	n-hexane	105.54 ± 0.35	29.64 ± 0.85	
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	53.27 ± 0.68	11.72 ± 0.72	[33]
	EtOH	37.60 ± 1.12	07.60 ± 0.32	
	n-hexane	35.54 ± 0.35	09.64 ± 0.85	
<i>Centaurium erythraea</i>	MeOH	105.54 ± 0.84	34.27 ± 1.17	[35]
	EtOH	69.42 ± 0.55	29.42 ± 1.05	
	n-hexane	95.61 ± 0.64	38.43 ± 1.30	

plant extracts was carried out on three tumor cell lines, namely RD, L20 B and Vero. Cancerous cell lines were exposed to decreasing concentrations of extracts ranging from 3.5 to 250 µg/mL. The MTT assay indicated that extracts revealed different cytotoxic activities towards the tested cancerous cell lines. To compare antiproliferative effects of extracts, we have expressed the results as the concentration that proved the half inhibition in cell viability (IC₅₀) compared to control (PBMC). The obtained results are listed in Table 3. As summarized, plant extracts showed important cytotoxic activities that were varied between plant extracts and between the types of extract in the same plant. Amongst these tested plant extracts, the *n*-hexane extract of *C. crispus* and *A. unedo* showed significant growth inhibitory effects in both RD and L20B. Their IC₅₀ values were 12.75 ± 0.82 and 27.83 ± 1.20 µg/mL, respectively on RD cells. For L20 B cell line, the IC₅₀ values of the same extracts were 17.16 ± 1.06 and 25.32 ± 1.26 µg/mL, respectively. Moreover, *O. compactum* and *A. unedo* *n*-hexane extracts revealed important cytotoxic effects against Vero cell line with IC₅₀ values of 13.72 ± 0.84 and 18.37 ± 1.23 µg/mL, respectively. The cytotoxic activity of extracts against normal cells (PBMC) showed significant toxicity of some extracts such as *A. unedo* *n*-hexane extract (IC₅₀ = 19.36 ± 1.03 µg/mL). Their pharmacological selectivity indexes were PSI = 0.69, PSI = 0.76 and PSI = 1.05 on RD, L20 B and Vero cell lines, respectively (Table 4). Regarding *C. crispus* and *O. compactum* *n*-hexane extracts, they have shown low cytotoxicity against normal cells with IC₅₀ values of 173.28 ± 2.13 and 157.28 ± 1.20 µg/mL respectively. Consequently, the *C. crispus* *n*-

Table 4
Pharmacological selectivity index (PSI) of medicinal plant extracts towards RD, L20 B and Vero cell lines.

Species	Extracts	Pharmacological selectivity index (PSI)		
		RD	L20B	Vero
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	3.36	1.844	0.928
	EtOH	nd	nd	nd
	n-hexane	2.60	0.594	nd
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	nd	nd	nd
	EtOH	1.39	nd	1.07
	n-hexane	0.69	0.76	1.05
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	2.16	1.35	5.59
	EtOH	nd	1.35	1.04
	n-hexane	3.67	2.12	11.46
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	1.04	1.40	nd
	EtOH	2.91	1.21	nd
	n-hexane	36.48	24.20	1.25
<i>Centaurium erythraea</i>	MeOH	nd	nd	nd
	EtOH	nd	nd	nd
	n-hexane	nd	nd	nd

nd: not determined.

hexane extract had good pharmacological selectivity indexes against RD (PSI = 36.48) and L20 B (PSI = 24.20) (Table 4). Furthermore, *O. compactum* *n*-hexane extract showed a high selectivity index toward Vero cells (PSI = 11.46).

3.3. Antioxidant activity

The antioxidant activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco was estimated using two complementary *in vitro* antioxidant tests: the FRAP assay that estimates the ferric-reducing capacity of the extracts and the TEAC assay evaluating the H donating or radical-scavenging ability of extracts using the ABTS radical cation. The concentrations providing 50% inhibitions (IC₅₀) are listed in Table 5. As summarized in Table 5, all extracts showed the ability to scavenge ABTS radical cation and ferric-reducing power. However, the antioxidant capacity varies depending on the plant, the type of extracts and the used method. In ABTS test, the *n*-hexane extract of *C. erythraea* showed important antioxidant capacity (32.07 ± 0.53 µg/mL), compared with reference antioxidants Trolox and ascorbic acid (*p* < 0.05), which showed IC₅₀ values of 37.82 ± 2.75 and 19.62 ± 0.87 µg/mL respectively. The methanol and *n*-hexane extracts of *M. communis* and the methanolic extract of *C. erythraea* showed also important antioxidant capacity to scavenge ABTS radical, but their IC₅₀ values were

Table 3
Proliferation inhibition concentration (IC₅₀ in µg/mL) values of medicinal plant extracts towards RD, L20B, Vero cancerous cell lines and PBMC (control) as determined by the MTT assay.

Species	Extracts	IC ₅₀ (µg/mL)			
		RD	L20B	Vero	PBMC
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	78.18 ± 2.51 ^b	142.65 ± 3.22 ^a	283.18 ± 4.72 ^a	263.06 ± 3.17 ^a
	EtOH	> 250	> 250	> 250	> 250
	n-hexane	39.42 ± 1.25 ^c	172.83 ± 3.04 ^a	> 250	102.72 ± 2.59 ^a
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	214.72 ± 4.06 ^a	> 250	> 250	> 250
	EtOH	174.28 ± 3.74 ^a	> 250	226.82 ± 3.14 ^a	243.83 ± 3.26 ^a
	n-hexane	27.83 ± 1.20 ^c	25.32 ± 1.26 ^c	18.37 ± 1.23 ^c	19.36 ± 1.03 ^c
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	70.63 ± 2.17 ^b	113.32 ± 3.28 ^a	27.36 ± 2.05 ^c	153.19 ± 2.31 ^a
	EtOH	> 250	179.24 ± 3.54 ^a	232.56 ± 5.37 ^a	243.64 ± 4.12 ^a
	n-hexane	42.82 ± 1.57 ^c	73.97 ± 2.77 ^b	13.72 ± 0.84 ^c	157.28 ± 1.20 ^a
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	218.62 ± 3.46 ^a	161.48 ± 2.34 ^a	> 250	227.56 ± 3.41 ^a
	EtOH	84.69 ± 2.73 ^b	203.35 ± 4.72 ^a	> 250	246.81 ± 3.06 ^a
	n-hexane	12.75 ± 0.82 ^c	17.16 ± 1.06 ^c	137.82 ± 2.56 ^a	173.28 ± 2.13 ^a
<i>Centaurium erythraea</i>	MeOH	218.47 ± 3.91 ^a	219.83 ± 3.25 ^a	248.52 ± 2.73 ^a	> 250
	EtOH	> 250	> 250	> 250	> 250
	n-hexane	> 250	210.67 ± 4.48 ^a	> 250	174.56 ± 3.24 ^a

Different letters indicate significant differences (*p* ≤ 0.05; *n* = 3).

Table 5
IC₅₀ values (μg/mL) of plant extracts and controls (ascorbic acid and Trolox).

Species	Extracts	IC ₅₀ (μg/mL)	
		FRAP	ABTS
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	16.59 ± 0.12 ^c	57.83 ± 0.76 ^b
	EtOH	41.97 ± 0.64 ^b	142.32 ± 3.04 ^b
	<i>n</i> -hexane	23.08 ± 1.56 ^c	48.42 ± 1.24 ^b
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	135.02 ± 1.08 ^b	188.73 ± 2.44 ^a
	EtOH	> 250	> 250
	<i>n</i> -hexane	132.76 ± 2.56 ^a	166.13 ± 3.52 ^a
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	124.83 ± 1.22 ^a	169.06 ± 3.27 ^a
	EtOH	> 250	> 250
	<i>n</i> -hexane	182.11 ± 0.06 ^a	138.45 ± 1.19 ^a
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	119.47 ± 0.84 ^a	156.26 ± 3.55 ^a
	EtOH	173.94 ± 2.68 ^a	> 250
	<i>n</i> -hexane	> 250	> 250
<i>Centaureum erythraea</i>	MeOH	27.28 ± 0.74 ^c	63.48 ± 2.14 ^b
	EtOH	98.63 ± 2.82 ^c	232.75 ± 8.63
	<i>n</i> -hexane	17.43 ± 0.07 ^c	32.07 ± 0.53 ^c
Positive controls	Trolox	85.45 ± 1.36 ^b	37.82 ± 2.75 ^c
	Ascorbic acid	47.63 ± 0.58 ^b	19.62 ± 0.87 ^c

Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$; $n = 3$).

significantly different ($p > 0.05$) with positive controls (Table 5). Regarding the FRAP assay, a high ferric reductive capacity was obtained with the methanol extract of *M. communis* ($16.59 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$) and *n*-hexane extract of *C. erythraea* ($17.43 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$). Their IC₅₀ values were significantly important ($p > 0.05$) than antioxidant standards (Trolox and ascorbic acid).

4. Discussion

Medicinal plants synthesize several bio-organic molecules as secondary metabolites. These compounds have various chemical structures such as terpenoids, simple phenols, phenolic acids, flavonoids and alkaloids. Because of their physiological functions in plants, these chemical classes possess attention for several biological properties such as antibacterial, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities [38,40–42]. In recent years, phenolic compounds such as polyphenols and flavonoids extracted from medicinal plants have demonstrated interesting antioxidant and antiproliferative effects. In this study, five medicinal plants from the North-West of Morocco have been selected based on ethnobotanical approach [25]. The collected plants have subjected to the extraction by maceration using three organic solvents (methanol, ethanol and *n*-hexane). It has shown that these species possessed important charges in polyphenol and flavonoid contents (Table 2). These results are interesting compared with several studies regarding the total phenol and flavonoid contents in medicinal plant extracts [8,15]. This may explain the widespread traditional uses of these species.

On the other hand, the variability of chemical compounds of medicinal plants depends on various factors such as the geographical location, the climate, the method of extraction, the organ extracted and the phenological stage of the studied plant [25,43–45]. These factors could influence and regulate the synthesis of secondary metabolites in medicinal plants. Indeed, it has been shown that the environmental factors and developmental stages may induce the modification in genes expression thus inducing the variation in enzymes responsible for secondary metabolite metabolism [46].

Cancer is a complex disease with various etiologies and multiple stages. Actually, the treatment is essentially based on chemotherapy and radiotherapy. These treatments target cells with rapid division and therefore cause several side effects on normal cells which are also characterized by rapid division [4]. The screening of bioactive molecules from diverse sources that may target specific signaling molecular pathways in tumor cells without affecting normal cells is important.

Polyphenol and flavonoid compounds from medicinal plants have been known to target specific pathways against cancer cells growth [40,11].

In this context, phenolic extracts of five selected medicinal plants were screened for their anticancer activity against three cancerous cell lines. Extracts showed significant cytotoxicity against tested cells and some cytotoxic effects on normal cells (PBMC). However, pharmacological studies on cancer diseases focused today on the specific selectivity of drugs against cancer cells without side effects on normal cells. The anticancer activity of *O. compactum n*-hexane extract against Vero cell line and *n*-hexane extract of *C. crispus* against L20 B and RD cell lines characterized by high selectivity indexes (Table 4). The results have indicated that these extracts have specific targets on the tested cancerous cells. Previous studies have demonstrated the anticancer activity of *O. compactum* ethyl acetate extract on human tumor cell line A549 and SMMC-7721 [47]. The cytotoxicity of this extract was due to the induction of apoptosis by the activation of caspase enzymes mediated by the modulation of Bcl-2 family proteins. In another early work, Chaouki et al. [48] have shown cytotoxic effects of *O. compactum* ethyl acetate and chloroform extracts against human breast cancer cell line MCF-7. However, *C. crispus* has not yet been tested for its anticancer properties. *O. compactum* and *C. crispus* possess important charges of phenolic compounds such as flavonoids. Indeed, flavonoids have reported having antiradical effects, with high capacity to scavenge free radical as reactive oxygen species [49,50]. Moreover, ROS have long been known to be implicated in the genesis of several diseases including cancer [51]. Antitumor mechanism of flavonoids based on their antioxidant properties is due to their effects of free radicals scavenging, inhibition of enzymes involved in ROS formation, and the prevention of cellular and extracellular compounds oxidation [50]. However, no significant correlation has been indicated between antioxidant and cytotoxic activities of plant extracts. This observation indicates thus that *n*-hexane extract of *O. compactum* and *C. crispus* have other specific targets on RD and Vero cell lines. Indeed, flavonoids possess several cytotoxic mechanisms on cancer cell lines. They may modulate pathways of cancer proliferation, arrest the cell cycle, induce the apoptosis and inhibit the angiogenesis [40,49,52].

The antioxidant activity of phenolic compounds such as polyphenols and flavonoids is largely due to their redox properties which make them act as reducing agents, hydrogen donors, singlet oxygen quenchers as well as potential metal chelators [53]. Furthermore, the oxidative stress is largely implicated in several human pathologies such as cancer, inflammation and neurodegenerative diseases [7]. Our plant extracts were subjected to the evaluation of their antioxidant activity using ABTS and FRAP assays. The screening of this activity leads to remarkable results (Table 5). The ABTS radical scavenging test is a good index to reveal the antioxidant activity of the tested samples [54]. The scavenging of the ABTS radical by our extracts was found to be interesting compared with references. The results showed that *C. erythraea* extracts presented high capacities to scavenge the ABTS radical. Other studies have revealed an interesting capacity of *C. erythraea* extracts to scavenge DPPH free radical [55,56]. However, it has been reported that some compounds which have ABTS radical scavenging activity did not show DPPH scavenging activity. In fact, the solubility of extracts in diverse solvents and the stereoselectivity of the radicals are two factors that significantly affect the ability of extracts to react with radicals [53]. The difference in the antioxidant activity between plant extracts is certainly due to the variability in chemical functionality compounds. However, the difference between antioxidant assays is due to the mechanisms of which an extract reacts with the used method. Indeed, the FRAP assay estimates the ferric-reducing capacity while the ABTS assay evaluates the H donating and radical scavenging capacity. It has been reported that phenolic compounds such as flavonoids neutralize free radicals by donating one of their own electrons. In fact, phenolic compounds possess hydroxyl groups responsible for their antioxidant properties. These compounds have the ability to scavenge free radicals increased with the number of hydroxyl groups and catechol moieties in

the molecule [57]. In addition, the localization of the hydroxyl groups in molecules could influence their antioxidant properties [58]. This study clearly showed that the antioxidant activity of the North-West Moroccan medicinal plants was tightly dependent on the polyphenol and flavonoid contents which themselves depend on several factors such as plant species, used solvents, antioxidant assays. This should be taken into consideration during the preparation of the extracts.

5. Conclusion

The anticancer and antioxidant activities of organic extracts have shown interesting results. Phenolic extracts from some species such as *C. crispus* and *O. compactum* showed specific anticancer action against cancer cell lines. The antiproliferative activity was not correlated with the antioxidant effect suggesting thus other specific targets of phenolic compounds on cancer cell lines. These findings showed that phenolic extracts from Moroccan medicinal plants can be a good source for screening anticancer drugs. However, further investigations are necessary for the isolation of bioactive compounds and the study of their mode of action on cancer cell lines.

Financial support

None.

Conflicts of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Acknowledgements

We thank the National Center for Scientific and Technical Research (CNRST) from Morocco for the support of the doctoral grant of Bouyahya Abdelhakim.

References

- [1] B. Schuster-Bockler, B. Lehner, Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells, *Nature* 488 (2012) 504–507.
- [2] F. Supek, B. Lehner, Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome, *Nature* 521 (2015) 81–84.
- [3] E. Wynendaele, F. Versbeke, M. D'Hondt, A. Hendrix, C.V. De Wiele, C. Burvenich, K. Peremans, O. De Wever, M. Bracke, B. Spiegeleer, Crosstalk between the microbiome and cancer cells by quorum sensing peptides, *Peptides* 64 (2015) 40–48.
- [4] D.R. Mans, A.B. da Rocha, G. Schwartzmann, Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds, *Oncologist* 5 (2000) 185–198.
- [5] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health, *Pharmacogn. Rev.* 4 (2010) 118–126.
- [6] C.T. Lin, W.H. Lin, K.D. Lee, P.Y. Tzeng, DNA mismatch repair as an effectors for promoting phorbol ester-induced apoptotic DNA damage and cell killing: implications in tumor promotion, *Int. J. Cancer* 119 (2006) 1776–1784.
- [7] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.* 66 (2016) 7–30.
- [8] A. Et-Touys, H. Fellah, M. Mniouil, A. Bouyahya, N. Dakka, E.H. Abdennebi, A. Sadak, Y. Bakri, Screening of antioxidant: antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco, *Br. Microbiol. Res. J.* 16 (2016) 1–10.
- [9] A. Bouyahya, Y. Bakri, E.O. Khay, F. Edaoudi, A. Talbaoui, A. Et-Touys, J. Abrini, N. Dakka, Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review, *Asian Pac. Trop. Dis.* 7 (2017) 57–64.
- [10] A. Bouyahya, F.E. Guaouguaou, N. Dakka, Y. Bakri, Pharmacological activities and medicinal properties of endemic Moroccan medicinal plant *Origanum compactum* (Benth) and their main compounds, *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 7 (2017) 628–640.
- [11] A. Bouyahya, J. Abrini, J.Y. Bakri, Y.N. Dakka, Essential oils as anticancer agents: news on mode of action, *Phytoth* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-016-1058-z>.
- [12] J. Wu, Y. Wu, B.B. Yang, Anticancer activity of *Hemileya amabilis* extract, *Life Sci.* 71 (2002) 2161–2170.
- [13] O.E. Adebisi, F.O. Olayemi, T. Ning-Hua, Z. Guang-Zhi, In vitro antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*, *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 6 (2017) 10–14.
- [14] M.A. Rahman, S. Bjada, J. Akhtar, Evaluation of anticancer activity of *Cordia dichotoma* leaves against a human prostate carcinoma cell line, PC3, *J. Tradit. Compl. Med.* (2016) 1–7.
- [15] A. Khouchlaa, A. Bouyahya, S. Ait Lahcen, Y. Bakri, N. Dakka, M. Tijane, Phytochemical screening: evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *Zizyphus lotus* l. extracts, *World J. Pharm. Res.* 6 (2017) 1354–1367.
- [16] A. Khouchlaa, A. El-Mehyaoui, A. Bouyahya, M. Tijane, Determination of phenol content and evaluation of in vitro litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract, *Phytoth* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1106-3>.
- [17] S. Kumar, R. Kumar, A. Dwivedi, A.K. Pandey, In vitro antioxidant: antibacterial and cytotoxic activity and in vivo effect of *Syngonium podophyllum* and *Eichhornia crassipes* leaf extracts on isoniazid induced oxidative stress and hepatic markers, *BioMed. Res. Int.* 2014 (2014) 1–11.
- [18] L. Fisher, T. Ianiro, F. Lau, H. Wang, B. Daggy, Synergistic effects of phenolic mixtures in human cell models of aging, *FASEB J.* 29 (2015) 608–636.
- [19] D. Prochazkova, I. Bousova, N. Wilhelmova, Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia* 82 (2011) 513–523.
- [20] M. Aneb, A. Talbaoui, A. Bouyahya, H. El Boury, S. Amzazi, A. Benjouad, N. Dakka, Y. Bakri, In vitro cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*, *Eur. J. Med. Plant* 16 (2016) 1–13.
- [21] A.N. Albuquerque, N. Hanazaki, As pesquisas etnobotânicas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas, *Bras. J. Pharm.* 16 (2006) 678–689.
- [22] M. Heinrich, P. Bremner, Ethnobotany and ethnopharmacy their role for anti-cancer drug development, *Curr. Drug Targets* 7 (2006) 239–245.
- [23] M. Heinrich, Ethnopharmacy and natural product research: multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age, *Phytochem. Lett.* 1 (2007) 1–5.
- [24] O.O.A. Guirado, A.C. Cuéllar, Strategies for the selection of medicinal plants to be studied, *Rev. Cuba. Plant Med.* 13 (2008) 3.
- [25] J. Bouyahya, A. Abrini, Y. Et-Touys, N. Bakri, Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities, *Eur. J. Integr. Med.* 13 (2017) 9–25.
- [26] A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, A. El Yahyaoui El Idrissi, J. Abrini, N. Dakka, In vitro screening of antibacterial and antioxidant activities of essential oils from four Moroccan medicinal plants, *Microbiol. Res. J. Int.* 18 (2017) 1–10.
- [27] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Et-Touys, F. Lagrouh, N. Dakka, Y. Bakri, Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of Moroccan honey samples, *Phytoth* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1122-3>.
- [28] A. Bouyahya, N. Dakka, A. Talbaoui, A. Et-Touys, H. El-Boury, J. Abrini, Y. Bakri, Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic *Origanum compactum* (Benth), *Ind. Crop Prod.* 108 (2017) 729–773.
- [29] E.O. Khay, A. Bouyahya, K. El Issaoui, S. Zinebi, J. Abrini, Study of synergy between mentha pulegium essential oil, honey and bacteriocin-like inhibitory substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12, *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3 (2016) 29–35.
- [30] A. Bouyahya, A. Et-Touys, Y. Bakri, T. Ahmed, H. Fellah, J. Abrini, N. Dakka, Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities, *Microb. Pathog.* 111 (2017) 41–49.
- [31] A. Bouyahya, J. Abrini, E.O. Khay, S. Charfi, N. Boujida, A. El Harsal, A. Talbaoui, A. Et-Touys, Y. Bakri, N. Dakka, In vitro antibacterial of organic extracts from North-West Moroccan medicinal plant *Myrtus communis* (L.), *Br. Biotechnol. J.* 16 (2016) 1–9.
- [32] A. Bouyahya, N. El Moussaoui, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts, *Br. Biotechnol. J.* 14 (2016) 1–10.
- [33] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Talbaoui, A. Et-Touys, K. Chatoui, H. Harhar, Y. Bakri, N. Dakka, Phytochemical screening, antiradical and antibacterial activities of *Cistus crispus* from Morocco, *J. Mater. Environ. Sci.* 8 (2017) 1560–1566.
- [34] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Origanum compactum* extracts, *Phytoth* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1101-8>.
- [35] A. Bouyahya, Y. Bakri, O. Belmehdi, A. Et-Touys, J. Abrini, N. Dakka, Phenolic extracts of *Centaureum erythraea* with novel antiradical: antibacterial and antileishmanial activities, *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 7 (2017) 433–439.
- [36] L.F.O. Oliveira, A.O. Schubach, M.M. Martins, S.L. Passos, R.O. Oliveira, M.C. Marzochi, C.A. Andrade, Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World, *Acta Trop.* 118 (2011) 87–96.
- [37] R. Essid, F.Z. Rahali, K. Msaadi, I. Sghair, M. Hammami, A. Bourabine, K. Aoun, F. Limam, Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia, *Ind. Crop Prod.* 77 (2015) 795–802.
- [38] M. El Jemli, K. Kamal, I. Marmouzi, Z. Doukhal, E.H. Boudida, D. Touati, R. Nejari, L. El Guessabi, Y. Cherrah, K. Alaoui, Chemical composition, acute toxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Tetralin ariculata* L., *J. Tradit. Complement. Med.* 28 (2016) 1–287.
- [39] H. Bey-Ould Si Said, L. Haddadi-Guemghar, P. Boulekbache-Makhoulouf, H. Peggy Rigou, A. Remini, K. Adjaoud, K. Nabya, Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits, *Ind. Crop Prod.* 89 (2016) 167–175.
- [40] K. El Baidi, A. El-Meghawry El-Kenawy, R. Heshu, A. Gaaadaoui, N. Agnieszka, Natural products against cancer angiogenesis, *Tumor Biol.* 37 (2016) 14513–14536.
- [41] F. El Hachimi, C. Alfaiz, A. Bendriss, Y. Cherrah, K. Alaoui, Anti-inflammatory activity of the seed oil of *Zizyphus lotus* (L.) Desf., *Phytoth* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-016-1056-1>.

- [42] H. Ghazghazi, C. Aouadhi, L. Riahi, A. Maaroufi, B. Hasnaoui, Fatty acids composition of Tunisian *Ziziphus lotus* L. (Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts, *Nat. Prod. Res.* 28 (2014) 1106–1110.
- [43] K. Aboukhalid, A. Lamiri, M. Agacka-Moldoch, T. Doroszewska, A. Douaik, M. Bakha, J. Casanova, F. Tomi, N. Machon, C. Al Faiz, Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco, *Chem. Biodev.* 13 (2016) 1126–1139.
- [44] C. Almoui Jamali, A. Kasrati, K. Bekkouche, L. Hassani, H. Wohlmuth, D. Leach, A. Abbad, Phenological changes to the chemical composition and biological activity of the essential oil from Moroccan endemic thyme (*Thymus maroccanus* Ball), *Ind. Crop Prod.* 49 (2013) 366–372.
- [45] A. Angioni, A. Barra, A. Coroneo, S. Dessi, P. Cabras, Chemical Composition, Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4364–4370.
- [46] D. Crisp, S.R. Ganguly, O. Eichten, B.J. Borevitz, Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics, *Sci. adv.* 2 (2016), <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1501340>.
- [47] W. Chaouki, B. Meddah, M. Hmamouchi, Antiproliferative activity of *Origanum compactum* extract on lung cancer and hepatoma cells, *Arab. J. Med. Plant.* 1 (2015) 1.
- [48] W. Chaouki, D.Y. Leger, J. Eljastimi, J.L. Beneytout, M. Hmamouchi, Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7, *Pharm. Biol.* 48 (2010) 269–274.
- [49] D.I. Hertzog, O.S. Tica, Molecular mechanisms underlying the anti-cancerous action of flavonoids, *Curr. Health Sci. J.* 38 (2012) 145–149.
- [50] N. Han, M. Bakovic, Biologically active triterpenoids and their cardioprotective and anti-inflammatory effects, *J. Bioanal. Biomed.* 12 (2015) 1–11.
- [51] G. Waris, H. Ahsan, Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions, *J. Carcinog.* 5 (2006) 14.
- [52] P. Katyal, N. Bhardwaj, R. Khajuria, Flavonoids and their therapeutic potential as anticancer agents; biosynthesis, metabolism and regulation, *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2014) 2188–2216.
- [53] R.J. Elias, L. Zhou, Factors influencing the antioxidant and pro-oxidant activity of polyphenols in oil-in-water emulsions, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2906–2915.
- [54] L.C. Wu, H.W. Hsu, Y.C. Chen, C.C. Chiu, Y.I. Lin, J.A. Ho, Antioxidant and anti-proliferative activities of red pitaya, *Food Chem.* 95 (2006) 319–327.
- [55] P. Valentao, E. Fernandes, F. Carvalho, P.B. Andrade, R.M. Seabra, M.L. Bastos, Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3476–3479.
- [56] V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic, M. Jukic, Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food Chem.* 94 (2006) 550–557.
- [57] W.M. Wu, L. Lu, Y. Long, T. Wang, L. Liu, Q. Chen, R. Wang, Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: a structure-activity insight, *Food Chem.* 105 (2007) 107–115.
- [58] E. Gregoris, R. Stevanato, Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 76–82.

***In vitro* antiproliferative and antidermatophyte activities of essential oils from three Moroccan medicinal plants**

Abstract

The main of this study is to evaluate the anticancer and anti-dermatophyte activities of *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis* and *Lavandula stoechas* essential oils. The cytotoxic effect was carried out on cancer cell lines Vero, L20B and RD using MTT colorimetric assay. The anti-dermatophyte activity was tested on *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton mentagrophytes* using direct contact method. Essential oils of three aromatic species are rich in bioactive compounds such oxygenated and no-oxygenated monoterpenes. *Lavandula stoechas* essential oil showed interesting anticancer activity against RD ($IC_{50}=19.03\pm 28.05$ $\mu\text{g/mL}$) and L20B ($IC_{50}=33.84\pm 1.72$ $\mu\text{g/mL}$). Moreover, *M. pulegium* essential oil had an important cytotoxic effect against Vero cell line ($IC_{50}=60.21\pm 1.9$ $\mu\text{g/mL}$). The best pharmacological selectivity indexes were obtained with *L. stoechas* essential oil on RD (11.098) and L20B (6.241) cell lines. The essential oil of *R. officinalis* showed remarkable anti-dermatophyte effects than *L. stoechas* and *P. pulegium*. The IC_{50} values of *R. Officinalis* essential oil against *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* and *T. tonsurans* were respectively 0.53, 0.60 and 0.64 % (v/v). The findings of these results showed that essential oils of *L. stoechas* and *M. pulegium* are a good source for anticancer drug discovery and the essential oil of *R. officinalis* is a promising source as anti-dermatophyte agents. Whereas, further studies investigating the pharmacological properties on other type of cancer cell lines and fungal species are necessary. Moreover, investigations regarding the mechanism of action of these oils and their major compounds are also necessary.

Key-words: Essential oil, *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas*, anticancer activity, anti-dermatophyte activity.

1. Introduction

Cancer is a complex disease caused by a deregulation in cellular homeostasis. This disease constitutes the important cause of mortality and morbidity worldwide. Moreover, the epidemiological studies have reported a correlation between the distribution of cancer diseases and health levels in developing countries [1]. The treatments used against cancer based mainly on chemical drugs (chemotherapy) and rays (radiotherapy). However, the chemotherapy causes several side effects on normal cells. Today, new approaches have developed to target specifically cancer cells without affecting normal cells. These approaches based on screening of molecules that may target pathways implicated in cell transformation, cancer angiogenesis and cancer vascularization.

On the other hand, dermatophytes are a group of fungi called pathogenic keratin digesting fungi that cause dermatophytosis for human and animals [2]. These infections are caused by several fungi species including those of some fungal genera such as *Trichophyton*, *Microsporum*, and *Epidermophyton* that infect the skin, the hair and the nails. These infections are of public health importance because of their transmissibility from human to human or from animal to human [3]. For human, these infections affect in particular children and adults [4] and the treatments are poorly efficacies and the used drugs showed many side effects [5]. Moreover, dermatophytes strains have developed numerous mechanisms to resist against used drugs [6].

The searches on anticancer and antifungal drugs take attention today. Natural products constitute a veritable source for identifying and isolation bioactive molecules that possess several pharmacological properties [7, 8, 9, 10]. Indeed, numerous medicaments have been developed to treat several pathologies such as cancer, infectious diseases and cardiovascular complications and diabetes [11]. Medicinal plants have several secondary metabolites which contain numerous bioactive molecules such as terpenoids, flavonoids, tannins and phenolic acids [11]. Essential oils are complex natural compounds synthesized by aromatic plants. They have several chemical structures which offer them numerous biological properties such as antibacterial, antioxidant antileishmanial and anticancer properties [12, 13, 14, 15, 16, 17].

Morocco is rich in vegetation including medicinal plants, with an important rate by endemic medicinal plants. These medicinal plants have been used since antiquity to fight against several diseases such as diarrhea, inflammatory diseases and infections related diseases, etc [18]. Amongst the best area of Morocco, the North-West of Morocco, this is very rich in medicinal plants. Thanks to geographical location and the Mediterranean climate of this region that offer an exceptional habitat for developing medicinal plants with some endemic species. In our previously work of ethnopharmacological study on the use of medicinal plants in this area, we have revealed remarkable findings [18].

In this context, we continue the identification and the characterization of medicinal plant products from the North-West of Morocco that possess important pharmacological properties. Three medicinal plants belonging to Lamiaceae family were chosen: *Lavandula stoechas*, *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis*. These medicinal plants showed remarkable pharmacological properties such as antibacterial, antioxidant and antileishmanial properties [16]. However, the aims of this study were the evaluation of anticancer and antidermatophyte activities of essential oils isolated from these species.

2. Materials and methods

2.1. Extraction of essential oils and chemical composition

The aerial parts of *L. stoechas*, *M. pulegium* and *R. officinalis* were collected from Ouezzane province (North-West of Morocco). The plant was identified by Pr. Ennabili Abdessalam (PAMSN Laboratory, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Sidi Mohamed Ben Abdellah University of Fes, Morocco). The samples were air dried at room temperature in the shade. The extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation method using Clevenger-type apparatus. The obtained oils were dried by anhydrous sodium sulphate, weighed and stored at 4°C until use. Essential oils were determined in our previous studies using analyzed by GC-MS [16].

2.2. Evaluation of Anticancer Activity

2.2.1. Cancer cell lines and culture medium

Tumor cell lines tested in this study are: RD: Humain Embryonal Rhabdomyosarcoma cancerous cell lines (ATCC N°CCL-136), L20B: Rate Embryonal Rhabdomyosarcoma cancerous cell lines (3T6Swiss albino, ATCC CCL96) and Vero: Monkey kidney cancerous cell lines (ATCC N°CCL-81). These three species were obtained from the National Institute of Health, Rabat-Morocco. These species are cultivated as described by Aneb et al. [19]. Briefly, Cells were grown as monolayers in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% Penicillin-Streptomycin mixture. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolated from human blood are used as positive control. Immediately after collection, blood samples were diluted with an equal volume of minimal essential medium RPMI and layered onto Ficoll (Pancoll, Biotech) for gradient separation of cells. The buffy coat layer was collected after centrifugation at 300 g for 30 min and then washed twice with RPMI. These cells were PBMC were resuspended and cultivated in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 1% Penicillin-Streptomycin mixture. Cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂ and 100% relative humidity atmosphere.

2.2.2. Cytotoxic activity

Before evaluating the anticancer activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density was reached a sub-confluence threshold, cells were attached by trypsin-EDTA, washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 150rpm for 15 min (4°C). Cells were the resuspended in fresh culture medium (MEM). The enumeration of cells was made by Malassez cell count using the trypan blue as exclusion coloring.

Before treatment with extracts, 100 µL medium MEM containing 3-4 x 10⁶ cells/mL were placed in each well containing MEM and cultured at 37°C in 5% CO₂/ humidified air for 24 h. After 24h incubation, cells were treated with crude extracts. Briefly, 100 µL of various concentrations of extracts (from 3.5 to 250 µg/mL) dissolved in 1% DMSO were added to each well in triplicate. DMSO was used at a final concentration never exceeding 1% which is not toxic to parasites [20]. Microplates were then incubated for 48 h at 37°C in air condition of 5% CO₂. Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls.

2.2.3. Cell viability assay

For evaluating the cell viability, we have used the MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2,5-diphényl tetrazolium bromide) assay. The test based on the biotransformation of the MTT into formazen crystals by mitochondrial deshydrogenases of living cells. The absorbance of the formazen will then be quantified by spectrophotometry at 550 nm. Optical density values (OD) are directly correlated with the metabolized intracellular MTT concentrations and are therefore proportional to the number of living cells. Briefly, 20 µL of MTT (5 mg/mL) were added to each micro-well and incubated for 3h at 37°C in 5% CO₂. Tetrazolium salts are cleaved to formazen and the reaction was stopped by addition of 100 µL of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazen formed after tetrazolium dye reduction. After 30 minutes of incubation at room

temperature, absorbance was measured at 560 nm using an ELISA plate reader. Cell viability was evaluated by determination of the percentage of cytotoxicity using the followed formula. The concentrations that inhibit the half of the cell population (IC₅₀) are obtained by modeling the percentage of cytotoxicity versus concentration of extracts.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = 100 \times (\text{Absorbance untreated cells} - \text{Absorbance treated cells}) / \text{Absorbance untreated cells}.$$

2.2.4. Determination of the pharmacological selectivity index

The pharmacological selectivity index (PSI) is an interesting parameter that defines the balance between pharmacological effect of compounds and their cytotoxicity. It corresponds to the highest active concentration against cancer cells without toxicity against normal cells. It was expressed as the ratio IC₅₀ normal cell lines (PBMC)/IC₅₀ cancer cells.

2.3. Antifungal activity

3.3.1. Essential oils preparation

The antifungal activity of OCEO was evaluated against dermatophytes using the direct contact method. Briefly, the emulsification of essential oils was carried out by tween 20 in order to obtain in the medium a homogeneous distribution of the compounds in the state scattered [21]. After that, the media of different concentrations of 0.05%-0.25%-0.5% and 0.75% EO with tween 20 are incorporated into the PDA culture medium (Potato Dextrose Agar).

3.3.2. Seeding and incubation of Petri dishes

The mixture of each medium is poured at a rate of 20 ml per dish. Using a sterile tip, fungal culture fragments about 8 mm in diameter are cut from a 7-day mycelial carpet and deposited in the center of the prepared Petri dishes which are then incubated at 25°C for 7 days. For each concentration, three replicates are prepared in the same manner and the experiment is repeated twice, in order to minimize the experimental error. To evaluate the antifungal activity of three essential oils, a measurement of the inhibition diameter is always carried out in comparison with that of the controls. The results of antifungal activity are expressed as the percentage inhibition (PI%) calculated by the following formula:

$$\text{PI(\%)} = 100 \times (D_c - D_e) / D_c$$

Where:

PI (%) = percentage inhibition.

D_c = Diameter of colonies in dishes - ddi (mm).

D_e = Colony diameter in the boxes in dishes containing the plant extract - ddi (mm).

Ddi = Initial disc diameter (8 mm)

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition

The chemical composition of *L. stoechas*, *M. pulegium* and *R. officinalis* essential oils is summarised in table 1 [16]. The three essential oils are rich in chemical compounds belonging to several chemical classes such as no-oxygenated and oxygenated monoterpene. The main compounds of *L. stoechas* essential oil were the fenchone (31.813%), the camphor (29.602%), terpineol (13.149%) and the menthone (8.963%), while the 1,8-cineole (23.673%), the camphor (18.743%), the borneol (15.46%), the α-pinene (14.076%) and caryophyllene (8.666%) were the major compounds of *R. officinalis* essential oil. The essential oil of *M. pulegium* contains pulegone (40.98%), menthone (21.164%), α-terpineol (7.98%), humulene (5.402%), eucalyptol (5.199) and verbenone (4.535%) as main compounds. The difference of chemical compounds between three species is due to the difference of secondary metabolites of these species.

3.2. Anticancer activity

The anticancer effect of *L. stoechas*, *M. pulegium* and *R. officinalis* essential oils was determined on RD, Vero and L20B cell lines using MTT assay. The results were expressed as the percentage of viability plotting the concentration of essential oil. the cell viability of Vero, RD and L20B cancerous cell line and PBMC (normal cells used as control) are summarised figures 1, 2 and 3 in the presence, respectively, of different concentration of essential oils of *M. pulegium*, *R. officinalis* and *L. stoechas*. As showed in these

figures, the increase of essential oils concentration decrease the cell viability showing thus the antiproliferative effect of essential oils. At high concentrations, the essential oil of three species exhibited important inhibition of cell viability including normal cell (PBMC). However, to compare the obtained results, we determined the concentration that provides 50% of cell reducing viability of each essential oil against tested cells. The results obtained are listed in [table 2](#). As seen in [table 2](#), the essential oil of *L. stoechas* showed important cytotoxic effect against RD ($19.03 \pm 28.05 \mu\text{g/mL}$) and L20B ($33.84 \pm 1.72 \mu\text{g/mL}$) cell line, this effects differ significantly that those obtained on normal cells (PBMC). Moreover, *M. pulegium* essential oil also demonstrated significant antiproliferative effect against RD and Vero cell line compared with PBMC with IC_{50} of 47.52 ± 2.73 and $60.21 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$, respectively. However, the essential oil of *R. officinalis* not showed an important anticancer effect.

To reveal the security of these essential oils, we have calculated the pharmacological selectivity index by using these effects on PBMC as normal cells ([Table 2](#)). We note that *L. stoechas* essential oil, presents the best cytotoxic effect on RD and L20B cell line, possess highest selectivity indexes (RD; $\text{SI}=11.098$ and L20B; $\text{SI}=6.241$), showing thus the security of this oil on normal cells. Whereas, although these cytotoxic effects on L20B and Vero cell line, the essential oil of *M. pulegium* showed lowest selectivity indexes indicating thus these cytotoxic effects on normal cells.

The findings of this study are varied and depending on essential and tumor cell line tested. The antiproliferative effect of essential oils could be attributed to the bioactive chemical compounds present in these oils. Furthermore, other studies have revealed the anticancer activities of *M. pulegium* essential oil. The essential of *L. stoechas* has not been tested for their anticancer properties. However, Çelik and Aslantürk revealed the cytotoxic effect of *L. stoechas* aqueous extracts [22]. The mechanism of action of essential is complex and several targeting pathways are studied [14]. Indeed, an essential oil can activate the apoptosis via the caspases family proteins expression, induce modifications in signaling pathways, arrest of cycle cell and modification in DNA methylation and histones acetylation of tumor cell lines [14].

3.3. Antifungal activity

The anti-dermatophyte effect of essential oils was evaluated using agar dilution method which based on the inhibition of the mycelial growth of a mushroom disc deposited on an agar medium supplemented with essential oil. The results are expressed as the percentage of inhibition plotting the concentration of essential oils. The inhibition percentages *L. stoechas*, *M. pulegium* and *R. officinalis* essential oils are summarized in [table 3](#), [4](#) and [5](#) respectively. As listed in [figure 3](#), [4](#) and [5](#), all essential oil showed an anti-dermatophyte effect by a dose depending-manner. The increase in the essential oil concentration is accompanied by a better efficiency. At a concentration of 0.75% (v/v), *R. officinalis* essential oil inhibited the mycelial growth of *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* and *T. violaceum* to a value of 95.17, 92.47 and 91.41% respectively. At the same concentration (0.75%), the essential oil of *L. stoechas* inhibited the growth of the same strains up to 87.38, 90.62 and 86.42 %, respectively. While the essential oils of *M. pulegium* showed lowest inhibition values with the same concentration.

To compare the anti-dermatophyte activity of three medicinal plants, the concentration of essential oil that providing an inhibition of 50% of mycelial growth was determined. The results are listed in [Table 3](#), [4](#) and [5](#). The essential oil of *R. officinalis* showed inhibition of *T. mentagrophytes* at $\text{IC}_{50}=0.53\%$ (v/v), while *T. tonsurans* and *T. violaceum* were inhibited at a value of $\text{IC}_{50}=0.64$ and $\text{IC}_{50} = 0.60\%$, respectively. An important anti-dermatophytes activity was observed against *T. mentagrophytes*. On the other hand, the inhibition of *T. tonsurans* by *L. stoechas* essential oil was obtained at a concentration of $\text{IC}_{50}=0.58\%$. This oil inhibited also *T. mentagrophytes* and *T. violaceum* at IC_{50} values of 0.61 and 0.63 % (v/v) respectively. However, IC_{50} values of *M. pulegium* essential oil against tested dermatophytes were the lowest than those obtained with the essential oil of *R. officinalis* and *L. stoechas*. Some studies have showed the antifungal activity of MPEO, ROEO and LSEO [23, 24, 25]. However, there have no study regarding the antidermatophyte effects of these essential oils. The mechanisms of action of essential oils against fungal strains have not been well understood. However, some suggestions showed that essential oils and their derivative compounds could target specific cellular and sub-cellular such as inhibition of cell wall formation, Cell membrane disruption, Dysfunction of the fungal mitochondria, Inhibition of cell division, Inhibition of RNA/DNA synthesis or protein synthesis and Inhibition of efflux pumps [26, 27, 28, 29].

4. Conclusion

The anticancer and antidermatophyte activities of *M. pulegium*, *R. officinalis* and *L. stoechas* were tested in this study. The results revealed a potential anticancer property of *L. stoechas* essential oil. Moreover, *M. pulegium* and *R. officinalis* essential oils showed remarkable antidermatophyte activity. These findings

show that these essential oils could constitute a promising source of anticancer and antifungal agents. However, further studies should be done thus investigating the involved mechanisms of action and testing main bioactive compounds.

Figure caption

Figure 1: Antiproliferative activity of different concentrations of *M. pulegium essential oil* against cancer cell lines (RD, L20B and Vero) and normal cell (PBMC) by MTT assay. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations.

Figure 2: Antiproliferative activity of different concentrations of *R. officinalis* essential oil against cancer cell lines (RD, L20B and Vero) and normal cell (PBMC) by MTT assay. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations.

Figure 3: Antiproliferative activity of different concentrations of *L. stoechas essential oil* against cancer cell lines (RD, L20B and Vero) and normal cell (PBMC) by MTT assay. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations.

References

- [1] Parvaiz R, Faisal F, (2017) Cancer incidence and mortality are associated with human development index and health setups in Africa. J. Egypt. Nation Caner Instit. 29: 123-129.
- [2] Gupta AK, Ryder JE, Chow M, (2005) Dermatophytosis: the management of fungal infections. Skinmed. 4: 305-10.
- [3] Maqill SS, Manfredi L, Swiderski A, Cohen B, Merz WG, (2007) Isolation of *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Baltimore, Maryland. J Clin Microb, 45: 461-465.
- [4] Kannan P, Janaki C, Selvi GS (2006) Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. Indian. J. Med. Microbiol 24: 212-217.
- [5] Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT (2012) Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. Int. J. Microbiol 2012: 1-26.
- [6] Perfect JR, (2008) Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Clin. Infect. Dis, 46 : 120-8.
- [7] Khouchlaa A, Bouyahya A, Ait Lahcen S, Bakri Y, Nadia D, Tijane M (2017) Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *zizyphus lotus* l. extracts. Worl Jour Pharm Res 6: 1354-1367.
- [8] Et-Touys A, Fellah H, Mniouil M, Bouyahya A, Dakka N, Abdennebi EH, Sadak A, Bakri Y (2016) Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L, extracts from Morocco. Brit Micro Res .J, 16: 1-10.
- [9] Bouyahya A, Bakri Y, Khay EO, Edaoudi F, Talbaoui A, Et-Touys A, Abrini J, Dakka N, (2017) Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: A review. Asian Pac J Trop Dis, 7: 57-64.
- [10] Bouyahya A, Bakri Y, Belmehdi O, Et-Touys A, Abrini J, Dakka N, (2017) Phenolic extracts of *Centaureum erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. Asian Pac J Trop Dis, 7: 433-439.
- [11] Lahlou M, (2013) The success of natural products in drug discovery. Pharmacol Pharm 4: 17-31.
- [13] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects 491 of essential oils - a review. Food Chem. Toxicol, 46: 446-475.
- [13] Burt S, (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J. Food. Microbiol 94: 223-53.
- [14] Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, Dakka N (2016). Essential oils as anticancer agents news on mechanisms of action. Phytothérapie 14, DOI: 10.1007/s10298-016-1058-z (in press).
- [15] Bouyahya A, Dakka N, Talbaoui A, Et-Touys A, El-Boury H, Abrini J, Bakri Y (2017) Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). Indus. Crop. Prod, 108: 729-737.
- [16] Bouyahya A, Et-Touys A, Bakri Y, Ahmed T, Fellah H, Abrini J, Dakka N (2017) Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microb Pathog 11: 41-49.
- [17] Bouyahya A, Et-Touys A, Abrini J, Ahmed T, Fellah H, Bakri Y, Dakka N (2017). Lavandula stoechas essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Biocat. Agric Biotech, 12: 179-184.
- [18] Bouyahya A, Abrini J, Et-Touys A, Bakri Y, Dakka N (2017). Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. Europ. J. Integ. Med, 13: 9-25.

- [19] Aneb M, Talbaoui A, Bouyahya A, El Boury H, Amzazi S, Benjouad A, Dakka N, Bakri Y (2016). *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *Europ. J. Med. Plant*, 16: 1-13.
- [20] Essid R, Rahali FZ, Msaada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, Aoun K, Limam F (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Indus. Crop. Prod* 77 : 795-802.
- [21] Remmal A, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A. Rhayour K, Ettayebi M (1993) Improve method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Ess Oils Res* 5: 179-184.
- [22] Çelik TA, Aslantürk ÖS (2007) Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. *Biologia* 62: 292-296.
- [23] Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P (2006) Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem*, 54: 4364–4370.
- [24] Centeno S, Calvo MA, Adelantad C, Figueroa S (2010) Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pak J Biol Sci* 13, 452-5.
- [25] Ozcan MM, Chalchat JC (2008) Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int J Food Sci Nutr* 59: 691-698.
- [26] Lagrouh F, Dakka N, Bakri, Y (2017) The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J. Mycol. Méd*, 27: 303-311.
- [27] Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M (2012) Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L (Liliaceae). *Int J Mol Sci*, 13: 1426-1436.
- [28] Wu XZ, Cheng AX, Sun LM, Lou HX (2008) Effect of plagiocchin E, an antifungal macrocyclic bis(bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta. Pharmacol. Sin* 29: 1478-85.
- [29] Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y (2012) The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One* 7: 30147.

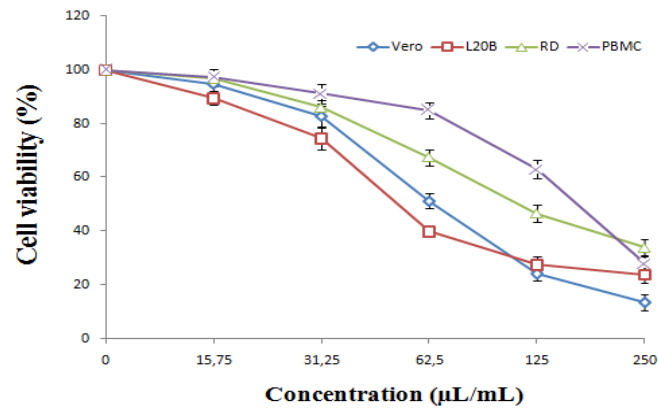


Figure (1)

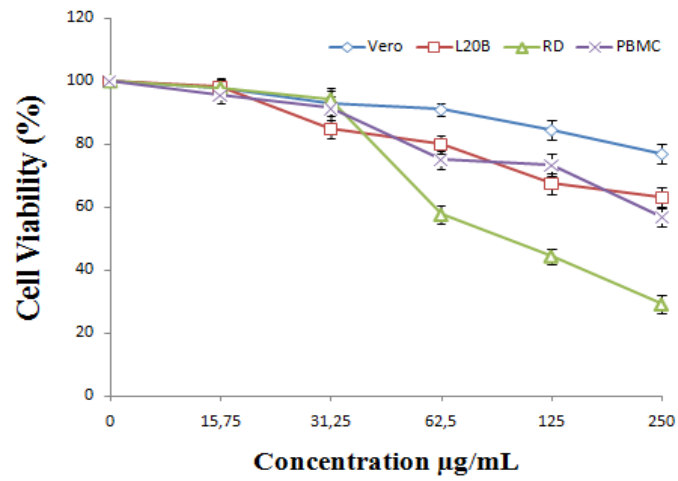


Figure 2

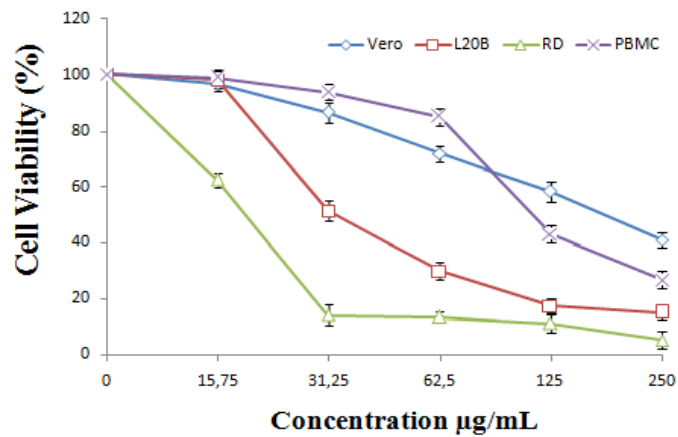


Figure 3

Table 1: Chemical composition of essential oils [16, 17]

<i>L. stoechas</i> essential oil		<i>R. officinalis</i> essential oil		<i>M. pulegium</i> essential oil	
Compounds	(%)	Compounds	(%)	Compounds	(%)
1,8-cineole	1.332	Tricyclene	1.70	D-Limonene	2.422
Fenchone	31.813	α -pinene	14.076	Eucalyptol	5.199
Linalool	1.447	camphene	2.712	1,8-Cineole	3.82
Borneol	0.887	1,8-Cineole	23.673	α -Terpineol	7.98
Camphor	29.602	Terpinolene	1.487	Verbenone	4.535
Caryophyllene	1.514	Camphor	18.743	Menthone	21.164
Eucalyptol	5.880	Borneol	15.46	Neo-menthol	2.272
Terpineol	13.149	Verbenone	4.687	Menthol	1.494
Menthone	8.963	Bornyl acetate	2.585	pulegone	40.98
Menthol	2.684	Caryophyllene	8.666	Humulene	5.402
2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde	1.330	α -Terpineol	0.6	Sabinene	0.746

Table 2: Cytotoxic activity (IC₅₀) and pharmacological selectivity index

	IC ₅₀ (%v/v)				Pharmacological Selectivity Index		
	Vero	L20B	RD	PBMC	Vero	L20B	RD
<i>M. pulegium</i>	60.21±1.9	47.52±2.73	107.92±3.18	182.06±4.52	03.023	03.831	01.687
<i>R. officinalis</i>	>250	>250	113.42±4.62	>250	nd	nd	nd
<i>L. stoechas</i>	173.64±3.45	33.84±1.72	19.03±28.05	211.21±4.25	01.216	06.241	11.098

Table 3: Inhibition of the growth of dermatophytes by *L. stoechas* essential oil

Dermatophytes	Pourcentage of inhibition (%)					
	Concentration of essential oils (%v/v)					IC ₅₀ (%v/v)
	0	0.05	0.25	0.5	0.75	
<i>T. violaceum</i>	0	12.85	16.49	37.22	86.42	0.63
<i>T. mentagrophytes</i>	0	13.03	17.66	38.13	87.38	0.61
<i>T. tonsurans</i>	0	11.47	19.24	38.98	90.62	0.58

Table 4: Inhibition of the growth of dermatophytes by *M. pulegium* essential oil

Dermatophytes	Pourcentage of inhibition (%)					
	Concentration of essential oils (%v/v)					IC ₅₀ (%v/v)
	0	0.05	0.25	0.5	0.75	
<i>T. violaceum</i>	0	9.98	17.35	36.87	81.44	0.68
<i>T. mentagrophytes</i>	0	10.63	16.83	29.25	82.38	0.71
<i>T. tonsurans</i>	0	11.98	18.48	34.52	83.56	0.69

Table 5: Inhibition of the growth of dermatophytes by *R. officinalis* essential oil

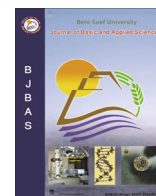
Dermatophytes	Pourcentage d'inhibition (%)					
	Concentration des huiles essentielles (%v/v)					IC ₅₀ (%v/v)
	0	0.05	0.25	0.5	0.75	
<i>T. violaceum</i>	0	12.35	19.89	38.17	91.41	0.60
<i>T. mentagrophytes</i>	0	14.13	20.04	43.23	95.17	0.53
<i>T. tonsurans</i>	0	12.26	17.94	38.84	92.47	0.64

HOSTED BY



Contents lists available at ScienceDirect

Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bjbas

Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco



Abdelhakim Bouyahya^{a,b,*,1}, Abdeslam Et-Touys^{a,c,1}, Nadia Dakka^a, Hajiba Fellah^c, Jamal Abrini^b, Youssef Bakri^a

^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, and Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^b Biology and Health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

^c National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2017

Received in revised form 1 June 2017

Accepted 12 June 2017

Available online 15 June 2017

Keywords:

Leishmaniasis

Medicinal plants

Antileishmanial activity

Ouezzane

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the antileishmanial activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco. Plant extracts were prepared by maceration using methanol, ethanol, and n-hexane. The antileishmanial activity was evaluated against *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, and *Leishmania infantum* using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. All plant extracts showed a reducing in cell promastigotes viability with variability depending on tested strains and type of extracts. The n-hexane extract showed the highest antileishmanial activity and *L. infantum* was the most sensitive parasite. The best growth inhibition was observed with *Cistus crispus* n-hexane extract against *L. major* ($IC_{50} = 47.29 \pm 2.25 \mu\text{g/mL}$), *Arbutus unedo* n-hexane extract against *L. infantum* ($IC_{50} = 64.05 \pm 1.44 \mu\text{g/mL}$) and *Arbutus unedo* n-hexane extract against *L. tropica* ($IC_{50} = 79.57 \pm 2.66 \mu\text{g/mL}$). Considering these results, medicinal plants from the North-West of Morocco could constitute a promoter source for antileishmanial compounds.

© 2017 Beni-Suef University. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Leishmaniasis is considered as a serious health problem worldwide, especially in Africa where it significant morbidity and mortality (Chiheb et al., 1999; El Aasri et al., 2016). It is caused by parasites transmitted by phlebotomy insects (Bates, 2007; Dostalova and Volf, 2012). Recently, the number of researches on antileishmanial agents significantly increased for two reasons: firstly, the seed effects demonstrated by several treatments such as antimony derivatives which remain toxic and expensive. Secondly, several *Leishmania* species showed the resistance against synthetic molecules, and therefore the emergence and reemergence of infectious diseases. These two situations have oriented pharmacological researches on antileishmanial drugs to screened molecules that possess a selective efficacy and tolerable safety.

Medicinal plant secondary metabolites showed several pharmacological properties such as antibacterial (Bouyahya et al.,

2017a,b), antioxidant (Bouyahya et al., 2017b, 2016a), antitumor (Bouyahya et al., 2016b; Aneb et al., 2016), antifungal (Fadel et al., 2013), anti-litholitic (Khouchlaa et al., 2017a,b) and antileishmanial activities (Et-Touys et al., 2016a,b). These secondary metabolites are complex molecules with various functional structures such as polyphenols, flavonoids, terpenoids and coumarins (Lahlou, 2013). In this way, recent studies that focused on antileishmanial activities of medicinal plant products showed the success of these products in the inhibition of growth of several *Leishmania* species such as *L. major* (cutaneous leishmaniasis) and *L. infantum* (visceral leishmaniasis) (Et-Touys et al., 2016a,b; Essid et al., 2015).

The North-West of Morocco (province of Ouezzane) is rich in medicinal plants and some of them are endemic (Ennabili et al., 2000; Merzouki et al., 2000). However, there is an under exploitation of the explored species. We have demonstrated in early published studies that some selected medicinal plants from this region have important charges of phenolic and flavonoid contents and possess significant antibacterial and antioxidant effects (Bouyahya et al., 2016b, 2017b). In this context, the aim of this study was the screening of the antileishmanial activity of some selected plant extracts against *Leishmania* species.

* Corresponding author at: Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av. Ibn Battouta, BP1014 Rabat, Morocco.

E-mail address: bouyahya-90@hotmail.fr (A. Bouyahya).

¹ Both authors contribute equally to the carrying out of the study.

2. Materials and methods

2.1. Collection of plant material and preparation of organic extracts

Medicinal plants were collected from the North-West of Morocco (Ouezzane province: Zoumi area). The scientific name, family, vernacular name, part plant collected, medicinal use and pharmacological properties of these plants are given in Table 1. The collected parts were dried in the dark at room temperature and then they were ground to obtain the powder. This later was extracted by maceration using methanol, ethanol, and *n*-hexane. After 72 h of maceration, the plant extracts were filtered and the solvent was eliminated using a rotary evaporator.

2.2. Total phenolic and flavonoid contents

The total phenolic contents (TPC) and the total flavonoid contents were determined in our previous studies (Bouyahya et al., 2016b,c, 2017c,d). The TPC was estimated by the Folin Ciocalteu assay using gallic acid as standard. The TFC was estimated by the aluminum chloride (AlCl₃) colorimetric assay using quercetin as standard.

2.3. Evaluation of the antileishmanial activity

2.3.1. Culture of *Leishmania* species

The *Leishmania* species tested in this study are: *Leishmania infantum* (MHOM/MA/1998/LVTA), *Leishmania tropica* (MHOM/MA/2010/LCTIOK-4), and *Leishmania major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09). These three species were isolated and identified from Moroccan infected patients at the National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat-Morocco. The species were cultivated as described by Et-Touys et al. (2016b). Briefly, parasite cultures of each *Leishmania* species were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Cells were then re-suspended in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of Penicillin-Streptomycin mixture. Cultures were maintained at 23 °C.

2.3.2. Antileishmanial activity

Before evaluating the antileishmanial activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density *s* was reached a threshold concentration of 10⁶ cells/mL, *L. infantum*, *L. tropica*, and *L. major* promastigotes were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 2500 rpm for 10 min. To evaluate the antipromastigote activity, 100 µL of parasites culture were resuspended in a 96-well tissue culture plate, in fresh culture medium according to Et-Touys et al. (2016b). Briefly, parasites were incubated at 2.5×10⁶ cells/well for 72 h at 23 °C in the presence of various concentrations of extract (µg/mL) dissolved in 1% DMSO. DMSO was used at a final concentration never exceeding 1% which is not toxic to parasites (Essid et al., 2015; Oliveira et al., 2011). Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls, while Glucantime® was used as positive control.

2.3.3. Cell viability assay

The viability of *Leishmania* species was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay as described by Essid et al. (2015). Briefly, 10 µL of MTT (10 mg/mL) were added to each micro-well and incubated for 3 h at 30 °C. The reaction was stopped by addition of 100 L of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazan

formed after tetrazolium dye reduction. After 30 min of incubation at room temperature, absorbance was measured at 560 nm using an ELISA plate reader. All assays were conducted in triplicate and compared to negative control (parasites) and reference drug (Glucantime). Cell viability was also evaluated by determination of the extract concentrations which inhibited half of the cell population (IC₅₀), obtained by modeling by plotting %age of inhibition versus concentration of extract using Original Program. Inhibition percentage (I) was calculated using the following formula (Essid et al., 2015):

$$I(\%) = 100 \times (\text{Absorbance of untreated cells} - \text{Absorbance of treated cells}) / \text{Absorbance of untreated cells}.$$

2.4. Data analysis

The statistical analysis was performed by a one-way ANOVA analysis of variance. The difference is considered as significant for $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Total phenol and flavonoid contents

Table 2 summarizes the TPC and TFC in extracts. All plant extracts possess important changes in phenolic and flavonoid contents with some variability between plant extracts and used solvents. *M. communis*, *A. unedo* and *O. compactum* showed significant concentrations in TPC and TFC than *C. crispus* extract. On the other hand, methanol extract possesses highest charges in TPC and TFC compared to ethanol and *n*-hexane extracts.

3.2. Antileishmanial activity

Table 3 summarizes the antileishmanial activity of medicinal plant extracts expressed as the IC₅₀. All extracts showed antileishmanial effects with some variability depending on plant extracts and tested parasites ($p < 0.05$). *Leishmania infantum* is the most sensitive strains against tested extracts that *L. major* and *L. tropica*. While the extracts of *A. unedo* and *C. crispus* showed significant cytotoxic effects that those of *M. communis* and *O. compactum*.

The best IC₅₀ value is revealed by *C. crispus* *n*-hexane extract against *L. major* (IC₅₀ = 47.29 ± 2.25 µg/mL), *Arbutus unedo* *n*-hexane extract against *L. infantum* (IC₅₀ = 64.05 ± 1.44 µg/mL) and *Arbutus unedo* *n*-hexane extract against *L. tropica* (IC₅₀ = 79.57 ± 2.66 µg/mL) ($p < 0.05$). While the lowest IC₅₀ values were showed by *O. compactum* and *M. communis* extracts with some effects significantly important that Glucantime ($p < 0.05$).

4. Discussion

The leishmaniasis constitutes a major health problem, especially in Africa. The use of synthesis drugs is poorly effective and many side effects are accompanied with treatment. Medicinal plant extracts possess several pharmacological properties such as antibacterial, antioxidant, antitumor, anti-inflammatory and antileishmanial activities (Bouyahya et al., 2016e, 2017e). These activities are attributed to the presence of a diversity of functional compounds that possess biological properties (Lahlou, 2013). In this context, this study was aimed to evaluate the antileishmanial activity of selected medicinal plants from the North-West of Morocco.

In the first part, the total phenol content and the total flavonoid content of plant extracts were estimated. Indeed, these compounds

Table 1

Medicinal plants studied (Vernacular name, part plant collected, medicinal use and pharmacological properties).

Species (Family)	Vernacular name	Part plant collected	Medicinal use	Pharmacological properties
<i>Murtus communis</i> L. (Myrtaceae)	Rihan	Leaves	Cardiac diseases, hypertension and diabetes, digestive diseases and allergy (Fakchich and Elachouri, 2014; El-Hilaly et al., 2003; Eddouks et al., 2002)	Antibacterial activity, antioxidant, antigenotoxic and hypoglycemic (Bouyahya et al., 2016c; Amensour et al., 2009; Hayder et al., 2004; Sepici et al., 2004)
<i>Arbutus unedo</i> L. (Ericaceae)	Senou	Leaves	Kidney diseases, cardiovascular and digestive diseases hypertension (Fakchich and Elachouri, 2014; El-Hilaly et al., 2003; Ziyat et al., 1997)	Antioxidant and antibacterial activities (Bouyahya et al., 2016a)
<i>Cistus crispus</i> L. (Cistaceae)	Ouekir	Leaves	–	Antioxidant and antibacterial activities (Bouyahya et al., 2017c; Talibi et al., 2011)
<i>Origanum compactum</i> (Benth. (Lamiaceae)	Za'tar	Flowering top	Diabetes and digestive diseases (Fakchich and Elachouri, 2014; El Hamsas El Youbi et al., 2016)	Antioxidant, anticancer, antifungal and antibacterial and antimutagenic activities (Bouyahya et al., 2017d, 2016d, 2008; Chaouki et al., 2007; Mezzoug et al., 2007)

Table 2

Total phenol content and flavonoid content.

Species	Extract	TPC	TFC	References
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	137.46 ± 0.35	27.24 ± 0.83	Bouyahya et al. (2016c)
	EtOH	126.41 ± 1.03	18.41 ± 0.43	
	n-hexane	122.72 ± 1.16	31.24 ± 1.23	
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	141.72 ± 0.56	31.61 ± 0.59	Bouyahya et al. (2016a)
	EtOH	133.61 ± 0.45	21.61 ± 1.65	
	n-hexane	94.51 ± 0.08	24.76 ± 0.70	
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	153.27 ± 0.68	52.72 ± 0.72	Bouyahya et al. (2017d)
	EtOH	117.60 ± 1.12	27.60 ± 0.32	
	n-hexane	105.54 ± 0.35	29.64 ± 0.85	
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	53.27 ± 0.68	11.72 ± 0.72	Bouyahya et al. (2017c)
	EtOH	37.60 ± 1.12	07.60 ± 0.32	
	n-hexane	35.54 ± 0.35	9.64 ± 0.85	

Table 3Antileishmanial activity of medicinal plant extracts (IC₅₀ ± SD µg/mL) against promastigote forms of *L. major*, *L. infantum*, and *L. tropica*. Values are means ± standard deviation of three determinations.

Species	Extracts	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. infantum</i>
<i>Myrtus communis</i>	MeOH	>500	481.16 ± 5.45 ^c	303.21 ± 5.72 ^c
	EtOH	>500	>500	117.45 ± 3.55 ^b
	n-hexane	342.25 ± 6.32 ^c	321.63 ± 6.85 ^c	>500
<i>Arbutus unedo</i>	MeOH	283.83 ± 4.96 ^b	103.74 ± 3.22 ^a	150.23 ± 3.21 ^b
	EtOH	>500	>500	172.72 ± 3.56 ^b
	n-hexane	182.34 ± 4.25 ^b	79.57 ± 2.66 ^a	64.05 ± 1.44 ^a
<i>Origanum compactum</i>	MeOH	>500	>500	>500
	EtOH	>500	>500	474.67 ± 4.77 ^c
	n-hexane	482.16 ± 1.55 ^c	289.68 ± 4.15 ^b	275.94 ± 5.76 ^b
<i>Cistus crispus</i>	MeOH	84.29 ± 2.05 ^a	163.81 ± 3.75 ^b	132.18 ± 3.06 ^b
	EtOH	291.73 ± 3.33 ^b	>500	183.26 ± 4.38 ^b
	n-hexane	47.29 ± 2.25 ^a	96.82 ± 2.88 ^b	82.39 ± 2.11 ^a
Control	Glucantime®	>500	>500	>500

Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$; $n = 3$).

family have potential pharmacological effects including antileishmanial activities (Et-Touys et al., 2016a,b). It appears that these medicinal plants are rich in organic extracts and the extraction efficiency varies depending on the solvent used. All extracts possess phenolic and flavonoid compounds, but their amount is variable between plant species and types of extracts. In fact, the concentration of secondary metabolites is affected by the plant species, geographical location and the solvents used for extraction (Demain and Fang, 2000).

The methanol extract was the most efficient solvent used to extract the phenolic components because it is the most polar solvent (Chalise et al., 2010), the higher extraction yields were given by the more polar solvent. In fact, the methanol is the most widely

used solvent for extracting phenolic substances from medicinal plants. Indeed, other studies working *Teucrium orientale* have confirmed that the fact that methanol gives the higher extraction yield amongst all solvents (Tawaha et al., 2007).

Phenolic components such as polyphenols and flavonoids extracted from medicinal plants are considered as a major source in drugs discovery. These compounds possess, in fact, numerous biological activities including antileishmanial effects (Et-Touys et al., 2016a,b). In our study, the charges of the TPC and TFC varied depending on extraction solvents and plant species. The methanol and n-hexane extracts showed very high content in TPC and TFC (Table 2) compared to ethanol extracts ($p < 0.05$). On the basis of the suggestions of Tawaha et al. (2007) who estimated that the

phenol content higher than 20 mg GAE/g extract is considered as very high, all extracts being considered as an important source of phenolic compounds.

The MTT assay was a colorimetric method that is widely used to evaluate the cytotoxic effects of natural and synthetic compounds. In this study, the effects of four plant extracts were tested on three promastigote forms of *Leishmania* species (*L. major*, *L. tropica*, and *L. infantum*). The cytotoxic activity was dose-dependent manner and thus the establishment of the IC₅₀ was done by modeling the cytotoxic effects plotting the concentrations of extracts. The values of IC₅₀ are summarized in Table 3, they clearly show significant antileishmanial activity compared to the Glucantime used as positive control. The antileishmanial effects are not correlated with the phenolic contents; the *C. crispus* extracts showed interesting IC₅₀ values had not important charges of phenolic contents that other extracts (Tables 2 and 3).

Given the complexity of molecules present in the plant extracts, it is not easy to establish the correlation between these compounds and biological activity. The extracts from *Salvia verbecana* have been tested on the strains (*L. major*, *L. tropica*, and *L. infantum*) and showed that the antileishmanial activity is correlated with phenolic components (Et-Touys et al., 2016b). In addition, the extracts of *Salvia officinalis* from the same area (Ouezzane), tested on *L. major*, have shown the same conclusion (Et-Touys et al., 2016a). Generally, the biological activities of plant extracts are depending on major components, the synergistic effect between the major compounds and the additive effects that could be attributed to the minor components present in plants extracts (Lahlou, 2013).

5. Conclusion

In this study, the potential of some selected medicinal plants such as *A. unedo* and *C. crispus* from the North-West of Morocco as antileishmanial agents has been demonstrated. *L. major* promastigotes form that causes cutaneous leishmaniasis has been inhibited at low concentration by n-hexane extracts of *C. crispus*. Also, *L. infantum* and *L. tropica* were inhibited at low concentrations by *A. unedo* n-hexane extracts. These results are promoters as potential sources to search antileishmanial bioactive agents. However, further studies are needed to identify molecules that are responsible for these activities and to evaluate the mechanism effects on amastigote forms.

Conflict of interest

None declared.

References

- Amenour, M., Sendra, E., Abrini, J., Bouhdid, S., Pérez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., 2009. Total phenolic content and antioxidant activity of myrtle (*Myrtus communis*) extracts. *Nat. Prod. Commun.* 4, 819–824.
- Aneb, M., Talbaoui, A., Bouyahya, A., EL Boury, H., Amzazi, S., Benjouad, A., Dakka, N., Bakri, Y., 2016. *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *Euro J Med Plant.* 16, 1–13.
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37, 1097–1106.
- Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, J., Baudoux, A., Abrini, J., 2008. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1563–1570.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Khay, E.O., Edaoudi, F., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Dakka, N., 2017a. Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review. *Asian Pacific Trop. Dis.* 7, 57–64.
- Bouyahya, A., Bensaid, M., Bakri, Y., Dakka, N., 2016a. Phytochemistry and ethnopharmacology of *Ficus carica*. *Int. J. Biochem. Res. Rev.* 14, 1–12.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Chatoui, K., Harhar, H., Bakri, Y., Dakka, N., 2017b. Phytochemical screening, antiradical and antibacterial activities of *Cistus crispus* from Morocco. *J. Mater Environ. Sci.* 8, 1560–1566.
- Bouyahya, A., El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016. Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *Brit Biotech J.* 14, 14: 1–10.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Lagrouh, F., Dakka, N., Bakri, Y., 2017. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of Moroccan honey samples. *Phytoth.* DOI 10.1007/s10298-017-1122-3.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2017d. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Origanum compactum* extracts. *Phytoth.* <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1101-8>.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016c. Essential oils as anticancer agents: news on mode of action. *Phytoth.* <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-016-1058-z>.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Khay, E.O., Charfi, S., Boujida, N., EL Harsal, A., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2016. *In vitro* Antibacterial of organic extracts from North-West Moroccan Medicinal Plant *Myrtus communis* (L.). *Brit Biotech J.* 16, 1–9.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N., 2017a. Resistance to Antibiotics and Mechanisms of Action of Essential Oils against Bacteria. *Phytoth.* DOI 10.1007/s10298-017-1118-z.
- Bouyahya, A., Jamal, A., Edaoudi, F., Et-Touys, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2016e. *Origanum compactum* Benth: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *Med. Arom. Plant* 5, 252. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000252>.
- Chalise, K., Acharya, N., Gurung, R.P., Bhusal, R., Gurung, N., Skalko-Basnet, P., 2010. Antioxidant activity and polyphenol content in edible wild fruits from Nepal. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61, 425–432.
- Chaouki, W., Leger, D.Y., Eljastimi, J., Beneytout, J.L., Hmamouchi, M., 2007. Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. *Pharm. Biol.* 48, 269–274.
- Chiheb, S., Guessous-Idrissi, N., Hamdani, A., Riyad, M., Bichichi, M., Hamdani, S., Krimech, A., 1999. *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in an emerging focus in North Morocco: new clinical forms. *Ann. Dermatol. Venereol.* 126, 419–422.
- Demain, A.L., Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69, 1–39.
- Dostalova, A., Volf, P., 2012. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors.* 5, 276.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jouad, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilaleet). *J. Ethnopharmacol.* 82, 97–103.
- El Aasri, A., El Madhi, Y., Najj, M., El Rhaouat, O., Belghyti, D., 2016. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Sidi Kacem Province, Northwestern Morocco (2006–2014). *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 6, 783–786.
- El Hamsa El Youbi, A., Ouahidi, I., EL Mansouri, L., Daoudi, A., Boust, D., 2016. Ethnopharmacological Survey of Plants Used for Immunological Diseases in Four Regions of Morocco. *Eur J Med Plant.* 13, 1–24.
- El-Hilaly, J., Hmamouchi, M., Lyoussi, B., 2003. Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J. Ethnopharmacol.* 86, 149–158.
- Ennabili, A., Gharnit, N., El Hamdouni, E.L., 2000. Inventory and social interest of medicinal, aromatic and Honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco). *Stud. Bot.* 19, 57–74.
- Essid, R., Rahali, F.Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F., 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Indus Crop Prod.* 77, 795–802.
- Et-Touys, A., Fellah, H., Mniouil, M., Bouyahya, A., Dakka, N., Abdennebi, E.H., Sadak, A., Bakri, Y., 2016. Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Brit Micro Res J.* 16, 1–10.
- Et-Touys, A., Fellah, H., Sebti, F., Mniouil, M., Aneb, M., Elboury, H., Talbaoui, A., Dakka, N., Sadak, A., Bakri, Y., 2016b. *In vitro* antileishmanial activity of extracts from endemic Moroccan medicinal plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *verbenaca* Maire (*S. clandestina* Batt. non L.). *Eur. J. Med. Plant* 16, 1–8.
- Fadel, F., Ben Hmamou, D., Salghi, R., Chebli, B., Benali, O., Zarrouk, A., Ebenso, E.E., Chakir, A., Hammouti, B., 2013. Antifungal activity and anti-corrosion inhibition of *Origanum Compactum* extracts. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 11019–11032.
- Fakchich, J., Elachouri, M., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol.* 28, 76–87.
- Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ammar, R.B., Mahnoud, A., Ghedira, K., 2004. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutat. Res.* 564, 89–95.
- Khouchlaa, A., Bouyahya, A., Ait, Lahcen, S., Youssef, B., Nadia, D., Tijane, M., 2017a. Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *zizyphus lotus* l. extracts. *World J. Pharm. Res.* 6, 1354–1367.
- Khouchlaa, A., El-Yahyaoui, A., Bouyahya, A., Tijane, M., 2017b. Determination of phenol content and evaluation of *in vitro* litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract. *Phytoth.* DOI 10.1007/s10298-017-1106-3.
- Lahlou, M., 2013. The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol. Pharm.* 4, 17–31.
- Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero Mesa, J., 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district NW Morocco. *Fitoter.* 71, 278–307.
- Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N.S., Abrini, J., Zhiri, A., Baudoux, D., Diallo, B., El Jaziri, A., 2007. Investigation of the mutagenic and

- antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.* 629, 100–110.
- Oliveira, L.F.O., Schubach, A.O., Martins, S.L., Passos, M.M., Oliveira, R.O., Marzochi, M.C., Andrade, C.A., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 118, 87–96.
- Sepici, A., Gurbuz, I., Cevik, C., Yesilada, E., 2004. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 93, 311–318.
- Talibi, I., Amkraz, N., Askarne, L., Msanda, F., Saadi, B., Boudyach, EH, Boubaker, H., Bouizgarne, B., Ait Ben Aoumar, A., 2011. Antibacterial activity of moroccan plants extracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomatoes' bacterial canker, *J Med Plant Res.* 5, 4332–4338.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, T., El-Elmat, M., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104, 1372–1378.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 45, 45–54.

Asian Pacific Journal of Tropical Disease

journal homepage: <http://www.apjtdm.com>Original article <https://doi.org/10.12980/apjtd.7.2017D6-462>

©2017 by the Asian Pacific Journal of Tropical Disease. All rights reserved.

Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activitiesAbdelhakim Bouyahya^{1,2*}, Youssef Bakri¹, Omar Belmehdi², Abdeslam Et-Touys^{1,3}, Jamal Abrini², Nadia Dakka¹¹Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco²Biology and Health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco³National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 Dec 2016

Received in revised form 20 Jan, 2nd

revised form 18 Feb, 3rd revised form

15 May 2017

Accepted 5 Jun 2017

Available online 4 Jul 2017

Keywords:

Centaurium erythraea

Antibacterial

Antioxidant

Antileishmanial

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antiradical, antibacterial and antileishmanial properties of phenolic extracts of *Centaurium erythraea* (methanol: MECE, ethanol: EECE, *n*-hexane: HECE, ethyl acetate: EACE) from north-west of Morocco.**Methods:** The antiradical activity was evaluated using DPPH scavenging assay. The antibacterial activity was tested against four reference strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*) using the well diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by microdilution assay. The antiparasitic activity was evaluated against *Leishmania major*, *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test. The levels of polyphenol and flavonoid extracts were estimated by colorimetric assay.**Results:** The HECE extract has shown a significant ability to trap the radical DPPH [$IC_{50} = (49.54 \pm 2.43) \mu\text{g/mL}$] compared to EECE, MECE and EACE. This value is significantly important compared than those of ascorbic acid [$IC_{50} = (27.20 \pm 0.17) \mu\text{g/mL}$] and Trolox [$IC_{50} = (43.72 \pm 0.31) \mu\text{g/mL}$] used as standards. The inhibitory activity of methanol, *n*-hexane and ethyl acetate extracts was especially remarkable (inhibition zone ≥ 14 mm) against all strains tested. The values of MIC and MBC have ranged from 0.25 to 8.00 mg/mL. *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant strains compared to all other tested bacteria, while *Staphylococcus aureus* was the most sensitive toward the tested extracts. The MTT based colorimetric assay has shown a reduced promastigotes viability on all strains tested. The best growth inhibition was observed with HECE against *Leishmania tropica* [$IC_{50} = (37.20 \pm 1.62) \mu\text{g/mL}$] and *Leishmania major* [$IC_{50} = (64.52 \pm 2.20) \mu\text{g/mL}$] compared to N-methyl Glucamine Antimoniate (Glucantime®) ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$) used as control, after 72 h of treatment.**Conclusions:** Considering these results, *Centaurium erythraea* can be used as a source of novel antioxidant, antibacterial and antileishmanial compounds.

1. Introduction

The excessive and inappropriate use of antibiotics in human's medication to treat infectious diseases is responsible for the emergence of resistant organisms[1,2]. Indeed, several diseases have been reported as a result of bacterial infections in humans, viz. diarrhea and vomiting caused by *Bacillus cereus*[3], listeriosis

caused by *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)[4], and oral-genital infections caused by *Candida albicans*[5]. In addition, some parasites such as *Leishmania* species [*Leishmania major* (*L. major*), *Leishmania infantum* (*L. infantum*) and *Leishmania tropica* (*L. tropica*)] cause leishmaniasis disease. The treatment of this disease has been based on synthetic antileishmanial drugs. The issue is that this treatment is expensive and causes many side effects such as toxicity[6]. In addition, leishmanial species have developed the resistance against these molecules. This situation highlights the need to seek for new molecules that could exert antileishmanial effects[6]. Furthermore, the reactive oxygen species (ROS) are a group of highly reactive molecules including the free radicals such as superoxide ion ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) as well as the no free radicals such as the hydrogen peroxide

*Corresponding author: Abdelhakim Bouyahya, Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Av. Ibn battouta BP 1014, Rabat, Morocco.

Tel: +2121350878

E-mail: boyahya-90@hotmail.fr

Foundation Project: Supported by National Center for Scientific and Technical Research (NCSTR) (Grant No. 376UM5).

The journal implements double-blind peer review practiced by specially invited international editorial board members.

(H₂O₂). In homeostasis situation, the human body produces ROS via normal aerobic respiration and during inflammatory process. This production can be affected by some aggressions as radiations, stress, pollution, alcoholism and nicotinism[7]. The cells have many enzymatic systems to protect against ROS including superoxide dismutase, catalase and the selenium glutathion peroxidase. Some chemical molecules can also protect against ROS by their capacity to donate electron or hydrogen for them[8]. The oxidative modifications in the intracellular and/or cellular membrane have been defined as the result of the imbalance between ROS production and the defense mechanisms. Such alterations can lead to a high number of diseases including diabetes, cancers and cardiovascular diseases[9]. Furthermore, an increase in ROS can also cause lipids peroxidation in food during the manufacturing and storage process.

The most important sources of antioxidant, antibacterial and antiparasitic molecules are the natural bioactive products of plants such as flavonoids and phenolic compounds that have known for their several biological activities such as an antibacterial effect[10-12], suppress the production of free radicals[11,13-17], delay oxidative stress reactions and have an important role against one of the world major human diseases like cancer[18]. In the search for such natural products and modern drugs, medicinal plants play an important role[19-24].

In Morocco, the Gentianaceae family represents a great ecological and economic interest, as it includes many medicinal and aromatic species[25]. *Centaurium erythraea* (Rafin) (*C. erythraea*), known in Morocco under its vernacular name “Gosset El Haya”, has been used in traditional medicine as related by some ethnopharmacological surveys for the treatment of digestive disorders, kidney diseases, as well as an antipyretic and anti-diabetic[26,27]. The extracts of *C. erythraea* possess various biological activities such as anti-hyperglycemic[28], diuretic[29], antibacterial[30], antioxidant[31] and hepatoprotective activities[32].

Many compounds of *C. erythraea* extracts have been reported to exhibit important biological activities such as secoiridoid glycoside and gentiopicricoside, which have been assessed for antibacterial and free radical scavenging activities[4], and phenolic compounds isolated from the flowers of *C. erythraea* for antioxidant activity[31]. The aim of this present study was to determine the total flavonoids and phenolic contents of various extracts of *C. erythraea* and to evaluate their antibacterial, antileishmanial and antioxidant properties.

2. Materials and methods

2.1. Collection of plant material and preparation of organic extracts

C. erythraea was collected at the flowering phenological stage (May, 2015) from the north-west of Morocco (Ouezzane Province: Zoumi area). The collected parts were dried in dark at room temperature and then they were ground to obtain the powder. The obtained powder was extracted by maceration using ethyl acetate, *n*-hexane, ethanol and methanol. After 72 h of maceration, the plant extracts were filtered and then the solvents were eliminated using a rotary evaporator.

2.2. Total phenolic contents (TPC)

TPC of plant extracts was estimated by the Folin-Ciocalteu assay. The extract was diluted to the concentration of 1 mg/mL, and aliquots of 100 µL or a standard solution of gallic acid (20, 40,

60, 80 and 100 mg/L) were mixed with 500 µL of Folin-Ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with distilled water) and 400 µL of Na₂CO₃ (7%). After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 760 nm and compared to a blank sample[11]. The TPCs content expressed as gallic acid equivalent (GAE) was calculated based on the calibration curve using the following linear equation[33]:

$$y = 0.01 \times [\text{GA}] + 0.002; R^2 = 0.998$$

where *y* is absorbance, [GA] is concentration (mg GAE g⁻¹ extract) and *R*² is correlation coefficient.

2.3. Total flavonoid contents (TFC)

The TFC of plant extracts was measured by the aluminum chloride (AlCl₃) colorimetric assay[11]. 1 mL of the extract (1 mg/mL in methanol) or a standard solution of quercetin (20, 40, 60, 80 and 100 mg/mL) was mixed with 1 mL of 2% AlCl₃ in methanol. After 40 min at room temperature (23 ± 2 °C), the absorbance against blank was measured at 430 nm. Total flavonoids content expressed as quercetin equivalent (QE) was calculated based on the calibration curve using the following equation[33]:

$$y = 0.022 \times [\text{Q}] + 0.006; R^2 = 0.999$$

where *y* is absorbance; [Q] is concentration (mg QE) and *R*² is correlation coefficient.

2.4. Antiradical potential of different extracts

2.4.1. DPPH free radical-scavenging activity

Antiradical activity of *C. erythraea* extracts was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) scavenging activity assay. Briefly, aliquots (0.2 mL) of various concentrations (62.5–1 000 µg/mL) of the plant extracts samples were added to 1.8 mL of a 0.004% methanolic solution of DPPH. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured against a blank at 517 nm[11]. The percentage (%) to scavenge DPPH radical was calculated by the following formula[34]:

$$\text{DPPH scavenging activity (AA in \%)} = \frac{(\text{Ac} - \text{At})}{\text{Ac}} \times 100$$

where Ac is the absorbance of the control (without extract), and At is the absorbance of the test (with extract).

Trolox and ascorbic acid were used as positive controls. The concentration of extract that provided 50% of DPPH inhibition (IC₅₀) was calculated from the graph plotted of inhibition capacity (AA in %) against extracts and standards concentrations using linear regression equations[11].

2.5. Antibacterial activity

2.5.1. Bacteria strains

The antibacterial activity of *C. erythraea* extracts was tested against *Escherichia coli* K12 (*E. coli*) (Laboratory of Food Microbiology, UCL, Belgium: MBLA), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (Institute of hygiene, Rabat, Morocco: IH), *Staphylococcus aureus* CECT 976 (*S. aureus*), and *L. monocytogenes* serovar 4b CECT 4032 (Spanish Type Culture Collection: CECT). Strains were maintained on an inclined agar medium at 4 °C. Before use, the bacteria were revived by two subcultures in an appropriate culture medium: Luria-Bertoni (LB) broth at 37 °C for 18–24 h. For the test, final inoculum concentrations were about 10⁶ CFU/mL[11].

2.5.2. Agar-well diffusion assay

For the determination the diameter of inhibition of extracts against

the tested bacteria, we have used agar-well diffusion assay as described in our previous studies[10-12]. A basal layer was prepared by Muller-Hinton agar. After the agar plates were solidified, sterile 8 mm diameter cylinders were deposited. Six mL of LB medium in superfusion containing 0.8% agar were inoculated by a fresh culture of indicator bacterial strain (the final concentration was 10^6 CFU/mL). After solidification, the wells were filled with 50 μ L of diluted extracts at 25 mg/mL. After incubation at appropriate temperature for 24 h, all plates were examined for any zone of growth inhibition, and the diameter of these zones was measured in millimeters. All the tests were performed in triplicate.

2.5.3. Minimum inhibitory concentration (MIC)

MICs were determined using the broth micro-dilution assay as described in our previous studies[11,12]. LB medium containing 0.15% (w/v) of agar was used as a stabilizer of the extract-water mixture and the resazurin was used as a bacterial growth indicator. 50 μ L of LB (0.15% agar w/v) was distributed from the 2nd to the 8th well of a 96-well polypropylene microtitre plate. A dilution of each extract was prepared in methanol, to reach a final concentration of 32 mg/mL; 100 μ L of these suspensions were added to the first test well of each microtitre line, and then 50 μ L of scalar dilution was transferred from the 2nd to the 7th well. The 8th well was considered as a growth control, because no extract was added. Then, we added 50 μ L of a bacterial suspension to each well at a final concentration of approximately 10^6 CFU/mL. The final concentration of the extract was between 16 and 0.25 mg/L. After incubation at 37 °C for 18 h, 10 μ L of resazurin was added to each well to assess bacterial growth. After further incubation at 37 °C for 2 h, the MIC was determined as the lowest concentration that prevented a change in resazurin color[11,12]. Bacterial growth was detected by reduction in blue dye resazurin to pink resorufin. A control was carried out to ensure that, at the tested concentrations, the extract did not cause a color change in the resazurin. Experiments were performed in triplicate.

2.5.4. Minimum bactericidal concentration (MBC)

MBC corresponds to the lowest concentration of the extract yielding negative subcultures after incubation at appropriate temperature for 24 h[11,12]. It was determined in broth dilution tests by sub-culturing 10 μ L from negative wells on PCA medium[11,12]. All the tests were performed in triplicate.

2.6. Antileishmanial activity

2.6.1. Culture of leishmania species

Leishmania species tested in this study were: *L. infantum* (MHOM/MA/1998/LVTA), *L. tropica* (MHOM/MA/2010/LCTIOK-4) and *L. major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09). These three species were isolated and identified from Moroccan infected patients at the National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat-Morocco. The species were cultivated as described by Et-Touys *et al.*[35]. Briefly, parasite cultures of each *Leishmania* species were washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 1500 r/min for 10 min. Cells were then re-suspended in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of penicillin-streptomycin mixture. Cultures were maintained at 23 °C.

2.6.2. Antileishmanial activity

Before evaluating the antileishmanial activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density reached a threshold concentration of 10^6 cells/mL,

L. infantum, *L. tropica* and *L. major* promastigotes were washed twice with PBS and centrifuged at 2500 r/min for 10 min. To evaluate the anti-promastigote activity, 100 μ L of parasites culture was resuspended in a 96-well tissue culture plate, in fresh culture medium according to Et-Touys *et al.*[35]. Briefly, parasites were incubated at 2.5×10^6 cells/well for 72 h at 23 °C in the presence of various concentrations of extract (μ g/mL) dissolved in 1% DMSO. DMSO was used at a final concentration never exceeding 1% which is not toxic to parasites[36,37]. Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls. Glucantime® was used as positive control.

2.6.3. Cell viability assay

The viability of *Leishmania* species was evaluated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay as described by Essid *et al.*[37]. Briefly, 10 μ L of MTT (10 mg/mL) was added to each micro-well and incubated for 3 h at 30 °C. The reaction was stopped by addition of 100 μ L of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazan formed after tetrazolium dye reduction. After 30 min of incubation at room temperature, absorbance was measured at 560 nm using an ELISA plate reader (Synergy HT, Bio-TEK). All assays were conducted in triplicate and compared to negative control (parasites) and reference drug (Glucantime). Cell viability was also evaluated by determination of the extracts concentration which inhibited half of the cell population (IC_{50}), obtained by modeling by plotting percentage of inhibition versus concentration of extract using Original Program. Inhibition percentage (I) was calculated using the following formula[35]:

$$I (\%) = 100 \times (\text{Absorbance untreated cells} - \text{Absorbance treated cells}) / \text{Absorbance untreated cells}.$$

2.7. Data analysis

The statistical analysis was performed by a one-way ANOVA analysis of variance. We considered that the difference is significant for $P \leq 0.05$. Pearson correlation tests were used to assess the relationship between phenolic contents and the IC_{50} values of the antioxidant capacity and antileishmanial activity. These tests were performed by using XLSTAT 2012 program. All experiences were carried out for three replicates and the results were expressed as mean $\pm$ SD.

3. Results

3.1. TPCs

The *C. erythraea* organic extracts showed a good yield and their values have varied according to the used solvent. These values have ranged from (23.21 ± 0.34) to (105.54 ± 0.84) GAE mg/g extract (Table 1). The TPC of methanol extract of *C. erythraea* (MECE) and *n*-hexane extract of *C. erythraea* (HECE) were the highest compared with the TPC of ethyl acetate extract of *C. erythraea* (EACE) and ethanol extract of *C. erythraea* (EECE) ($P < 0.05$).

3.2. TFCs

The TFC was estimated by a colorimetric method using quercetin as a standard flavonoid. The concentration of TFC in the extracts was depended to the solvent of extraction. The values of TFC have ranged from (15.21 ± 0.43) to (38.43 ± 1.30) QE mg/g extract (Table 1). The

HECE showed higher ($P < 0.05$) flavonoids content compared to the other extracts except for the MECE, which contained similar levels ($P > 0.05$). On the other hand, EACE showed the lowest value of TFC ($P < 0.05$).

3.3. Antiradical activity

Figure 1 shows the DPPH radical scavenging ability of *C. erythraea* extracts. As summarized, we noted a highly significant decrease in the DPPH radical concentration ($P < 0.05$) due to the scavenging activity of each extract concentration and standards. At 30.125 µg/mL, the activity of the MECE, EECE, HECE and EACE has ranged from (43.82 ± 4.10%) to (11.22 ± 2.34)%. The activity of the various extracts was significantly lower than that of the ascorbic acid and Trolox ($P < 0.01$). In all cases, it has been found that the ability to scavenge DPPH radical increases significantly with increasing extract concentration ($P < 0.05$). The antiradical capacity of HECE was superior to all tested samples with an IC_{50} value of (49.54 ± 2.43) µg/mL, which was near to the inhibition capacity of the positive controls Trolox [IC_{50} = (43.72 ± 0.31) µg/mL] and ascorbic acid [IC_{50} = (27.20 ± 0.17) µg/mL], followed by MECE [IC_{50} = (58.34 ± 2.86) µg/mL], EECE [IC_{50} = (382.25 ± 5.59) µg/mL] and EACE [IC_{50} = (376.08 ± 3.18) µg/mL] (Table 1).

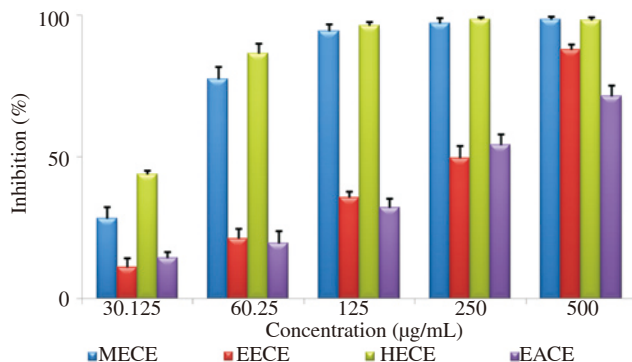


Figure 1. DPPH radical scavenging activities (%) of *C. erythraea* organic extracts (MECE, EECE, HECE and EACE).

Values are means ± SD of three determinations. In this case, effect is increased in a concentration dependent manner; each concentration of extract induces an effect significantly different than other concentration.

Table 1

Percentage yield, TPC, TFC and antioxidant capacity (IC_{50} ± SD) of *C. erythraea* extracts and antioxidant standards.

Extract	% Yield	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	Antiradical capacity IC_{50} (µg/mL)
EECE	27.47	69.42 ± 0.55	29.42 ± 1.05	382.25 ± 5.59
MECE	32.15	105.54 ± 0.84	34.27 ± 1.17	58.34 ± 2.86
EACE	26.32	23.21 ± 0.34	15.21 ± 0.43	376.08 ± 3.18
HECE	23.45	95.61 ± 0.64	38.43 ± 1.30	49.54 ± 2.43
Trolox	—	—	—	43.72 ± 0.31
Ascorbic acid	—	—	—	27.20 ± 0.17

Table 2

Antibacterial activities of *C. erythraea* extracts (MECE, EECE, HECE and EACE) and antibiotics (erythromycin and chloramphenicol) against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes*.

Microorganisms	EECE	MECE	EACE	HECE	Erythromycin	Chloramphenicol
<i>E. coli</i>	19.00 ± 2.34	27.00 ± 1.23	29.00 ± 1.86	32.00 ± 2.42	21.00 ± 2.66	33.00 ± 0.50
<i>S. aureus</i>	24.00 ± 0.50	15.00 ± 2.30	14.00 ± 0.11	24.00 ± 1.60	26.00 ± 3.00	29.00 ± 1.75
<i>P. aeruginosa</i>	19.00 ± 0.20	NA	18.00 ± 0.10	17.00 ± 1.00	NA	21.00 ± 1.50
<i>L. monocytogenes</i>	36.00 ± 1.70	34.00 ± 1.10	43.00 ± 1.50	34.00 ± 2.30	24.00 ± 1.66	27.00 ± 2.33

Final bacterial density was around 10^6 UFC/mL. Inhibition zone diameters (mm) produced around the wells by adding 50 µL of diluted extract (25 mg/mL). All values are means of three assays. NA: Not active.

3.4. Antibacterial activity

The qualitative antibacterial effects of *C. erythraea* extracts are listed in Table 2. We have noticed that except of *P. aeruginosa* which has been resisted to the ethanol extract, all other bacterial strains were sensitive to *C. erythraea* extracts. However, the inhibition values have varied between bacterial species and from an extract to another ($P < 0.05$). With the exception of their effects against *E. coli* K12, any significant difference ($P < 0.05$) has been noted between MECE and HECE. The MIC and MBC values of *C. erythraea* extracts against tested bacteria are shown in Table 3. The MIC and MBC values have ranged from 0.25 to 4 and 0.5 to 8 mg/mL, respectively. The HECE has shown the highest antibacterial activity against all bacteria with the MIC and MBC values ranged from 0.25 to 2 and 0.5 to 8 mg/mL, respectively, but the MECE, EECE and EACE have not shown any antibacterial activity. The MIC value was equal to the MBC value of extracts against strains in some cases which indicated a bactericidal action.

Table 3

MIC (mg/mL) and MBC (mg/mL) of different extracts against the bacteria.

Extracts	<i>E. coli</i> K12		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
MECE	> 8	> 8	0.25	1	4	4	2	8
HECE	8	> 8	0.5	1	2	4	0.5	2
EACE	> 8	> 8	0.5	0.5	4	4	1	> 8

Final bacterial density was around 10^6 UFC/mL.

3.5. Antileishmanial activity

The results of antileishmanial activity of *C. erythraea* extracts against *L. major*, *L. infantum* and *L. tropica* are summarized in Table 4. All *C. erythraea* extracts have inhibited the growth of *Leishmania* species tested with significant variability with Glucantime (positive control). The highest antileishmanial activity was obtained with HECE which exhibited an IC_{50} value of (37.20 ± 1.62) and (64.52 ± 2.20) µg/mL against *L. infantum* and *L. major*, respectively. The MECE has shown a moderate antileishmanial effect with an IC_{50} value of (124.82 ± 1.75) and (126.16 ± 3.29) µg/mL against *L. infantum* and *L. major*, respectively. Also, the IC_{50} values of EACE were (143.20 ± 3.82) and (128.30 ± 2.35) µg/mL against *L. infantum* and *L. major*, respectively.

Table 4

Antileishmanial (IC_{50} ± SD) of *C. erythraea* extracts (MECE, EECE, HECE and EACE) and positive control (Glucantime).

Extracts	<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>	<i>L. tropica</i>
MECE	124.82 ± 1.75	126.16 ± 3.29	247.24 ± 2.59
HECE	125.04 ± 1.93	64.52 ± 2.20	37.20 ± 1.62
EACE	143.20 ± 3.82	128.30 ± 2.35	> 500
EECE	373.18 ± 2.23	> 500	> 500
Glucantime	> 500	> 500	> 500

3.6. Relationship between phenolic content and antileishmanial and antioxidant capacity

Table 5 shows the coefficient correlation between TPC and IC₅₀ of antioxidant and antileishmanial activities on one hand and TFC and IC₅₀ of antioxidant and antileishmanial activities on the other hand. The correlation coefficients between TFC and antileishmanial capacity (IC₅₀) were $R^2 = 0.935$, $R^2 = 0.905$ and $R^2 = 0.647$ for *L. major*, *L. infantum* and *L. tropica*, respectively. While, the coefficients between TPC and antileishmanial capacity were $R^2 = 0.018$, $R^2 = 0.020$ and $R^2 = 0.553$ for *L. major*, *L. infantum* and *L. tropica*, respectively. These correlations confirm that the IC₅₀ decreases with increasing TFC, which gave a good antileishmanial activity. For antioxidant capacity (IC₅₀) it was moderately correlated with TPC ($R^2 = 0.709$) and TFC ($R^2 = 0.635$).

Table 5

Correlation coefficient between phenolic content and antileishmanial and antioxidant capacity (IC₅₀).

Components	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>	Antioxidant activity
TPC	$R^2 = 0.018$	$R^2 = 0.020$	$R^2 = 0.553$	$R^2 = 0.709$
TFC	$R^2 = 0.935$	$R^2 = 0.905$	$R^2 = 0.647$	$R^2 = 0.635$

4. Discussion

The *Leishmania* and bacterial species have developed several mechanisms which allowed them to resist against numerous antimicrobial agents. This situation has led to the emergence and the re-emergence of infectious diseases. On the other hand, several studies have proved the implication of oxidative stress caused by disequilibrium in electron transfer; in some complications such as neurodegenerative, cardiovascular and cancers diseases. Several approaches have been investigated to search now molecules that have antimicrobial and antioxidant effects. Medicinal plants constitute a key candidate for screened natural compounds that possess antibacterial[12,19], antioxidant[11,13] and antileishmanial activities[35,37].

Polyphenols are compounds bio-metabolized by medicinal plants in their different parts (leaves, root, flowering, fruit, etc.) as secondary metabolites. Several studies have showed that these compounds possess numerous pharmacological properties including antibacterial, antileishmanial and antioxidant effects[38]. These properties have been correlated with a group of phenolics compounds called flavonoids that have a benzo-γ-pyrone structure[39]. These molecule groups have showed other pharmacological activities such as a mitochondrial adhesion inhibitor, an antiulcer, an anti-arthritis, an antiangiogenic and an anticancer agent[40]. Furthermore, some studies have established the correlation link between the consumption of these molecules and prevention of some diseases such as oxidative stress related diseases, chronic inflammation, immune related diseases, diabetes and cancer[41].

In our study, we have estimated firstly the total phenolic and flavonoid contents by colorimetric methods using gallic acid and quercetin as standards of polyphenols and flavonoids, respectively. It must be noted that the used extracts have presented a good amount of polyphenols and flavonoids which have varied according

to the solvent polarity. According to Tawaha *et al.*, the amount of flavonoids and polyphenols is considered very high if it's higher than 20 mg GAE/g extract[42]. Based on this study, *C. erythraea* can be considered a very important source of phenolic compounds.

The antioxidant effects were determined by DPPH scavenging assay (a stable free radical that has mostly been used for screening the ability of compounds to scavenge free radicals). This method aimed at the reduction of DPPH radical by molecules which are capable to donate hydrogen[43,44]. We have chosen this method because of its advantages to measure the antioxidant activity at ambient temperature preventing therefore the probability of thermal degradation of the molecule tested[45,46]. Our results were in consensus with other studies demonstrating the antiradical activity of *C. erythraea*[47,48]. The antiradical activity of plant extracts due to their redox potentials[49], which play a key role in neutralizing free radicals, to donate hydrogen, quench singlet oxygen and act as metal chelators[50].

The test of the antibacterial activity has revealed that all *C. erythraea* extracts were active against bacterial strains using agar well diffusion assay. While, the MICs of some extracts were showed at the highest concentration. The difference observed could be explained by the difference of the chemical contents of different extracts. Indeed, the solvents used for extraction have a large difference in their polarity and a dielectric constant specific to charge separated between different chemical compositions. The antibacterial activity of these compounds has been attributed to their hydrophobic character of phenolic content[51].

In our study, we have found that Gram-positive bacteria presented by *S. aureus* and *L. monocytogenes* were more sensitive to *C. erythraea* extracts than Gram-negative ones presented by *E. coli* and *P. aeruginosa*. This finding was in consonance with other works that have indicated the sensitivity of Gram-positive bacteria to natural products[12,52]. On the other hand, Gram-negative bacteria resist to natural antibacterial agents. Indeed, these strains possess a hydrophilic outer membrane which allowed them the penetration of hydrophobic compounds[53].

These results are important due to the fact that *L. monocytogenes* serovar 4b (pathogenic bacteria implicated in several pathology such as meningitis) has been inhibited by EECE with MBC = 1 mg/mL. In addition, HECE has inhibited the growth *S. aureus* MBLA (strain that produce beta-haemolysin and enterotoxin A which are mainly implicated in food poisoning incident). On the other hand, it must be noted that the extract showing the highest inhibition diameters are not always the ones that present the lowest MIC and MBC values. Indeed, the inhibition diameters are influenced by several factors such as solubility of extracts.

When evaluating the antileishmanial activity of the *C. erythraea* extracts, it has appeared that some of them exhibited a stronger and even greater activity than Glucantime (positive control). Moreover, in contrary to other studies[37,54], *L. major* promastigotes has appeared more sensitive than *L. infantum*. Previous studies have ascertained the antioxidant, ant-diabetic, anti-hyperglycemic and hepatoprotective activities of this medicinal plant[28,32,47,55], but only scarce data on their leishmanicidal activity are available. To our knowledge, our report is the first to deal with leishmanicidal activity of *C. erythraea* on promastigote cultures of *L. major*, *L.*

infantum and *L. tropica*. Therefore, this *Leishmania* species have been tested with a Moroccan endemic medicinal plant (*Salvia barbecana*) and hexane extract has proved IC₅₀ value which reaches 14.11 µg/mL against *L. infantum*[32].

Interestingly, we report here that the differential antileishmanial effects of these extracts were related not only to their chemical composition but also to the nature of the promastigote species and the differential antileishmanial activity of these extracts against the same promastigote species is related to the differential composition of such extracts. It's the first time that the antileishmanial properties of *C. erythraea* extracts have tested against *Leishmania* promastigote forms. Our results are important compared with others tested extracts against the same species[13,35].

The mechanism of action of these extracts can be suggested to the specific cellular targets that disrupt the cell membrane and cell lysis. The interaction with mitochondrial membrane can be suggested in this case as another targeting pathway inducing the death of parasites by apoptosis. These actions could be attributed in our study to the TFC, which showed a very height correlation with antileishmanial capacity especially against *L. major* ($R^2 = 0.935$) and *L. infantum* ($R^2 = 0.905$).

The results obtained in our study gave suggestions that the high pharmacological properties of HECE and MECE may be attributed to the major compounds present in these two extracts. This does not exclude the possibility that the other constituents may also participate in these biological properties alone or in synergetic with major compounds.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the National Center for Scientific and Technical Research (NCSTR) from Morocco for support funding (Grant No. 376UM5) of the doctoral grant of Abdelhakim Bouyahya.

References

- [1] Rolain JM, Abat C, Jimeno MT, Fournier PE, Raoult D. Do we need new antibiotics? *Clin Micro Infect* 2016; **22**: 408-15.
- [2] Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, Charfi S, et al. Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie* 2017; doi: 10.1007/s10298-017-1118-z.
- [3] Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microb Infect* 2000; **2**: 189-98.
- [4] Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, et al. Listeria-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; **40**: 4-13.
- [5] Ryan KJ, Ray CG. *Sherris medical microbiology*. 4th ed. New York: McGraw Hill; 2004.
- [6] Monzote L. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrob Agen J* 2009; **1**: 9-19.
- [7] Yildirm A, Mavi A, Oktay M, Kara AA, Algur OF, Bilalogu V. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf Ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and blak tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 5030-4.
- [8] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalavci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Aller Org* 2012; **5**: 9-19.
- [9] Kaplan M, Mutlu EA, Benson M, Fields JZ, Banan A, Keshavarzian A. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant mediated inflammatory disorders. *Ther Med* 2007; **15**: 207-16.
- [10] Bouyahya A, Abrini J, El-Baabou A, Bakri Y, Dakka N. Determination of phenol content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from north-west of Morocco. *J Plant Pathol Microbiol* 2016; **7**: 107-11.
- [11] Bouyahya A, El Moussaoui N, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts. *Br Biotechnol J* 2016; **14**: 1-10.
- [12] Bouyahya A, Abrini J, Khay EL, Charfi S, Boujida N, EL Harsal A, et al. *In vitro* antibacterial of organic extracts from north-west Moroccan medicinal plant *Myrtus communis* (L.). *Br Biotechnol J* 2016; **16**: 1-9.
- [13] Et-Touys A, Fellah H, Mniouil M, Bouyahya A, Dakka N, Abdennebi EH, et al. Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Br Microbiol Res J* 2016; **16**: 1-10.
- [14] Khouchlaa A, Bouyahya A, Ait Lahcen S, Youssef B, Nadia D, Tijane M. Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *Zizyphus lotus* L. extracts. *Worl J Pharm Res* 2017; **6**: 1354-67.
- [15] Bouyahya A, Abrini J, Talbaoui A, Et-Touys A, Chatoui K, Harhar H, et al. Phytochemical screening, antiradical and antibacterial activities of *Cistus crispus* from Morocco. *J Mater Environ Sci* 2017; **8**: 1560-6.
- [16] Bouyahya A, Abrini J, Et-Touys A, Lagrouh F, Dakka N, Bakri Y. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of Moroccan honey samples. *Phytoth* 2017; DOI 10.1007/s10298-017-1122-3.
- [17] Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Origanum compactum* extracts. *Phytothérapie* 2017; doi: 10.1007/s10298-017-1101-8.
- [18] Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; **15**: 4405-9.
- [19] Aneb M, Talbaoui A, Bouyahya A, EL Boury H, Amzazi S, Benjouad A, et al. *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *Euro J Med Plant* 2016; **16**: 1-13.
- [20] Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. Essential oils as anticancer agents: news on mode of action. *Phytothérapie* 2016; doi: 10.1007/s10298-016-1058-z.
- [21] Bouyahya A, Bensaid M, Bakri Y, Dakka N. Phytochemistry and ethnopharmacology of *Ficus carica*. *Int J Biochem Res Rev* 2016; **14**: 1-12.
- [22] Bouyahya A, Jamal A, Edaoudi F, Et-Touys A, Bakri Y, Dakka N. *Origanum compactum* Benth: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *Med Arom Plant* 2016; **5**: 252.
- [23] Bouyahya A, Bakri Y, Khay EO, Edaoudi F, Talbaoui A, Et-Touys A, et al. Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan

- medicinal plants: a review. *Asian Pac Trop Dis* 2017; **7**: 57-64.
- [24] Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, Yahyaoui El, et al. *In vitro* screening of antibacterial and antioxidant activities of essential oils from four Moroccan medicinal plants. *Microbiol Res J Int* 2017; **18**: 1-10.
- [25] Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J Ethnopharmacol* 1991; **35**: 123-43.
- [26] Merzouki A, Ed-derfoufi F, Molera-Mesa J. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district. *Fitoterapia* 2000; **71**: 278-307.
- [27] Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilali J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the north centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol* 2001; **77**: 175-82.
- [28] Benhamza LM, Djerrou Z, Pacha YH. Evaluation of anti-hyperglycemic activity and side effects of *Centaurium erythraea* (L.) Pers. in rats. *Afr J Biotechnol* 2013; **12**: 6980-5.
- [29] Haloui M, Louedec L, Michel JB, Lyoussi B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. *J Ethnopharmacol* 2000; **71**: 465-72.
- [30] Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption versus regeneration. *Arch Biochem Biophys* 1995; **323**: 373-81.
- [31] Valentão P, Andrade PB, Silva AM, Moreira MM, Seabra RM. Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2,3-dihydroisocoumarin from *Centaurium erythraea* aerial parts. *Nat Prod Res* 2003; **17**: 361-4.
- [32] Mrrouh M, Saab Y, Rizkallah R. Hepatoprotective activity of *Centaurium erythraea* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 2004; **18**: 431-4.
- [33] Abo El-Maati MF, Mahgoub SA, Labiba SM, Al-Gabya AMA, Ramadan MF. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *Eur J Integr Med* 2016; **8**: 494-504.
- [34] Bouterfas K, Mehdadi Z, Elaoufi MM, Latreche A, Benchiha W. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Ann Pharm* 2016; **74**: 453-62.
- [35] Et-Touys A, Fellah H, Sebt F, Mniouil M, Aneb M, Elboury H, et al. *In vitro* antileishmanial activity of extracts from endemic Moroccan Medicinal Plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *verbenaca* Maire (*S. clandestina* Batt. non L.). *Eur J Med Plants* 2016; **16**: 1-8.
- [36] Oliveira LFO, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RO, Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 2011; **118**: 87-96.
- [37] Essid R, Rahali FZ, Msaada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, et al. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Ind Crop Prod* 2015; **77**: 795-802.
- [38] Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocher P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006; **97**: 654-60.
- [39] Kumar PP, Kumaravel S, Lalitha C. Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *Afr J Biochem Res* 2010; **4**: 191-5.
- [40] Biju J, Sulaiman CT, Satheesh G, Reddy VRK. Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014; **6**: 406-8.
- [41] Chalise K, Acharya N, Gurung RP, Bhusal R, Gurung N, Skalko-Basnet P. Antioxidant activity and polyphenol content in edible wild fruits from Nepal. *Int J Food Sci Nutr* 2010; **61**: 425-32.
- [42] Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem* 2007; **104**: 1372-8.
- [43] Blois MS. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 1958; **26**: 1199-200.
- [44] Ozcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J Food Sci* 2003; **68**: 487-90.
- [45] Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Sci Technol* 1997; **30**: 609-15.
- [46] Dvorakova M, Moreira MM, Dostalek P, Skulilova Z, Guido LF, Barros AA. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008; **1189**: 398-405.
- [47] Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 3476-9.
- [48] Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 2006; **94**: 550-7.
- [49] Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 5165-70.
- [50] Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol J Environ Stud* 2006; **15**: 523-30.
- [51] Cetin-Karaca H, Newman MC. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Food Biosci* 2015; **11**: 8-16.
- [52] Albano M, Teles Andrade BFM, Barbosa LN, Pereira AFM, De Sousa da Cunha MLR, Rall VLR, et al. Antibacterial and anti-staphylococcal enterotoxin activities of phenolic compounds. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016; **38**: 83-90.
- [53] Dzotam JK, Touani FK, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Saud J Biol Sci* 2016; **23**: 565-70.
- [54] Ahmed SB, Sghaier RM, Guesmi F, Kaabi B, Mejri M, Attia H, et al. Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis endemic region of Sned (Tunisia). *Nat Prod Res* 2011; **25**: 1195-201.
- [55] Hamza N, Berke B, Cheze C, Marais S, Lorrain S, Abdoufath A, et al. Effect of *Centaurium erythraea* Rafn, *Artemisia herba-alba* Asso and *Trigonella foenum-graecum* L. on liver fat accumulation in C57BL/6J mice with high-fat diet-induced type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol* 2015; **4**: 4-11.



Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities



Abdelhakim Bouyahya^{a, b, *}, Abdeslam Et-Touys^{a, c}, Youssef Bakri^a, Ahmed Talbaui^a, Hajiba Fellah^c, Jamal Abrini^b, Nadia Dakka^a

^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^b Biology and Health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

^c National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2017

Received in revised form

11 August 2017

Accepted 11 August 2017

Available online 15 August 2017

Keywords:

Essential oil

Mentha pulegium

Rosmarinus officinalis

Antileishmanial activity

Antibacterial activity

Antioxidant activity

Ouezzane

ABSTRACT

The aim of the study was the determination of the chemical composition of *Mentha pulegium* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils and the evaluation of their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Essential oils (EOs) were isolated using steam distillation and the chemical composition was determined using GC-MS analysis. The antibacterial activity was tested against ten pathogenic strains using the diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) by microtitration assay. The antioxidant activity was estimated by DPPH free radical scavenging ability and ferric-reducing power. The antileishmanial activity was tested against *Leishmania major*, *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The yield of essential oils (v/w %) *M. pulegium* and *R. officinalis* based on dry weight were 5.4 and 2.7% respectively. GC/MS analysis of *R. officinalis* essential oil (ROEO) revealed the presence of 29 components, mainly represented by oxygenated monoterpenes (63.743%) and hydrocarbons monoterpenes (21.231%). *Mentha pulegium* essential oil (MPEO) revealed 21 components, mainly represented by oxygenated monoterpenes (83.865%). The major components of ROEO were α -pinene (14.076), 1,8-Cineole (23.673) and camphor (18.743), while menthone (21.164) and pulegone (40.98) were the main major components of MPEO. *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs showed a significant antioxidant activity compared with ascorbic acid and Trolox to the IC₅₀ values of 58.27 ± 2.72 and 85.74 ± 7.57 μ g/mL respectively revealed by reducing power assay. As for the antibacterial effect, the highest zone diameters were shown by the MPEO against *Bacillus subtilis* (30 ± 1.43 mm) and *Proteus mirabilis* (28 ± 1.32 mm). These values are significantly important compared with those of the commercialized antibiotic (Erythromycin and Chlorophenicol). The lowest MIC and MBC values were obtained with MPEO against *S. aureus* MBLA (MIC = MBC = 0.25% (v/v)). While, ROEO has exhibited a bactericidal effect against *Listeria monocytogenes* (MIC = MBC = 0.5% (v/v)), *Bacillus subtilis* (MIC = MBC = 1% (v/v)) and *Escherichia coli* (MIC = MBC = 1% (v/v)). For the antileishmanial effect, ROEO is the most active against *L. major* (IC₅₀ = 1.2 ± 0.36 μ g/mL). While, the MPEO has the most leishmanicidal effect against *L. major* (IC₅₀ = 1.3 ± 0.45 μ g/mL). These findings show that the EOs of *M. pulegium* and *R. officinalis* are good sources of bioactive molecules that could have potential applications in the food and pharmaceutical industries.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, the incidence of infectious diseases of bacterial and parasitic origins is increasing, especially in developing countries [1]. Thus, diseases related to oxidative stress, such as

* Corresponding author. Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av. Ibn battouta, BP1014 Rabat, Morocco.

E-mail address: boyahya-90@hotmail.fr (A. Bouyahya).

neurodegenerative diseases, atherosclerosis and cancer, constitute a real threat to public health [2,3]. Today, bacteria have developed several sophisticated means to subvert the action of antibiotics, thus allowing bacterial strains to resist antibiotic packages (multi-resistant strains) [4]. This situation provides an emergence and a reemergence of infectious bacterial diseases whose effects on public health often result in a high mortality rate in developing countries [5].

Leishmaniasis is an anthropologic parasitic disease whose epidemiology reveals a frequent presence in developing countries [6,7]. Antileishmanial used drugs often have side effects that exceed their leishmanicidal action [8,9]. Furthermore, in the last few years, there was a declaration of resistant strains to used drugs which caused a resistant leishmania [10–12].

On the other hand, the oxidative stress remains a real problem for human health. It is mainly implicated in the genesis of several diseases [3,13,14]. The used synthetic antioxidants have shown side effects especially when used for the treatment of stress-related diseases [13,14].

The use of natural products to fight against microbial pathogenesis and stress-related diseases is a very promising strategy to compact these diseases. Indeed, medicinal plant secondary metabolites and their derivatives have shown antibacterial [15–17], antileishmanial [18], antioxidant [19], cytotoxic [20,21] and antilitholic activities [22,23].

EOs are complex organic compounds with a wide variety of organic structures. They are volatile compounds synthesized by aromatic plants as secondary metabolites [4,24,25]. These plants are characterized by the presence of structures specializing in the synthesis and secretion of EOs. These structures include: hairs (Lamiaceae), secretory bags (Myrtaceae) and secretory ducts (Apiaceae) [4]. EOs have shown several pharmacological properties such as antibacterial [4,26], antioxidant [26], antiviral [27], antileishmanial [28], anticancer [24,29], antimutagenic [30] and anti-inflammatory properties [25].

Morocco, like other Mediterranean countries, is rich in medicinal and aromatic plants that are mostly used in traditional medicine to fight against several diseases [31–34]. The province of Ouezzane (North-West of Morocco) is rich in vegetation, including aromatic plants but their valorization is under-evaluated. In fact, there are few studies that tested plant extracts and EOs from these plants in some pharmacological screening such as antibacterial, antioxidant, antileishmanial and antifungal activities [35–41]. In the context of the valorization of medicinal plant products from the province of Ouezzane, the study focused on *M. pulegium* and *R. officinalis*. These two species have been strongly used in traditional medicine to treat numerous diseases such as Leishmaniasis, microbial infections and some oxidative stress related diseases such as inflammation [31,32,42]. *M. pulegium* and *R. officinalis* belong to the Lamiaceae family and are characterized by special structures which secrete essential oils. These two species are mostly used in phytotherapy around numerous Moroccan areas including the area of Ouezzane [43,44]. Therefore, the chemical composition and the *in vitro* pharmacological properties of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs collected from this area have not been evaluated yet; especially with the antileishmanial activity. In this context, the purpose of this study was to determine the chemical composition of two EOs and to investigate their antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities.

2. Material and methods

2.1. Plant material and essential oils extraction

The aerial parts of *R. officinalis* and *M. pulegium* were collected

from its wild habitat in the province of Ouezzane (North-West of Morocco: 34° 47' 50" N and 5° 34' 56" W). Plant's identification was carried out by Pr. Ennabili Abdessalam (PAMSN Laboratory, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fes-Morocco). The samples were air dried at room temperature in the shade. The extraction of EOs was carried out by hydrodistillation, using a Clevenger-type apparatus. The obtained oils were dried with anhydrous sodium sulfate, weighed then stored at 4 °C until use.

2.2. GC-MS analysis of essential oils

The GC-MS analysis of EOs was carried out as described by Talbaoui et al. [45]. It was performed on a TRACE GC ULTRA equipped with non-polar VB5 (5% phenyl, 95% Methylpolysiloxane), Capillary Column (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm), directly coupled to a mass spectrometer (Polaris Q) (EI 70 eV). The temperature of injector and detector was set at 250 and 300 °C, respectively. The oven temperature was programmed from 40 to 180 °C at 4 °C/min, for 180–300 °C at 20 °C/min. Helium was used as gas carrier with a flow rate of 1 mL/min; the sample (0.5 µL) was injected splitless mode. Individual EOs components were identified by comparing their relative retention times with those of authentic samples or by comparison of the relative retention indices (RRI) of the GC peaks to those of a homologous series of n-alkanes (series of C-9 to C-24 n-alkanes) reported in the literature. Each compound was confirmed by comparison of its mass spectra with those of NIST02 library data of the GC/MS system and Adams libraries spectra (NIST/EPA/NIH, 2002; Adams, 2007) [46]. For the percentage of individual components, we have established abundances by normalizing the GC peak areas of each compound without any correction factors.

2.3. Antibacterial activity

2.3.1. Bacteria strains and growth conditions

To evaluate the antibacterial activity of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs, the following bacteria have been used: *Escherichia coli* K12 and *Staphylococcus aureus* MBLA (Laboratory of Food Microbiology, UCL, Belgium: MBLA), *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Staphylococcus aureus* CECT 994, *Listeria monocytogenes* serovar 4b CECT 4032 and *Proteus mirabilis* (Spanish Type Culture Collection: CECT), *Pseudomonas aeruginosa* IH (Institute of hygiene, Rabat, Morocco: IH) and *Bacillus subtilis* 6633 (German Collection of Microorganisms: DSM). Strains were maintained on an inclined agar medium at 4 °C. Before use, the bacteria were revived by two subcultures in an appropriate culture medium: Lysogeny broth (LB) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) at 37 °C for 18–24 h. For the test, final inoculums concentrations of 10⁶ CFU/mL bacteria were used, following the instructions of the National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA (NCCLS 1999).

2.3.2. Agar-well diffusion assay

The principle of this technique is to estimate the bacteriostatic activity of the EOs by measuring the growth inhibition zone of germs around wells. It is mostly used in a preliminary step to further study because it provides access to essentially qualitative results. Briefly, a basal layer was prepared by Muller-Hinton agar. After the agar plates were solidified, sterile 8 mm diameter cylinders were deposited. Six ml of LB medium in superfusion containing 0.8% agar were inoculated by a fresh culture of indicator bacterial strain (a final concentration was 10⁶ CFU/mL). After solidification, the wells were filled with 50 µl of EO. After incubation at appropriate temperature for 24 h, all plates were examined for any zone of growth inhibition, and the diameter of these zones was

measured in millimeters [47]. All the tests were performed in triplicate.

2.3.3. Minimal inhibitory concentration (MIC)

MICs were determined using the broth micro-dilution assay as described [48,49]. Agar at 0.15% (w/v) was used as a stabilizer of the extract-water mixture and resazurin as a bacterial growth indicator. 50 μ L of Bacteriological Agar (0.15% w/v) was distributed from the 2nd to the 8th well of a 96-well polypropylene microtitre plate. A dilution of the essential oil was prepared in Mueller Hinton Broth supplemented with bacteriological agar (0.15% w/v), to reach a final concentration of 2%; 100 μ L of these suspensions was added to the first test well of each microtitre line, and then 50 μ L of scalar dilution was transferred from the 2nd to the 8th well. The 8th well was considered as growth control, because no EO was added. We then added 50 μ L of a bacterial suspension to each well at a final concentration of approximately 10^6 CFU/mL. The final concentration of the EO was between 1 and 0.015% (v/v). Plates were incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, 10 μ L of resazurin was added to each well to assess bacterial growth. After further incubation at 37 °C for 2 h, the MIC was determined as the lowest EO concentration that prevented a change in resazurin colour. Bacterial growth was detected by reduction in blue dye resazurin to pink resorufin. A control was carried out to ensure that, at the concentrations tested, the EO did not cause a colour change in the resazurin [26]. Experiments were performed in triplicate.

2.3.4. Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponded to the lowest concentration of the EO yielding negative subcultures after incubation at appropriate temperature for 24 h. It is determined in broth dilution tests by sub-culturing 10 μ L from negative wells on plate count agar (PCA) medium. All the tests were performed in triplicate [47].

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH free radical-scavenging assay

The stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was used for the determination of free radical-scavenging activity of OCEO [50]. Aliquots (0.2 mL) of various concentrations of the EOs samples dissolved in methanol were added to 1.8 mL of a 0.004% methanolic solution of DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm by using UV spectrophotometer [19]. The percentage (%) to scavenge DPPH radical was calculated using the following formula:

$$\text{DPPH scavenging activity (AA in \%)} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100.$$

where A_c is the absorbance of the control (without oil) and A_t is the absorbance of the test (with oil).

Trolox and ascorbic acid were used as positive control and EO concentrations providing 50% inhibition (IC_{50}) were calculated by plotting the inhibition percentages against the concentrations of the sample [50]. The test was carried out in triplicate and the IC_{50} values were reported as means $\pm$ SD.

2.4.2. Reducing ferric power assay

Reductive ability was investigated by the Fe^{+3} to Fe^{+2} transformations in the presence of the oils [50]. EOs and control were mixed with phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (2.5 mL, 1%). The mixture was then incubated at 50 °C for 20 min. A portion (2.5 mL) of trichloro acetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Finally, the upper layer of solution (2.5 mL)

was mixed with distilled water (2.5 mL) and $FeCl_3$ (0.5 mL, 0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer. The sample concentration providing 0.5 of absorbance (IC_{50}) was calculated by plotting absorbance at 700 nm against the corresponding sample concentration. Trolox and ascorbic acid were used as positive controls. The test was carried out in triplicate and IC_{50} values were reported as means $\pm$ SD.

2.5. Antileishmanial activity

2.5.1. Culture of leishmania species

Leishmania species tested in this study are: *Leishmania infantum* (MHOM/MA/1998/LVTA), *Leishmania tropica* (MHOM/MA/2010/LCTIOK-4) and *Leishmania major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09). These three species were isolated and identified from Moroccan infected patients at the National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat-Morocco. The species were cultivated as described by Et-Touys et al. [18]. Briefly, parasite cultures of each *Leishmania* species were washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Cells were then re-suspended in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of Penicillin-Streptomycin mixture. Cultures were maintained at 23 °C.

2.5.2. Antileishmanial activity

Before evaluating the antileishmanial activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density reached a threshold concentration of 10^6 cells/mL, *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major* promastigotes were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 2500 rpm for 10 min. To evaluate the anti-promastigote activity, 100 μ L of parasite cultures were resuspended in a 96-well tissue culture plate, in fresh culture medium according to Et-Touys et al. [18]. Briefly, parasites were incubated at 2.5×10^5 cells/well for 72 h at 23 °C in the presence of various EO concentrations (μ g/mL) dissolved in 1% DMSO. DMSO was used at a final concentration never exceeding 1%, which is not toxic to parasites [28,51]. Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls. Glucantime® was used as positive control.

2.5.3. Cell viability assay

The viability of leishmania species was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay as described by Essid et al. [28]. (Sigma-Aldrich, USA). Briefly, 10 μ L of MTT (10 mg/mL) were added to each micro-well and incubated for 3 h at 23 °C. The reaction was stopped by the addition of 100 μ L of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazan formed after tetrazolium dye reduction. After 30 min of incubation at room temperature, absorbance was measured at 560 nm using an ELISA plate reader. All assays were conducted in triplicate and compared to the negative control (parasites) and reference drug (Glucantime). Cell viability was also evaluated by determination of the extract concentrations which inhibited half of the cell population (IC_{50}), obtained by modeling the percentage of inhibition versus concentration of EO using Original Program. Inhibition percentage (I) was calculated using the following formula [18]:

$$I(\%) = 100 \times (\text{Absorbance of untreated cells} - \text{Absorbance of treated cells}) / \text{Absorbance of untreated cells}.$$

2.6. Data analysis

The statistical analysis was performed by a one-way ANOVA analysis of variance. We considered that the difference is significant for $P \leq 0.05$. All experiences were carried out for three replicates and the results were expressed as mean $\pm$ SD.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition of essential oils

The chemical composition of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs was determined by GC-MS analysis. 29 components have been identified (97.239%) for ROEO and 21 components (98.743%) for *M. pulegium* (Table 1). The chemical compounds of ROEO are dominated by oxygenated monoterpenes (63.743%) and hydrocarbons monoterpenes (21.231%), while the MPEO is only dominated by oxygenated monoterpenes (83.865%). The major chemical components of ROEO are represented by: the 1,8-Cineole (23.673%), the camphor (18.743%), the borneol (15.46%) and the α -pinene (14.076%). However, the MPEO contains the pulegone (40.98%) and the menthone (21.164%) as major constituents. The chemical composition of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs has been determined by previously studies in other areas of Morocco [52,53]. A comparison between these studies showed the variability of

volatile compounds that depends on the study areas of Morocco. In Tunisia, MPEO has shown a large variability in this species depending on the collection areas [54]. The variation in the obtained results is certainly attributed to the difference in geographical locations and growth conditions that affect the chemical composition of EOs [55,56]. On the other hand, some studies have demonstrated that the chemical composition of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs are varied depending on phenological stage and extraction organs of these species [57–59]. Certainly, the fluctuation in chemical composition of EOs is affected by several cited factors. In fact, these factors may affect and regulate in the space and time the metabolism of essential oils via the activation or the repression of the enzyme genes responsible of EOs synthesis. This regulation is mediated by several epigenetic factors such as DNA methylation, histones modifications and remodelage of chromatin [60,61].

3.2. Antioxidant activity

The antioxidant activity of Moroccan *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs was assessed using two *in vitro* antioxidant commonly used methods (ferric-reducing power test and DPPH radical scavenging assays) compared with a standard synthetic antioxidant (ascorbic acid and Trolox). Results of DPPH free radical scavenging activity and ferric reducing assays of *R. officinalis* and *M. pulegium* EOs are summarized in Fig. 1A and B. The scavenging ability of all the samples revealed a concentration-dependent effect profile. The ROEO showed highest free radical scavenging effect than MPEO at 15 and 30 μ L/mL, while MPEO has a stronger antioxidant effect than ROEO at 60, 125, 250 and 500 μ L/mL. Fig. 1A summarizes the potential ferric reduction of two EOs compared to ascorbic acid and Trolox. EOs were less effective than synthetic antioxidant agents ($p < 0.05$). The reducing power of *R. officinalis* and *M. pulegium* EOs increased with the increase of its concentrations (Fig. 1B). While, there were no significant differences amongst the values of ferric reducing power with increasing concentrations for *R. officinalis* and *M. pulegium* EOs ($p < 0.05$).

Table 2 summarizes the IC_{50} values of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs estimated by ferric reducing and DPPH assays. For the FRAP assay, EOs of *M. pulegium* and *R. officinalis* showed respectively IC_{50} values of 58.27 ± 2.72 μ g/mL and $IC_{50} = 85.74 \pm 7.57$ μ g/mL. While, the IC_{50} values of these two EOs, tested by DPPH assay, were 321.41 ± 2.53 μ g/mL and 523.41 ± 8.25 μ g/mL respectively. On the other hand, Trolox and ascorbic acid showed IC_{50} values at low concentrations especially with DPPH assay.

The FRAP assay that estimates the ferric-reducing capacity of our extract. The reducing power is used as an indicator of the ability of a compound to yield an electron. The reducing ability of a compound is considered as an important indicator of its antioxidant potential, it was used to examine the antioxidant effect *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs (Fig. 1B and Table 2). The obtained results showed that *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs have remarkable antioxidant effects, characterized by a ferric ion reduction proportional to the concentration (Fig. 1B). The reducing properties are usually correlated with the presence of reducing components, which have been demonstrated as the best antioxidant [62]. The antioxidant activity of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs may be due to the phenolic compounds of these oils that are considered as the best proton donors.

On the other hand, it is very important to evaluate the anti-radical activity of our EOs because the deleterious role of the free radicals in food and biological systems. Therefore, we have chosen the DPPH assay to reveal the anti-radical activity *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs. The DPPH test is based on trapping the stable free

Table 1
Chemical composition of *M. pulegium* and *R. officinalis* essential oils.

No	RI	Compounds	<i>R. officinalis</i>	<i>M. pulegium</i>	Identification
1	918	Tricyclene	1.70	—	MS, I _R
2	925	α -thujene	Tr	Tr	MS, I _R
3	931	α -pinene	14.076	0.536	MS, I _R
4	946	camphene	2.712	0.447	MS, I _R
5	957	Sabinene	0.282	0.746	MS, I _R
6	974	β -pinene	0.133	0.172	MS, I _R
7	977	1-Octen-3-ol	0.119	0.473	MS, I _R
8	985	3-Octanone	0.220	0.433	MS, I _R
9	1004	Phellandrene	0.159	—	MS, I _R
10	1023	<i>p</i> -cymene	0.127	0.218	MS, I _R
11	1027	<i>D</i> -Limonene	0.110	2.422	MS, I _R
12	1034	Eucaliptol	0.231	5.199	MS, I _R
13	1042	1,8-Cineole	23.673	3.82	MS, I _R
14	1057	γ -terpinene	0.455	—	MS, I _R
15	1087	Terpinolene	1.487	—	MS, I _R
16	1093	Fenchone	0.122	—	MS, I _R
17	1100	Linalool	0.101	Tr	MS, I _R
18	1146	Camphor	18.743	—	MS, I _R
19	1164	Borneol	15.46	—	MS, I _R
20	1195	α -Terpineol	0.6	7.98	MS, I _R
21	1207	Verbenone	4.687	4.535	MS, I _R
22	1219	Menthone	—	21.164	MS, I _R
23	1233	Neo-menthol	—	2.272	MS, I _R
24	1236	Menthol	—	1.494	MS, I _R
25	1251	Isopulegone	—	0.187	MS, I _R
26	1257	pulegone	—	40.98	MS, I _R
27	1288	Bornyl acetate	2.585	—	MS, I _R
28	1292	Thymol	0.111	—	MS, I _R
29	1301	Carvacrol	0.114	—	MS, I _R
30	1370	Ylangene	0.101	—	MS, I _R
31	1397	Methyl eugenol	0.132	—	MS, I _R
32	1417	Caryophyllene	8.666	—	MS, I _R
33	1452	humulene	—	5.402	MS, I _R
34	1466	Amorphene	0.231	—	MS, I _R
35	1576	caryophyllene oxide	0.102	0.263	MS, I _R
Total			97.239	98.743	
Monoterpene hydrocarbons			21.231	4.541	
Sesquiterpene hydrocarbons			8.998	5.402	
Oxygenated monoterpenes			63.743	83.865	
Oxygenated Sesquiterpenes			0.103	0.263	
Other			2.924	4.672	

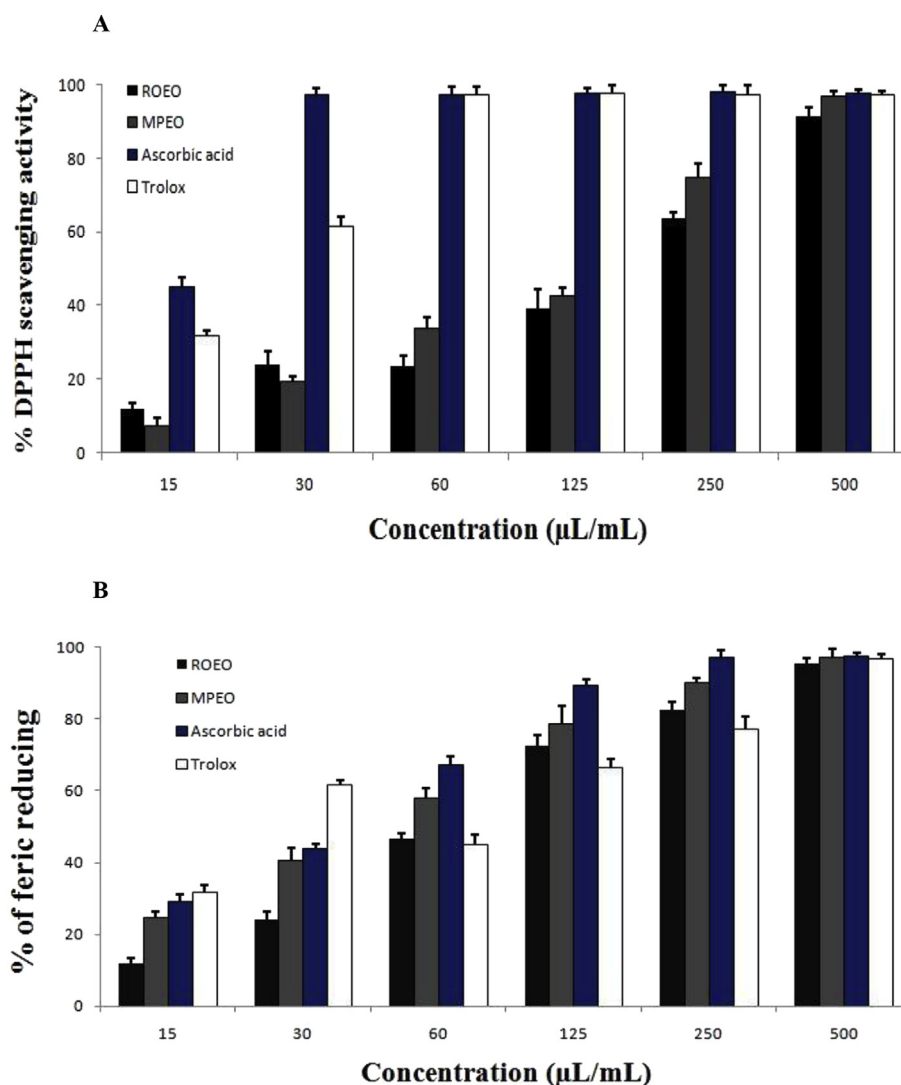


Fig. 1. (A) Antioxidant activity of different concentrations of tested *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils compared to a synthetic antioxidant Trolox and ascorbic acid by free radical DPPH scavenging activity. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations. (B) Antioxidant activity of different concentrations of tested *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils compared to a synthetic antioxidant Trolox and ascorbic acid by ferric reducing power. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations.

Table 2

IC₅₀ values (µg/mL) of *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils.

Assays	Essential oils		Ascorbic acid	Trolox
	<i>R. officinalis</i>	<i>M. pulegium</i>		
DPPH	523.41 $\pm$ 8.25	321.41 $\pm$ 2.53	27.20 $\pm$ 0.17	43.72 $\pm$ 0.31
Reducing power	85.74 $\pm$ 7.57	58.27 $\pm$ 2.72	47.63 $\pm$ 0.58	85.45 $\pm$ 1.36

Values represent means (standard deviations) for triplicate experiments.

radical DPPH by antiradical molecules, resulting in discoloration. The method is quick and easy to implement, and it was carried out at room temperature to eliminate any risk of thermal degradation of the tested molecules. EOs of *M. pulegium* and *R. officinalis* showed remarkable inhibition of DPPH free radical with doses-dependant (Fig. 1A and Table 2). This could be due to its high content of phenolic compounds found in EOs.

The difference of antioxidant capacities between *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs is certainly due to the variability in chemical components. Moreover, there is a difference between the antioxidant assays that could be explained by the mechanisms of which EO

compounds will react with used substrates (FRAP assay estimates the ferric-reducing capacity and DPPH assays evaluates the H donating and radical scavenging capacity). On the other hand, the antioxidant mechanisms of EOs are generally attributed to the several mechanisms such as functional group compound, polarity and chemical behavior [63].

Several studies have reported the antioxidant activity of *M. pulegium* EO [63]. The variation between the obtained results may be attributed to the variation in chemical compositions which vary between areas of the plant collection, the used part of the plant and the method of extraction [64]. On the other hand, some studies have revealed the potent antioxidant capacity of water and methanol extracts of *M. pulegium* compared with EO [65], this difference is certainly due to the presence of phenolics and flavonoids compounds in extracts. Regarding to ROEO, it was exhibited an important antioxidant activity which was in accordance with previous studies [66]. Tested EO revealed important antioxidant effects in DPPH scavenging assay than ferric reducing power assay. Indeed, the antioxidant activity of essential oils is influenced by the used methods [67].

3.3. Antibacterial activity

The *in vitro* results of antibacterial activity of *R. officinalis* and *M. pulegium* EOs by the agar well diffusion assay against eight microorganisms are summarized in Fig. 2. The results obtained are expressed as diameters of inhibition. The values of the inhibition diameter are depending on the tested EO and the susceptibility of the tested species. MPEO has effectiveness activity against almost tested strains than ROEO. On the other hand, the MPEO exhibited a significant antibacterial activity against tested strains by comparing with commercialized antibiotic (Erythromycin and Chlorophenicol) used as positive control. The highest zone diameters were shown with MPEO against *B. subtilis* (30 ± 1.43 mm) and *P. mirabilis* (28 ± 1.32 mm). The quantitative antibacterial effects (MICs and MBC; $\mu\text{L/mL}$) of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs are summarized in Table 3. The MPEO was the better performing than ROEO. These two EOs displayed remarkable antibacterial effect with the lowest MIC values against the Gram-positive bacteria. The lowest MIC and MBC value was obtained MPEO against *S. aureus* MBLA (MIC = MBC = $0.25 \mu\text{L/mL}$). In the almost cases, the MICs values were equal to MBC values indicating thus a bactericidal action at the MIC values.

Regarding to this bactericidal action, it appears that Gram-negative bacteria are most resistant to *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs than Gram-positive bacteria. The resistant of Gram-negative bacteria against EOs is attributed to the outer membrane surrounding the cell wall which restricts the diffusion of hydrophobic compounds through the lipo-polysaccharide [68]. The antibacterial activity of EOs is generally attributed to their main compound and synergistic effects between major and minor components [53,67,68].

Previous studies have reported the antibacterial activity of MPEO [52,58,64], they reported similar results with some variability that due to the tested bacterial strains, used methods or chemical composition of tested essential oils. Our EOs exhibited important bacteriostatic and bactericidal effects against tested bacteria such as *S. aureus* and *E. coli* compared with the results obtained by Cherrat et al. [63]. While, these results are in accordance with those found by Mahboubi and Haghi [69] which

Table 3

The MIC and MBC values (mg/mL) of the *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils against 8 human pathogen bacteria strains tested in microdilution assay.

Microorganisms	<i>R. officinalis</i> essential oil			<i>M. pulegium</i> essential oil		
	MIC	MBC	Effect	MIC	MBC	Effect
<i>S. aureus</i> MBLA	2	2	Bactericidal	0.25	0.25	Bactericidal
<i>S. aureus</i> 976	>2	>2	nd	1	2	Bacteriostatic
<i>S. aureus</i> 994	2	2	Bactericidal	2	2	Bactericidal
<i>P. aeruginosa</i>	>2	>2	nd	2	2	Bactericidal
<i>L. monocytogenes</i>	0.5	0.5	Bactericidal	0.5	0.5	Bactericidal
<i>B. subtilis</i> 6633	1	1	Bactericidal	>2	>2	nd
<i>P. mirabilis</i>	2	>2	Bacteriostatic	0.5	2	Bacteriostatic
<i>E. coli</i> K12	1	1	Bactericidal	0.5	1	Bacteriostatic

MIC: Minimum inhibitory concentration.

MBC: Minimum bactericidal concentration.

nd: not determined.

showed an effective antibacterial activity at low MIC and MBC values. The fluctuations between results are certainly due to the variation in chemical composition. Regarding the antibacterial effects of ROEO, it appears that this oil has less effectiveness bacteriostatic and bactericidal action compared to reported studies [70], while our result is in accordance with Talbaoui et al. [53].

The antibacterial activity is depending on the chemical composition of EOs, bacterial strains tested and used methods [29]. The mechanism of these EOs has not been studied against bacteria. However, it has been demonstrated that other EOs have several antibacterial mechanisms such as it has been investigated [48,49,68]. The mechanisms of action include the cross the cell membrane, the leakage of potassium and the disturbance in the electron respiratory chain. Also, it has recently been shown that some EOs and their derivatives inhibit the quorum sensing signaling pathways thus decreasing the bacterial resistance [4].

3.4. Antileishmanial activity

The antileishmanial activity of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs was evaluated against promastigotes form of *L. major*, *L. tropica* and *L. infantum* using MTT assay. The results obtained are summarized

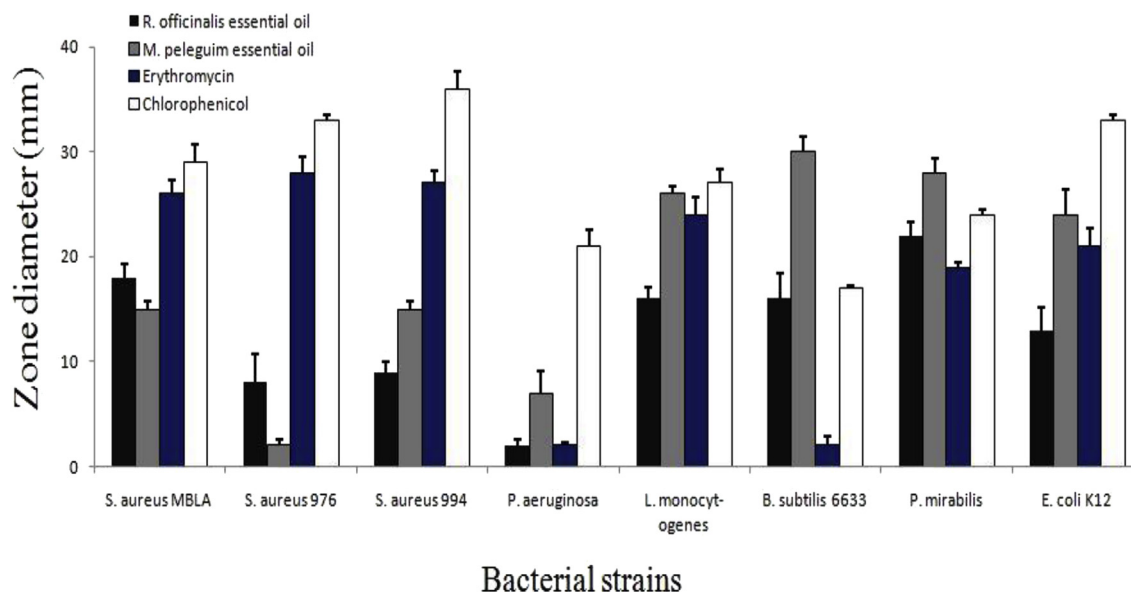


Fig. 2. Antibacterial activity of *M. pulegium* and *R. officinalis* essential oils and commercialized antibiotics (Chlorophenicol and Erythromycin) using agar well diffusion assay. Tests are carried out in triplicate and Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations.

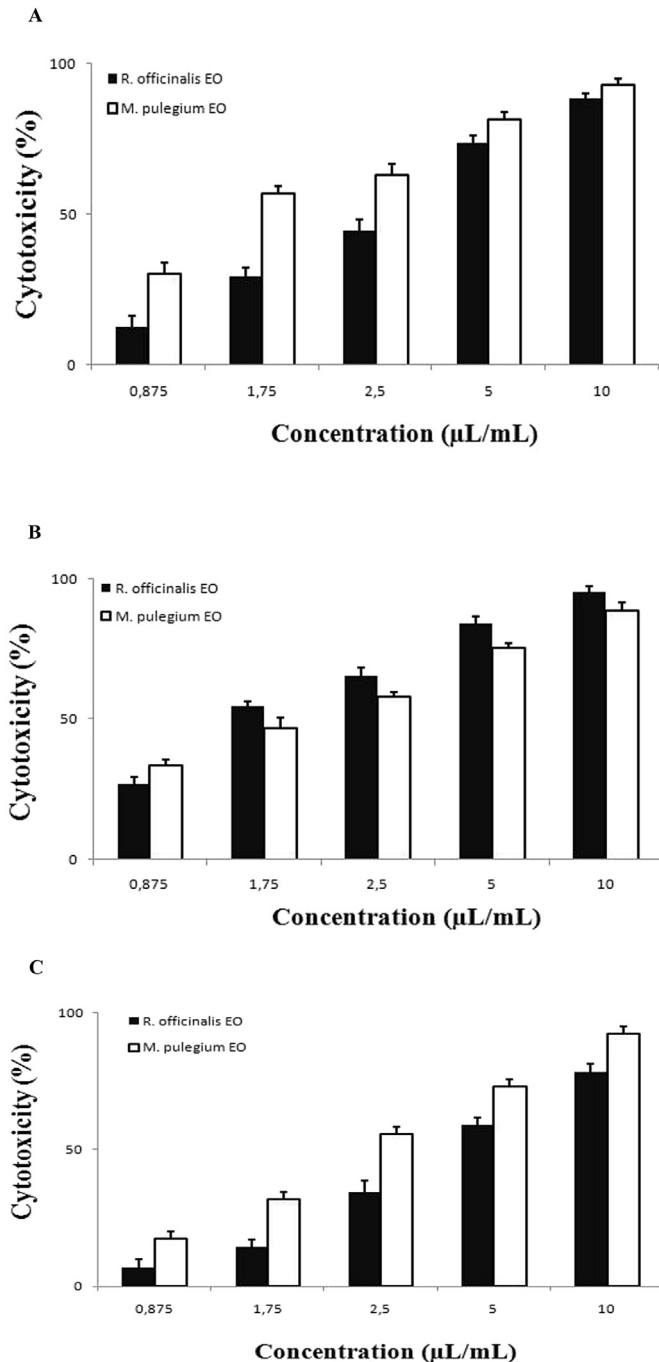


Fig. 3. (A) Antileishmanial activity of different concentrations of tested *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils against *L. major* by MTT assay. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations. (B) Antileishmanial activity of different concentrations of tested *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils against *L. infantum* by MTT assay. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations. (C) Antileishmanial activity of different concentrations of tested *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils against *L. tropica* (3C) by MTT assay. Values are means $\pm$ standard deviation of three determinations.

in Fig. 3a, b and c, they are expressed as the percentage of cytotoxicity of EOs tested in various concentrations. All samples revealed a concentration-dependent cytotoxic effect. At the concentration from 0.875 to 10 μ L/mL, MPEO was more cytotoxic against *L. major* (Fig. 3a) and *L. tropica* (Fig. 3b) than ROEO. To compare the antileishmanial activity of EOs tested and control (Glucantime), the concentration of EO that proved a behalf

Table 4

IC₅₀ values (μ g/mL) for the antileishmanial activity of essential oils obtained from aerial parts of *R. officinalis* and *M. pulegium* essential oils.

Leishmania species	<i>R. officinalis</i>	<i>M. pulegium</i>	Control
<i>L. major</i>	2.6 $\pm$ 0.64	1.3 $\pm$ 0.45	>10
<i>L. infantum</i>	1.2 $\pm$ 0.36	2 $\pm$ 0.83	>10
<i>L. tropica</i>	3.5 $\pm$ 0.83	2.2 $\pm$ 0.25	>10

cytotoxic effect (IC₅₀) was determined by plotting the cytotoxic percentage versus the concentration of essential oil. The values of IC₅₀ are summarized in Table 4, they are ranged from 1.2 $\pm$ 0.36 to 3.5 $\pm$ 0.83 μ g/mL. While, the IC₅₀ values of Glucantime against three Leishmania species tested were >10 μ g/mL. The low IC₅₀ values showed for ROEO against *L. infantum* (1.2 $\pm$ 0.36 μ g/mL) and MPEO against *L. major* (1.3 $\pm$ 0.45 μ g/mL). Regarding to the RPEO, our study revealed potent antileishmanial effect compared with the results obtained by Essid et al. [28], which found that the IC₅₀ values of this oil against *L. infantum* and *L. major* were respectively 16.34 $\pm$ 0.36 and 20.92 $\pm$ 0.67 μ g/mL. On the other hand, the antileishmanial activity of MPEO has not been yet evaluated, and thus this study promotes interesting finding of this oil as novel source of antileishmanial natural agent.

The antileishmanial activity of EOs is certainly attributed to the presence of bioactive molecules that can inhibit the growth of these parasites by numerous mechanisms of action. The spectrum of action of EOs against leishmanial strains is very diver and come from the morphological destruction to the regulation levels. This antileishmanial modes of action include the induction of apoptosis, the decreasing of the energy level of the strains tested by disrupting the electrons chain transport and the inhibition of DNA topoisomerase (the key enzyme in the DNA compaction) [71].

4. Conclusion

Our work has allowed to describe the chemical composition of two Moroccan medicinal plant EOs *M. pulegium* and *R. officinalis*, and to examine their antioxidant, antibacterial and antileishmanial effects. Results presented in this work revealed the remarkable antioxidant effects of *M. pulegium* and *R. officinalis* EOs by two different methods. The evaluation of antibacterial activities revealed a different pattern as a function of the microorganism assayed. All the tested strains were sensitive to PMEO, while ROEO was not active against some tested strains. The antileishmanial activity of our two EOs revealed remarkable cytotoxicity of MPEO against *L. major* and ROEO against *L. infantum* at very low concentrations. Data confirm the possibility of the application of alternatives to traditional treatments, offering thus a great potential by reducing treatment intensity and doses of antimicrobials. Also, these essential oils can be applied for security of foods. However, further studies are needed to describe investigated the action mechanisms of the major compounds against pathogenic bacterial strains and Leishmania species. Also, the combination of these EOs with other physical treatment such as temperature could be useful for food security.

References

- [1] V. Samaras, P.I. Rafailidis, E.G. Mourtoukou, G. Peppas, M.E. Falagas, Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review, *J. Infect. Dev. Ctries.* 4 (2010) 267–281.
- [2] B. Uttara, A.V. Singh, P. Zamboni, R.T. Mahajan, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options, *Curr. Neuropharmacol.* 7 (2009) 65–74.
- [3] L.A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health, *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2008) 89–96.
- [4] A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini,

- N. Dakka, Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria, *Phytothérapie* (2017a), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>.
- [5] P. Ready, Epidemiology of visceral leishmaniasis, *Clin. Epidemiol.* 16 (2014) 147–154.
 - [6] A. El Aasri, Y. El Madhi, M. Najy, O. El Rhaouat, D. Belghyti, Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Sidi Kacem Province, Northwestern Morocco (2006–2014), *Asian Pac J. Trop. Dis.* 6 (2016) 783–786.
 - [7] S. Chiheb, N. Guessous-Idrissi, A. Hamdani, M. Riyad, M. Bichichi, S. Hamdani, A. Krimech, *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in an emerging focus in North Morocco: new clinical forms, *Ann. Dermatol. Venereol.* 126 (1999) 419–422.
 - [8] N. Matoussi, H.B. Ameer, S.B. Amor, Z. Fitouri, S.B. Becher, Toxicité cardiaque de l'antimoniate de méglumine (Glucantime®). À propos d'une observation, *Med. Maladies Infect.* 37 (2007) 257–259.
 - [9] A. Masmoudi, N. Maalej, S. Boudaya, H. Turki, A. Zahaf, Les effets indésirables du Glucantime® en intralésionnel dans le traitement de la leishmaniose cutanée, *Med. Maladies Infect.* 36 (2006) 226–228.
 - [10] J.F. Perez-Victoria, M.P. Sanchez-Canete, K. Seifert, S. SL. Croft, S. Sundar, Castanys F. Gamarro, Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use, *Drug Resist Updat* 9 (2006) 26–39.
 - [11] R. Lira, S. Sundar, A. Makharia, R. Kenney, A. Gam, E. Saraiva, Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kalaazar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*, *J. Infect. Dis.* 180 (1999) 564–567.
 - [12] S. Sundar, Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis, *Trop. Med. Int. Health* 6 (2001) 849–854.
 - [13] J.N. Keller, Interplay between oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease, *J. Biomed. Biotechnol.* 2006 (2006) 1–3.
 - [14] P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Griffin, D.A. Bernlohr, Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 21837–21841.
 - [15] A. Bouyahya, J. Abrini, A. El-Baobou, Y. Bakri, N. Dakka, Determination of phenol content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from North-West of Morocco, *J. Plant Pathol. Microbiol.* 7 (2016a) 107–110.
 - [16] A. Bouyahya, J. Abrini, E.O. Khay, S. Charfi, N. Boujida, A. EL Harsal, A. Talbaoui, A. Et-Touys, Y. Bakri, N. Dakka, *In vitro* antibacterial of organic extracts from North-West Moroccan medicinal plant *Myrtus communis* (L.), *Brit Biotech. J.* 16 (2016b) 1–9.
 - [17] A. Et-Touys, H. Fellah, M. Mniouil, A. Bouyahya, N. Dakka, E.H. Abdennebi, A. Sadak, Y. Bakri, Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco, *Brit Micro Res. J.* 16 (2016a) 1–10.
 - [18] A. Et-Touys, H. Fellah, F. Sebti, M. Mniouil, M. Aneb, H. Elboury, A. Talbaoui, N. A. Sadak, Y. Bakri, *In vitro* antileishmanial activity of extracts from endemic Moroccan medicinal plant *Salvia verbenaca* (L.) Briq. ssp *verbenaca* Maire (S. *Clandestina* Batt. non L.), *Euro J. Medi Plan.* 16 (2016b) 1–8.
 - [19] A. Bouyahya, N. El Moussaoui, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts, *Brit Biotechn J.* 14 (2016c) 1–10.
 - [20] M. Aneb, A. Talbaoui, A. Bouyahya, H. El Boury, S. Amzazi, A. Benjouad, N. Dakka, Y. Bakri, *In vitro* cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*, *Eur. J. Med. Plants* 16 (2016) 1–13.
 - [21] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Phytochemical screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Origanum Compactum* extracts, *Phytothérapie* (2017d), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1101-8>.
 - [22] A. Khouchlaa, A. Bouyahya, S. Ait Lahcen, B. Youssef, D. Nadia, M. Tijane, Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *zizyphus lotus* L. extracts, *World J. Pharm. Res.* 6 (2017a) 1354–1367.
 - [23] A. Khouchlaa, A. El-mehyaoui, A. Bouyahya, M. Tijane, Determination of phenol content and evaluation of *in vitro* litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract, *Phytothérapie* (2017b), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1106-3>.
 - [24] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Essential oils as anticancer agents : news on mode of action, *Phytothérapie* (2016d), <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-016-1058-z>.
 - [25] F. Bakkali, S. Averbek, D. Averbek, M. Idaomar, Biological effects of essential oils -a review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475.
 - [26] A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, A. El Yahyaoui El Idrissi, J. Abrini, N. Dakka, *In vitro* screening of antibacterial and antioxidant activities of essential oils from four Moroccan medicinal plants, *Micro Res. J. Inter* 18 (2017b) 1–10.
 - [27] N. El Moussaoui, G. Sanchez, E.O. Khay, M. Idaomar, A. Ibn Mansour, J. Abrini, Antibacterial and antiviral activities of essential oils of Northern Moroccan plants, *Br. Biotechnol. J.* 3 (2013) 318–331.
 - [28] R. Essid, F.Z. Rahali, K. Msaada, I. Sghair, M. Hammami, A. Bouratbine, K. Aoun, F. Limam, Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia, *Indus Crop Prod.* 77 (2015) 795–802.
 - [29] A. Bouyahya, Y. Bakri, E.O. Khay, F. Edaoudi, A. Talbaoui, A. Et-Touys, J. Abrini, N. Dakka, Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review, *Asian Pac J. Trop. Dis.* 7 (2017c) 57–64.
 - [30] N. Mezzoug, A. Elhadri, A. Dallouh, S. Amkiss, N.S. Skali, J. Abrini, A. Zhiri, D. Baudoux, B. Diallo, M. El Jaziri, M. Idaomar, Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents, *Mutat. Res.* 629 (2007) 100–110.
 - [31] J. Fakchich, M. Elachouri, Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments, *J. Ethnopharmacol.* 28 (2014) 76–87.
 - [32] A. El Hamsas El Youbi, I. Ouahidi, L. El Mansouri, A. Daoudi, D. Boust, Ethnopharmacological survey of plants used for immunological diseases in four regions of Morocco, *Euro J. Med. Plan.* 13 (2016) 1–24.
 - [33] M. Ghouiri, L. Zidane, A. Douira, Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien), *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7 (2013) 1688–1700.
 - [34] N. Benlamdini, M. Elhafian, A. Rochdi, L. Zidane, Étude Floristique et Ethnobotanique de La Flore Médicinale Du Haut Atlas Oriental (Haute Moulouya), *J. Appl. Biosci* 78 (2014) 771–787.
 - [35] A. Bouyahya, N. Dakka, A. Talbaoui, A. Et-Touys, H. El-Boury, J. Abrini, Y. Bakri, Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic *Origanum Compactum* Benth), *Industrial Crops Prod.* 108 (2017) 729–737.
 - [36] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Et-Touys, Y. Bakri, N. Dakka, Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities, *Euro. J. Integ. Med.* 13 (2017) 9–25.
 - [37] E.O. Khay, A. Bouyahya, K. El Issaoui, S. Zinebi, J. Abrini, Study of synergy between *Mentha pulegium* essential oil, honey and bacteriocin-like inhibitory substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12, *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3 (2016) 29–35.
 - [38] A. Bouyahya, A. Et-Touys, N. Dakka, H. Fellah, J. Abrini, Y. Bakri, Y. Bakri, Anti-leishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco, Beni-Suef Univ. J. Basic. Appl. Sci. (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.06.003>.
 - [39] A. Bouyahya, Y. Bakri, O. Belmehdi, A. Et-Touys, J. Abrini, N. Dakka, Phenolic extracts of *Centaureum erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities, *Asian Pacif. J. Trop. Med.* 7 (2017) 433–439.
 - [40] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Talbaoui, A. Et-Touys, K. Chatoui, H. Harhar, Y. Bakri, N. Dakka, Phytochemical screening, antiradical and antibacterial activities of *Cistus crispus* from Morocco, *J. Mater & Environm Scie* 8 (2017) 1560–1566.
 - [41] F. Fadel, D. Ben Hmamou, R. Salghi, B. Chebli, O. Benali, A. Zarrouk, E.E. Ebnso, A. Chakir, B. Hammouti, B. Antifungal activity and anti-corrosion inhibition of *Origanum compactum* extracts, *Int. J. Electrochem Sci.* 8 (2013) 11019–11032.
 - [42] L. El-Rhaffari, K. Hammani, M. Benlyas, A. Zaid, Traitement de la leishmaniose cutanée par la phytothérapie au Tafilalet, *Biol. Santé* 1 (2002) 4.
 - [43] A. Ennabili, N. Gharnit, E.L. Hamdouni, Inventory and social interest of medicinal, aromatic and Honey-plants from Mokriset region (NW of Morocco), *Stud. Bot.* 19 (2000) 57–74.
 - [44] A. Merzouki, F. Ed-derfoufi, J. Molero Mesa, Contribution to the knowledge of Rifan traditional medicine. II: folk medicine in Ksar Lakbir district NW Morocco, *Fitoterapia* 71 (2000) 278–307.
 - [45] A. Talbaoui, L. El Hamdaoui, M. El Moussaoui, M. Aneb, S. Amzazi, Y. Bakri, GC-MS analysis and antibacterial activity of hydro-distillation oil from *Tetradlea articulata* wood grown in Khemisset (Morocco), *J. Indian Acad. Wood Sci.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s13196-016-0173-7>.
 - [46] R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/quadrupole Mass Spectroscopy, Allured Publishing Co, CarolStream, IL, USA, 2007.
 - [47] S. Bouhdid, S.N. Skali, M. Idaomar, J. Zhiri, A. Baudoux, J. Abrini, Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil, *Afr. J. Biotech.* 7 (2009) 1563–1570.
 - [48] S. Bouhdid, J. Abrini, A. Zhiri, M.J. Espuny, A. Manresa, Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil, *J. Appl. Microbiol.* 106 (2009) 1558–1568.
 - [49] S. Bouhdid, J. Abrini, M. Amensour, A. Zhiri, M.J. Espuny, A. Manresa, Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 1139–1149.
 - [50] C. Alaoui Jamali, A. Kasrati, K. Bekkouche, L. Hassani, H. Wohlmuth, D. Leach, A. Abbad, Phenological changes to the chemical composition and biological activity of the essential oil from Moroccan endemic thyme (*Thymus maroccanus* Ball), *Ind. Cro Prod.* 49 (2013) 366–372.
 - [51] L.F.O. Oliveira, A.O. Schubach, M.M. Martins, S.L. Passos, R.O. Oliveira, M.C. Marzochi, C.A. Andrade, Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world, *Acta Trop.* 118 (2011) 87–96.
 - [52] A. Ait Ouazzou, S. Lorán, A. Arakrak, A. Laglaoui, C. Rota, A. Herrera, R. Pagán, P. Conchello, Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* and *Cyperus longus* essential oils from Morocco, *Food Res. Intern* 45 (2012) 313–319.
 - [53] A. Talbaoui, N. Jamaly, M. Aneb, A. El Idrissi, M. Bouksaim, S. Gmouh, A. Benjouad, S. Amzazi, Y. Bakri, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants, *J. Med. Plants Res.* 6 (2012) 4593–4600.
 - [54] M. Makkadem, M. Boussaid, N. Ben Fadhel, Variability of volatiles in tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae), *J. Essent. Oil Res.* 19 (2007) 211–214.
 - [55] K. Aboukhalid, A. Lamiri, M. Agacka-Moidoch, T. Doroszewska, A. Douaik,

- M. Bakha, J. Casanova, F. Tomi, N. Machon, C. Al Faiz, Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco, *Chem. Biodivers.* 13 (2016) 1126–1139.
- [56] K.H. Benlarbi, N. Elmtili, F.A. Macias, J.C.G. Galindo, Influence of *in vitro* growth conditions in the production of defence compounds in *Mentha pulegium* L., *Phytochem. Lett.* 8 (2014) 233–244.
- [57] L. Rodrigues, O. Pova, G. Teixeira, A.C. Figueiredo, M. Maldao, A. Monteiro, Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal, *Indus Crop Prod.* 43 (2013) 692–700.
- [58] N. Karray-Bouraoui, M. Rabhi, M. Neffati, B. Baldan, A. Ranieri, B. Marzouk, M. A. Smaoui Lachaal, Salt effect on yield and composition of shoot essential oil and trichome morphology and density on leaves of *Mentha pulegium*, *Indus Crop Prod.* 30 (2009) 338–343.
- [59] M. Alipor, M.J. Saharkhiz, Phytotoxic activity and variation in essential oil content and composition of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) during different phenological growth stages, *Biocat Agricul Biotechnol.* 7 (2016) 271–278.
- [60] C. Vriet, L. Hennig, C. Laloi, Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement, *Cell Mol. Life Sci.* 72 (2015) 1261–1273.
- [61] Z. Avramova, Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes, *Plant J.* 83 (2015) 149–159.
- [62] K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara, T. Nakamura, Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, *J. Agri. Food Chem.* 40 (1992) 945–948.
- [63] L. Cherrat, L. Espina, M. Bakkali, R. Pagan, A. Laglaoui, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 22 (2014) 221–229.
- [64] M. Lahlou, Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytother. Res.* 18 (2004) 435–448.
- [65] A. Kamkar, A.J. Javan, F. Asadi, M. Kamalinejad, The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1796–1800.
- [66] C. Takayama, F.M. de-Faria, A.C.A. de Almeida, R. José Dunder, L.P. Manzo, E.A. Rabelo Socca, L.M. Batista, M.J. Salvador, A.R.M. Souza-Brito, A. Luiz-Ferreira, Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat, *As Pacif. J. Trop. Biom* 6 (2016) 677–681.
- [67] M.M. Tajkarimi, S.A. Ibrahim, D.O. Cliver, Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control.* 21 (2010) 1199–1218.
- [68] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 223–253.
- [69] M. Mahboubi, G. Haghi, Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil, *J. Ethnopharmacol.* 119 (2008) 325–327.
- [70] W. Wang, N. Li, M. Luo, Y. Zu, T. Efferth, Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components, *Molecules* 17 (2012) 2704–2713.
- [71] C. Castro, M. Jimenez, M. Gonzalez-De-Parra, Inhibitory effect of piquerol A on the growth of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Planta Med.* 58 (1992) 281.

***Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities**

Abdelhakim Bouyahya^{a,b,*}, Abdeslam Et-Touys^{a,c}, Jamal Abrini^b, Ahmed Talbaoui^a, Hajiba Fellah^c, Youssef Bakri^a, Nadia Dakka^a

^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, and Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^b Biology and health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

^c National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat, Morocco

***Corresponding author:** Abdelhakim Bouyahya

E-Mail: bouyahya-90@hotmail.fr ; **Phone:** +212601350878

Postal address : Abdelhakim Bouyahya, Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av. Ibn battouta BP1014 Rabat-Morocco.

ABSTRACT

This study aimed to reveal the chemical composition of *Lavandula stoechas* L. (*L. stoechas*) essential oils and to evaluate their antileishmanial, antibacterial and antioxidant properties. The essential oil was extracted by hydrodistillation using Clevenger apparatus. The chemical composition of *L. stoechas* essential oil was determined using GC-MS analysis. The antibacterial activity was tested against pathogenic strains using the diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) by microtitration assay. The antioxidant activity was estimated by DPPH free radical scavenging ability and ferric-reducing power. The antiparasitic activity was tested against *Leishmania major*, *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The major components of *L. stoechas* essential oils are represented by fenchone (31.81%), camphor (29.60%), terpineol (13.14%), menthone (8.96%) and eucalyptol (5.88%). The oil has revealed an important antioxidant capacity compared with ascorbic acid and Trolox. The highest inhibition was obtained against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* MBLA by a diameter inhibition of 23±0.85 and 21±0.25 mm respectively. The lowest MIC and MBC values were obtained against *L. monocytogenes* (MIC=MBC=0.25% (v/v)). The essential oil was most active against *L. major* with an IC₅₀ value of 0.9±0.45% (v/v). From these results, we conclude that *L. stoechas* essential oils could have potential applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Leishmaniasis; essential oil; bactericidal effect; antioxidant effect; antileishmanial effect.

1. Introduction

The incidence of bacterial infectious diseases, leishmaniasis and oxidative stress related diseases has increased during the last decades. These diseases are related to difficulties encountered in their treatment, increase in drug resistance and side effects of conventional medication (Bouyahya et al., 2016a; Bouyahya et al., 2017a). In this context, natural products have a key role in drug discovery as an alternative way (Essid et al., 2015; Khouchlaa et al., 2017). Secondary metabolites of medicinal and aromatic plants present key candidates for discovering antimicrobial agents to fight against numerous microbial diseases. Indeed, several studies have focused on pharmacological properties of medicinal and aromatic products and thus several original researches and reviews revealed their antimicrobial (Bakkali et al., 2008; Bouyahya et al., 2017b), antioxidant (Bouyahya et al., 2016b), antileishmanial (Et-Touys et al., 2016), antitumor (Aneb et al., 2016) and anti-inflammatory (El Hachimi et al., 2017) activities.

Lavandula is an important medicinal and aromatic plant from the Lamiaceae family which produces essential oils. These plant species are largely used in traditional medicine to fight against diseases around the world. In the Ouezzane province, in the North-West of Morocco, medicinal plants have been used for a long time to treat several diseases (Ennabili et al., 2000; Merzouki et al., 2000; Merzouki et al., 2003; Bouyahya et al., 2017c). *In vitro* pharmacological screening activities have shown that some of these plant species possess several biological activities such as antibacterial, antioxidant and antileishmanial effects (Et-Touys et al., 2016; Khay et al., 2016; Bouyahya et al., 2017d; Bouyahya et al., 2017e). However, some species from the province of Ouezzane have not been tested yet. *Lavandula stoechas* L. is an aromatic plant largely used in Moroccan traditional medicine. The essential oil of *L. stoechas* showed several pharmacological activities such as antibacterial (Dadaliogly and Evrendilek, 2004), antioxidant (Carrasco et al., 2015) and anti-inflammatory (Kaplan et al., 2007) activities. However, the antileishmanial property of *L. stoechas* essential oil has not been reported.

In this study, we report the chemical composition and the antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities of *L. stoechas* essential oil in order to assess their potential use for health and/or cosmetic purposes. As far as we know, this is the first report on the antileishmanial activity of *L. stoechas* essential oil against *Leishmania* promastigote species.

2. Material and methods

2.1. Plant material and essential oil extractions

The aerial parts of *L. stoechas* were collected from its wild habitat in province of Ouezzane (North-West of Morocco: 34° 47' 50" N and 5° 34' 56" W). The identification of the plant was carried out by Pr. Ennabili Abdessalam (PAMSN Laboratory, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Sidi Mohamed Ben Abdellah University of Fes, Morocco) (Voucher specimen: RAB02). The samples were air dried at room temperature in the shade. The extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation using Clevenger-type apparatus. The obtained oils were dried with anhydrous sodium sulphate, weighed and stored at 4°C until use.

2.2. GC-MS analysis of essential oils

The GC-MS analysis of essential oils (diluted in chloroform) was carried out as described by [Talbaoui et al. \(2016\)](#). It was performed on a TRACE GC ULTRA equipped with non-polar VB5 (5 % phenyl, 95 % Methylpolysiloxane), Capillary Column (30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm), directly coupled to a mass spectrometer (Polaris Q) (EI 70 eV). The temperature of the injector and the detector was set at 250 and 300 °C, respectively. The oven temperature was programmed at 4 °C/min for temperatures from 40 to 180 °C, and at 20 °C/min for those for 180–300 °C. Helium was used as gas carrier with a flow rate of 1mL/min; the sample (0.5 µL) was injected in splitless mode. Individual essential oil components were identified by comparing their relative retention times with those of authentic samples or by comparison of the relative retention indices (RRI) of the GC peaks to those of a homologous series of n-alkanes (series of C-9 to C-24 n-alkanes) reported in the literature. Each compound was confirmed by comparison of its mass spectra with those of NIST02 library data of the GC/MS system and Adams libraries spectra (NIST/EPA/NIH, 2002; Adams, 2007) ([Adams, 2007](#)). For the percentage of individual components, we have established abundances by normalizing the GC peak areas of each compound without any correction factors.

2.3. Antibacterial activity

2.3.1. Bacteria strains and growth conditions

To evaluate the antibacterial activity of *L. stoechas* essential oil, we have used the following bacteria: *Escherichia coli* K12 and *Staphylococcus aureus* MBLA (Laboratory of Food Microbiology, UCL, Belgium: MBLA), *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Staphylococcus aureus* CECT 994, *Listeria monocytogenes* serovar 4b CECT 4032 and *Proteus mirabilis* (Spanish Type Culture Collection: CECT), *Pseudomonas aeruginosa* IH (Institute of hygiene, Rabat, Morocco: IH) and *Bacillus subtilis* 6633 (German Collection of Microorganisms: DSM). Strains were maintained on an inclined agar medium LB (Lysogeny Broth 0.8% of agar) at 4°C. Before use, the bacteria were revived by two subcultures in an appropriate culture medium: Lysogeny broth (LB) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) at 37°C for 18 to 24h. For the test, final inocula concentrations of 10⁶ CFU/mL bacteria were used according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA (NCCLS 1999).

2.3.2. Agar-well diffusion assay

The principle of this technique is to estimate the bacteriostatic activity of the essential oils by measuring the growth inhibition zone of bacteria around wells. It is mostly used in a preliminary step to further study because it essentially provides access to qualitative results. Briefly, a basal layer was prepared by Muller-Hinton agar. After the agar plates were solidified, sterile 8 mm diameter cylinders were deposited. Six ml of LB medium in superfusion containing 0.8% agar were inoculated into a fresh culture of indicator bacterial strain (the final concentration was 10⁶ CFU/mL). After solidification, the wells were filled with 50 µL of essential oil. After incubation at appropriate temperature (37°C) for 24 h, all plates were examined for any zone of growth inhibition, and the diameter of these zones was measured in millimeters ([Bouhdid et al., 2008](#)). All the tests were performed in triplicate.

2.3.3. Minimal inhibitory concentration (MIC)

MICs were determined using the broth micro-dilution assay as described ([Bouhdid et al., 2009](#)). Agar at 0.15% (w/v) was used as a stabilizer of the extract-water mixture and resazurin as a bacterial growth indicator. 50 µL of Bacteriological Agar (0.15% w/v) were distributed from the 2nd to the 8th well of a 96-well polypropylene microtitre plate. A dilution of the essential oil was prepared in Mueller Hinton Broth supplemented with bacteriological agar (0.15% w/v), to reach a final concentration of 2%; 100 µL of these suspensions were added to the first test well of each microtitre line, and then 50 µL of scalar dilution were transferred from the 2nd to the 8th well. The 8th well was considered as a growth control, because no essential oil was added. Then, 50 µL of a bacterial suspension were added to each well at a final concentration of approximately 10⁶ CFU/mL. The final concentration of the essential oil was between 2 and 0.03% (v/v). Plates were incubated at 37°C for 18 h. After incubation, 10µL of resazurin were added to each well to assess bacterial growth. After further incubation at 37°C for 2 h, the MIC was determined as the lowest essential oil concentration that prevented a change in resazurin colour. Bacterial growth was detected by reduction in blue dye resazurin to pink resorufin. A control was carried out to ensure that, at the concentrations tested, the essential oil did not cause a colour change in the resazurin ([Bouyahya et al., 2017f](#)). Experiments were performed in triplicate.

2.3.4. Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponded to the lowest concentration of the essential oil yielding negative subcultures after incubation at appropriate temperature (37°C) for 24 h. It is determined in broth dilution tests by sub-culturing 10 µL from negative wells on plate count agar (PCA) medium. All the tests were performed in triplicate (Bouhdid et al., 2008).

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH free radical-scavenging assay

The stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was used for the determination of free radical-scavenging activity of essential oils (Almaoui Jamali et al., 2013). Aliquots (0.2 mL) of various concentrations of the essential oils samples dissolved in methanol were added to 1.8 mL of a 0.004% methanolic solution of DPPH. After a 30 minute incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm by using a UV spectrophotometer (Bouyahya et al., 2017g). The percentage (%) to scavenge DPPH radical was calculated using the following formula: DPPH scavenging activity (AA in %) = $[(A_c - A_t)/A_c] \times 100$. Where, A_c is the absorbance of the control (without oil) and A_t is the absorbance of the test (with oil). Trolox and ascorbic acid were used as positive control and essential oils concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was calculated by plotting the inhibition percentages against the concentrations of the sample (Almaoui Jamali et al., 2013). The test was carried out in triplicate and the IC_{50} values were reported as means $\pm$ SD.

2.4.2. Reducing ferric power determination

Reductive ability was investigated by the Fe³⁺ to Fe²⁺ transformations in the presence of the oils (Almaoui Jamali et al., 2013). The essential oils and control (ascorbic acid and Trolox) were mixed with phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide [K₃Fe (CN)₆] (2.5 mL, 1%). The mixture was then incubated at 50 °C for 20 min. A portion (2.5 mL) of trichloro acetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged for 10 min at 1100 g. Finally, the upper layer of solution (2.5 mL) was mixed with distilled water (2.5 mL) and FeCl₃ (0.5 mL, 0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer. The sample concentration providing 0.5 of absorbance (IC_{50}) was calculated by plotting absorbance at 700 nm against the corresponding sample concentration. Trolox and ascorbic acid were used as positive controls. The test was carried out in triplicate and IC_{50} values were reported as means $\pm$ SD.

2.5. Antileishmanial Activity

2.5.1. Culture of leishmania species

Leishmania species tested in this study are: *Leishmania infantum* (MHOM/MA/1998/LVTA), *Leishmania tropica* (MHOM/MA/2010/LCTIOK-4) and *Leishmania major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09). These three species were isolated and identified from Moroccan infected patients at the National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health of Rabat, Morocco. The species were cultivated as described by Et-Touys et al. (2016). Briefly, parasite cultures of each *Leishmania* species were washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 280 g for 10 minutes. Cells were then re-suspended in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of Penicillin-Streptomycin mixture. Cultures were maintained at 23°C.

2.5.2. Antileishmanial activity

Before evaluating the antileishmanial activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density reached a threshold concentration of 10⁶ cells/mL, *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major* promastigotes were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 800 g for 10 minutes. To evaluate the anti-promastigote activity, 100 µL of parasite cultures were resuspended in a 96-well tissue culture plate, in fresh culture medium according to Et-Touys et al. (2016). Briefly, parasites were incubated at 2.5x10⁶ cells/well for 72h at 23°C in the presence of various concentrations of essential oil dissolved in 1% DMSO. DMSO was used at a final concentration never exceeding 1% which is not toxic to parasites (Oliveira et al., 2011; Essid et al., 2015). Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls and Glucantime® was used as positive control.

2.5.3. Cell viability assay

The viability of *Leishmania* species was evaluated using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay as described by Essid et al. (2015). Briefly, 10 µL of MTT (5 mg/mL) were added to each micro-well and incubated for 3 hours at 30°C. The reaction was stopped by the addition of 100 µL of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazan formed after tetrazolium dye reduction. After 30 minutes of incubation at room temperature, absorbance was measured at 560 nm using an ELISA plate reader. All assays were conducted in triplicate and compared to the negative control (parasites) and the reference drug (Glucantime). Cell viability was also evaluated by determination of the extract concentrations which inhibited half of the cell population (IC_{50}), obtained by plotting %age of inhibition against concentration of essential oil. Cytotoxicity percentage was calculated using the following formula (Et-Touys et al., 2016):

Cytotoxicity (%) = $100 \times (\text{Absorbance of untreated cells} - \text{Absorbance of treated cells}) / \text{Absorbance of untreated cells}$.

3. Results

3.1. Chemical composition

The chemical composition of *L. stoechas* essential oil was determined by GC-MS. The identified molecules are presented in [table 1](#). It appears that the chemical composition of *L. stoechas* essential oil is diverse and dominated by five major compounds: fenchone (31.81%), camphor (29.60%), terpineol (13.14%), menthone (8.96%) and eucalyptol (5.88%).

3.2. Antibacterial activity

The antibacterial activity of *L. stoechas* essential oil was evaluated using the wall diffusion assay and the MIC values were determined by micro-dilution assay. The results of the qualitative antibacterial activities are summarised in [figure 1](#). Gram-positive bacteria show more sensitivity toward essential oils than Gram-negative bacteria. The highest diameter of inhibition was found with ethanolic extract *L. monocytogenes* (23 ± 0.85 mm) and *S. aureus* MBLA (21 ± 0.25 mm). The MIC and MBC values of *L. stoechas* essential oil against tested bacteria are shown in [table 2](#). The lowest MIC value was 0.25 % (v/v) and the highest MIC value was $>2\%$ (v/v). *L. monocytogenes* was the most sensitive strain to *L. stoechas* essential oil (MIC=MBC=0.25% v/v), while *P. aeruginosa* was the most resistant strains to this oil (MIC=MBC $>2\%$ v/v). In all cases, the MIC values were equal to MBC values indicating the bactericidal action of the essential oil of *L. stoechas* at the MIC.

3.3. Antioxidant activity

The antioxidant activity of *L. stoechas* essential oil was estimated by two *in vitro* antioxidant methods: the ferric-reducing capacity assay and the DPPH free radical scavenging method. The concentrations that led to 50% inhibition or effectiveness (IC₅₀) are given in [table 3](#). The lowest IC₅₀ values reflect a better protective action. The antioxidant capacity (IC₅₀) of *L. stoechas* essential oil is 785.38 ± 9.04 and 107.53 ± 1.74 µg/mL for DPPH scavenging and ferric-reducing power assay respectively. The results of antioxidant activity of *L. stoechas* essential oil could be considered interesting compared to the ascorbic acid and Trolox as standards antioxidants (IC₅₀ values were 27.20 ± 0.17 and 43.72 ± 0.31 µg/mL for DPPH assay and 47.63 ± 0.58 and 85.45 ± 1.36 µg/mL for ferric-reducing capacity).

3.4. Antileishmanial activity

The antileishmanial activity of *L. stoechas* essential oil against *L. major*, *L. tropica* and *L. infantum* was evaluated using MTT assay. The results obtained are summarised in [table 4](#). They were expressed as the concentration of the essential oil of *L. stoechas* that reduce 50% of parasite cells. The *L. stoechas* essential oil was most active against *Leishmania* species than the positive control. *L. major* was the most sensitive strain (IC₅₀= 0.9 ± 0.45 µg/mL), followed by *L. infantum* (IC₅₀= 7 ± 0.54 µg/mL) and *L. tropica* (IC₅₀ >10 µg/mL), while the IC₅₀ value of Glucantime was >10 µg/mL for the three tested species.

4. Discussion

Because of the problem of resistance, microbial infections become a cause of several problems of public health. Bacterial strains and some *Leishmania* species have developed several mechanisms that allow them to counterbalance the antimicrobial agents. On the other hand, numerous studies have confirmed the direct or indirect implication of oxidative stress in the pathogenesis of several diseases such as diabetes, cancer and inflammation ([Grimsrud et al., 2008](#)). Furthermore, the searches of alternative bioactive molecules that possess antimicrobial and antioxidant effects are important and may participate as efficient alternative bioactive natural products. Medicinal and aromatic plants synthesizes a wide variety of secondary metabolites that possess several pharmacological properties including antibacterial, antioxidant and antileishmanial activities ([Bouyahya et al., 2016a](#); [Et-touys et al., 2016](#); [Talbaoui et al., 2016](#); [Bouyahya et al., 2017a](#); [Bouyahya et al., 2017b](#)). Essential oils are complex mixtures of volatile natural compounds of various organic structures. The word oil is attributed to its hydrophobic character and to its solubilizing properties in fats, whereas the essential word reflects the distinctive odor emitted by the producing plant ([Bouyahya et al., 2016a](#)). These compounds are synthesized by aromatic plants as secondary metabolites and possess several biological activities ([Bakkali et al., 2008](#)).

In this work, we studied the essential oil of *L. stoechas* as a novel source for antibacterial, antioxidant and antileishmanial activities. Firstly, the aerial part of *L. stoechas* has been collected from the North-West of Morocco based on ethnopharmacological study carried out by our laboratory ([Bouyahya et al., 2017c](#)). The essential oil showed a wide variety of chemical composition determined using the GC-MS analysis. It contains numerous terpenoid oxygenated and not oxygenated compounds such as terpineol, fenchone, camphor and menthone.

The obtained results are in consonance with others carried out on *L. stoechas* collected from other areas worldwide ([Hassiotis, 2010](#); [Zuzarte et al., 2013](#); [Cherrat et al., 2014](#); [Carrasco et al., 2015](#)). Indeed, they corroborate with studies that have revealed the richness of *L. stoechas* essential oil in fenchone and camphor as the main compounds ([Dadalioglu and Evrendilek, 2004](#); [Angioni et al., 2006](#)). However, other studies have found fenchone, camphor and eucalyptol as major compounds ([Carrasco et al., 2015](#)). [Hassiotis \(2010\)](#) who has analyzed the essential oil of *L. stoechas* collected from Greece found fenchone, camphor, p-Cymene and 1,8-Cineole as the main compounds. On the other hand, [Cherrat et al. \(2014\)](#) found that the main compounds of *L. stoechas* essential oils are Cubenol, 10s,11s-Himachala-3(12),4-diene, methyl eugenol and δ -Cadinene. The fluctuations observed in *L. stoechas* essential oil between our study and other ones are certainly due to the difference in the region of collection. This may be explained by the influence of the external environment on the regulation of secondary metabolism pathways in plants ([Crisp et al., 2016](#)). Indeed, the chemical composition of aromatic plants varies with phenological changes, collection regions,

collected parts and methods of extraction (Bakkali et al., 2008; Aboukhalid et al., 2016). Moreover, the synthesis of the chemical composition is regulated by plants in space and time via various epigenetic factors, such as DNA methylation, histones modifications and remodelage of chromatin in order to respond against specific physiological functions (Vriet et al., 2015; Avramova, 2015).

The antibacterial activity of the essential oil of *L. stoechas* was tested against eight bacterial strains. The oil has shown a more significant growth inhibition than the Erythromycin against *P. aeruginosa* and *B. subtilis* ($p < 0.05$). In addition, not a significant difference ($p > 0.05$) in the growth inhibition has been noted between *L. stoechas* essential oil and two commercialized antibiotics (Erythromycin and Chlorophenicol) against *S. aureus* MBLA and *L. monocytogenes*. However, the MIC and MBC values of *L. stoechas* essential oil against tested bacteria do not have the same effects found in the inhibition growth.

The antibacterial activity of essential oil may be due to the major compounds present in the essential oil, the synergistic effects between these components and the additive effects of the minor compounds which can reinforce the antibacterial action (Bouhdid et al., 2008). On the other hand, we note that the Gram-negative bacteria are more resistant against *L. stoechas* essential oil than the Gram-positive bacteria. These findings have been shown by numerous studies (Ozcelik et al., 2003; Kaplan et al., 2007). The resistance of Gram-negative bacteria is due to the outer membrane surrounding the cell wall which restricts the diffusion of hydrophobic compounds through the lipopolysaccharide. In addition, the periplasmic space contains enzymes, which are able to break down foreign molecules introduced from outside (Bondet et al., 1997). The results of the antibacterial activity of *L. stoechas* essential oil are corroborated by those found in the literature (Dadalioglu and Evrendilek, 2004; Cherrat et al., 2014). Indeed, Cherrat et al. (2014) showed bactericidal effects against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*.

Our results are not exactly similar to these studies because of the difference in the chemical components, the experimental methods used and the strains tested. The antibacterial mechanism of *L. stoechas* essential oil remains unresolved. However, the essential oil of *Origanum compactum* (endemic Moroccan medicinal plant belonging to Lamiaceae family) has demonstrated the capacity to cross the cell membrane thus inducing the leakage of potassium, the disturbance in the electron respiratory chain and the slight modifications in cellular morphology (Bouhdid et al., 2009; Bouyahya et al., 2017h). Other antibacterial mechanisms of essential oil have been investigated as related to the capacity of essential oil components to deregulate the quorum sensing signaling pathways thus leading to decrease the bacterial resistance (Luís et al., 2016; Myszkka et al., 2016; Bouyahya et al., 2017i).

Furthermore, several studies have revealed that essential oils from medicinal plants possess antioxidant and thus prevent lipid peroxidation (Keshvari et al., 2013). The antioxidant activity of *L. stoechas* essential oil evaluated using DPPH scavenging activity and reducing ferric assay showed a significant antiradical effect. This activity is certainly related to the chemical compound of this oil which is rich in phenolic compound such as fenchone and camphor. Indeed, several studies have demonstrated the antioxidant effects of essential oils rich in such compounds. On the other hand, the capacity of the essential oil obtained from the aerial part of *L. stoechas* to scavenge the DPPH free radical is in agreement with what has been reported by other studies (Matos et al., 2009; Carrasco et al., 2015; Cherrat et al., 2014). Carrasco et al. (2015) found interesting antioxidant activity, while Cherrat et al. (2014) showed a moderate antioxidant effect of *L. stoechas* essential oil. The phenolic compounds of *L. stoechas* essential oils could be responsible for the antioxidant effects. However, the synergetic effects of various essential components could also contribute to the antioxidant activity. The fluctuations in the antioxidant capacities may be due to the difference in composition and the method used.

Leishmania species are responsible of high mortality and morbidity worldwide. *L. major*, *L. tropica* and *L. infantum* are the most causative leishmaniasis etiological agents found in Morocco. Because of the resistance developed by parasites; the screening of natural products which possess antileishmanial properties is necessary. Aromatic and medicinal plants could constitute a veritable candidate for identifying natural drugs which possess antileishmanial activities (Et-Touys et al., 2016; Essid et al., 2015). Actually, essential oils and their compounds are considered as potential antileishmanial drugs (Bakkali et al., 2008). The evaluation of antileishmanial activity of *L. stoechas* essential oil revealed that this oil exhibited a stronger effect than Glucantime. *L. major* promastigotes appear to be more sensitive than *L. infantum* and *L. tropica* toward tested oil. There are not data regarding the antileishmanial activity of *L. stoechas* essential oil. However, some studies have shown that essential oils extracted from medicinal plants belonging to the Lamiaceae family such as *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus hirtus* have the antileishmanial effects (Essid et al., 2015).

The sensitivity of each parasitic strain depends on its ability to tolerate the action of essential oil compounds. So far, no studies have been carried out on the antileishmanial activity of the *L. stoechas* essential oil. Furthermore, some studies on essential oils of other medicinal plants belonging to the Lamiaceae family have shown the efficacy of these oils to inhibit the growth of *Leishmania* species at low concentrations (Essid et al., 2015). The antileishmanial activity is probably attributed to the main compounds of *L. stoechas* essential oil. Indeed, camphor has shown interesting antileishmanial activity against *L. major* ($5.55 \pm 1.27 \mu\text{g/mL}$) and *L. infantum* ($7.90 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$) and also showed good security against human macrophage cell lines (Essid et al., 2015). On the other hand, essential oils and their main compounds have several targets of action against *Leishmania* species. These targets include the morphological destruction, the induction of apoptosis, the disruption of the electron transport chain and the inhibition of DNA topoisomerase (Castro et al., 1992).

5. Conclusion

The essential oil of *L. stoechas* contains several major compounds. The findings of this study revealed the potential antibacterial, antileishmanial and antioxidant of *L. stoechas* essential oils. The essential oil of *L. stoechas* has exhibited an important antioxidant activity which indicates their phenolic compounds as potential source of antioxidant compounds. Furthermore, this oil showed a great capacity to inhibit the growth of bacteria and *Leishmania* species. However, future studies should be conducted to offer new comprehensive investigations on the elucidation, characterization and identification of molecules responsible for these biological effects.

Author disclosure statement

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Acknowledgement

The authors thank the National Center for Scientific and Technical Research (NCSTR) from Morocco for support funding (Grant No. 376UM5) of the doctoral grant of Abdelhakim Bouyahya.

References

- Aboukhalid, K., Lamiri, A., Agacka-Mołodoch, M., Doroszewska, T., Douaik, A., Bakha, M., Casanova, J., Tomi, F., Machon, N., Al Faiz, C., 2016. [Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco. Chem. Biodivers. 13, 1126-1139.](#)
- Adams, R.P., 2007. [Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co., CarolStream, IL, USA.](#)
- Almoui Jamali, C., Kasrati, A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A., 2013. [Phenological changes to the chemical composition and biological activity of the essential oil from Moroccan endemic thyme \(*Thymus maroccanus* Ball\). Indus. Crop. Prod. 49, 366-372.](#)
- Aneb, M., Talbaoui, A., Bouyahya, A., EL Boury, H., Amzazi, S., Benjouad, A., Dakka, N., Bakri, Y., 2016. [In vitro cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. Europ. J. Med. Plant. 16, 1-13.](#)
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, A., Dessi, S., Cabras, P., 2006. [Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. J. Agric. Food. Chem. 54, 4364-4370.](#)
- Avramova, Z., 2015. [Transcriptional memory of a stress: transient chromatin and memory \(epigenetic\) marks at stress-response genes. Plant J. 83, 149-159.](#)
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. [Biological effects of essential oils-a review. Food. Chem. Toxicol. 46, 446-475.](#)
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. [Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. LWT-Food. Sci. Technol. 30, 609-615.](#)
- Bouhdid, S., Abrini, J., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A., 2009. [Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. J. Appl. Microbiol. 106, 1558-1568.](#)
- Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, J., Baudoux, A., Abrini, J., 2008. [Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. Afr. J. Biotech. 7, 1563-1570.](#)
- Bouyahya A., Dakka N., Et-Touys A., Abrini J., Bakri, Y., 2017i. [Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. Asian. Pac. J. Trop. Med. 10, 729-743.](#)
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N., 2017a. [Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. Phytothérapie. In Press, DOI 10.1007/s10298-017-1118-z.](#)
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016a. [Essential oils as anticancer agents news on mechanisms of action. Phytothérapie. In Press, DOI: 10.1007/s10298-016-1058-z.](#)
- Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2017c. [Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. Europ. J. Integ. Med. 13, 9-25.](#)
- Bouyahya, A., Abrini, J., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Chatoui, K., Harhar, H., Bakri, Y., Dakka, N., 2017b. [Phytochemical Screening, Antiradical and Antibacterial Activities of *Cistus crispus* from Morocco. J. Mater. Environ. Sci. 8, 1560-1566.](#)
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Belmehdi, O., Et-Touys A., Abrini, J., Dakka N., 2017e. [Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. Asia. Pac. J. Trop. Dis. 7, 433-439.](#)
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Khay, E.O., Edaoudi, F., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Dakka, N., 2017d. [Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: A review. Asian Pac. J. Trop. Dis. 7, 57-64.](#)
- Bouyahya, A., Dakka, N., Talbaoui, A., Et-Touys, A., El-Boury, H., Abrini, J., Bakri, Y., 2017f. [Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic *Oregano \(Origanum compactum* Benth\). Indus. Crop. Prod. 108, 729-737.](#)
- Bouyahya, A., El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016b. [Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree \(*Arbutus unedo* L.\) Leaf Extracts. Brit. Biotech. J. 14, 1-10.](#)
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Talbaoui, A., Fellah, H., Abrini, J., Dakka, N., 2017g. [Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microb. Pathog. 111, 41-49.](#)

- Bouyahya, A., Guaouguaou, FE., Dakka, N., Bakri Y., 2017h. Pharmacological activities and medicinal properties of endemic Moroccan medicinal plant *Origanum compactum* (Benth) and their main compounds. *Asian. Pac. J. Trop. Dis.* 7, 628-640.
- Carrasco, A., Ortiz-Ruiza, A., Martinez-Gutierrezb, R., Tomasc, V., Tudela, J., 2015. *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography-mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Indus. Crop. Prod.* 73, 16-27.
- Castro, C., Jimenez, M., Gonzalez-De-Parra, M., 1992. Inhibitory effect of piquerol A on the growth of epimastigotes of *Trypanosomacruzi*. *Planta. Med.* 58, 281.
- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagan, R., Laglaoui, A., 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.* 22, 221-229.
- Crisp, AP., Ganguly, D., Eichten, SR., Borevitz, O., Pogson, BJ., 2016. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sciences advances.* 2, doi: [10.1126/sciadv.1501340](https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340).
- Dadalioglu, I., Evrendilek, GA., 2004. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 8255-8260.
- El Hachimi, F., Alfaiz, C., Bendris, A., Cherrah, Alaoui, K., 2017. Activité anti-inflammatoire de l'huile des graines de *Zizyphus lotus* (L.) Desf. *Phytothérapie*. In press, DOI: [10.1007/s10298-016-1056-1](https://doi.org/10.1007/s10298-016-1056-1).
- Ennabili, A., Gharnit, N., El Hamdouni, EL., 2000. Inventory and social interest of medicinal, aromatic and Honey-plants from Mokrisset region (NW of Morocco). *Stud. Bot.* 19, 57-74.
- Essid, R., Rahali, FZ., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F., 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Indus. Crop. Prod.* 77, 795-802.
- Et-Touys, A., Fellah, H., Mniouil, M., Bouyahya, A., Dakka, N., Abdennebi, EH., Sadak, A., Bakri, Y., 2016a. Screening of antioxidant, antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Brit. Micro. Res J.* 16, 1-10.
- Grimsrud, PA., Xie, H., Griffin, T.J., Bernlohr, DA., 2008. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J. Biol. Chem.* 283, 21837-2141.
- Hassiotis, CN., 2010. Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. *Bioch. System. Ecol.* 38, 493-501.
- Kaplan, M., Mutlu, EA., Benson, M., Fields, JZ., Banan, A., Keshavarzian, A., 2007. Use of herbal preparations in the treatment of oxidant mediated inflammatory disorders. *Ther. Med.* 15, 207-216.
- Keshvari, M., Asgary, S., Jafarian-dehkordi, A., Najafi, S., Ghoreyshi-Yazdi, SM., 2013. Preventive effect of cinnamon essential oil on lipid oxidation of vegetable oil. *ARYA Atheroscler.* 9, 280-286.
- Khay, EO., Bouyahya, A., El Issaoui, K., Zinebi, S., Abrini, J., 2016. Study of Synergy between *Mentha pulegium* Essential Oil, Honey and Bacteriocin-like Inhibitory Substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant. Biol.* 3, 29-35
- Khouchlaa, A., Talbaoui, A., El Yahyaoui El Idrisi, A., Bouyahya, A., Ait Lahsen, K., Kahouadji, A., Tijane, M., 2017. Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité litholytique *in vitro* sur la lithiase urinaire d'extrait de *Zizyphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie*. In press, DOI: [10.1007/s10298-017-1106-3](https://doi.org/10.1007/s10298-017-1106-3).
- Luís, A., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, AP., 2016. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Indus. Crop. Prod.* 79: 274-282.
- Matos, F., Miguel, M.G., Duarte, J., Venancio, F., Moiteiro, C., Correia, A.I.D., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2009. Antioxidant capacity of the essential oils from *Lavandula luisieri* L. *stoechas* subsp *lusitanica*, *L. stoechas* subsp *lusitanica* x *L. luisieri* and *L. viridis* grown in Algarve (Portugal). *J. Essent. Oil. Res.* 21, 327-336.
- Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero Mesa, J., 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district NW Morocco. *Fitoterapia.* 71, 278-307.
- Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero-Mesa, J., 2003. Contribution to the Knowledge of Rifian traditional medicine III: Phytotherapy of Diabetes in Chefchaouen province (North of Morocco). *Ars. Pharmaceutica.* 44, 59-67.
- Myszka, K., Schmidt, MT., Majcher, M., Juzwa, W., Olkiewicz, M., Czaczyk, K., 2016. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *Inte. Biod. Biodeg.* 114: 252-259.
- Oliveira, LFO., Schubach, AO., Martins, MM., Passos, SL., Oliveira, RO., Marzochi, MC., Andrade, CA., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta. Trop.* 118, 87-96.
- Ozcelik B, Lee J.H, Min D.B., 2003. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *J. Food. Sci.* 68, 487-490.
- Talbaoui, A., El Hamdaoui, L., El Moussaouiti, M., Aneb, M., Amzazi, S., Bakri, Y., 2016. GC-MS analysis and antibacterial activity of hydro-distillation oil from *Tetralinis articulata* wood grown in Khemisset (Morocco). *J. Indian. Acad. Wood. Sci.* In press. DOI [10.1007/s13196-016-0173-7](https://doi.org/10.1007/s13196-016-0173-7).
- Vriet, C., Hennig, L., Laloi, C., 2015. Stress-induced chromatin changes in plants of memories, metabolites and crop improvement. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1261-1273.
- Zuzarte, M., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., Salgueiro, L., 2013. Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Indus. Crop. Prod.* 44, 97-103.

Table 1: Chemical composition of essential oil of *L. stoechas*

RT	Compound	%	Identification
11.559	1,8-cineole	1.33	MS, I _R
14.04	Fenchone	31.81	MS, I _R
15.681	Lanool	1.44	MS, I _R
16.612	Borneol	0.88	MS, I _R
16.922	ni	0.55	MS, I _R
19.384	Camphor	29.60	MS, I _R
25.034	Caryophyllene	1.51	MS, I _R
47.612	Eucalyptol	5.88	MS, I _R
51.098	Terpineol	13.1	MS, I _R
51.218	Menthone	8.96	MS, I _R
51.301	Menthol	2.68	MS, I _R
51.428	ni	0.71	MS, I _R
51.745	2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde	1.33	MS, I _R
RT = retention time on the DB-5 column. Compounds in less than 0.1% are not reported.			
ni: not identified			

Table 2: The MIC and MBC values (% (v/v)) of *L. stoechas* essential oil against 8 human pathogen bacteria strains tested in microdilution assay.

Essential oils	Microorganisms	MIC=MBC (% (v/v))	Effect
<i>Lavandula stoechas</i>	<i>S. aureus</i> MBLA	0.5	Bactericidal
	<i>S. aureus</i> 976	2	Bactericidal
	<i>S. aureus</i> 994	1	Bactericidal
	<i>P. aeruginosa</i>	>2	nd
	<i>L. monocytogenes</i>	0.25	Bactericidal
	<i>B. subtilis</i> 6633	2	Bactericidal
	<i>P. mirabilis</i>	1	Bactericidal
	<i>E. coli</i> K12	0.5	Bactericidal

MIC: Minimum inhibitory concentration.

MBC: Minimum bactericidal concentration.

Final bacterial density was around 10⁶ CFU/mL**Table 3:** IC₅₀ values (µg/mL) of *L. stoechas* essential oils. Values represent means (standard deviations) for triplicate experiments.

Assays	Essential oil	Ascorbic acid	Trolox
DPPH	785.38± 9.04	27.20±0.17	43.72±0.31
Reducing power	107.53±1.74	47.63±0.58	85.45±1.36

Table 4: IC₅₀ values (µg/mL) for the antileishmanial activity of *L. stoechas* essential oil and positive control (Glucantime) against *L. major*, *L. infantum*, *L. tropica*.

Leishmania species	Essential oil	Glucantime
<i>L. major</i>	0.9±0.45	>10
<i>L. infantum</i>	7±0.54	>10
<i>L. tropica</i>	>10	>10

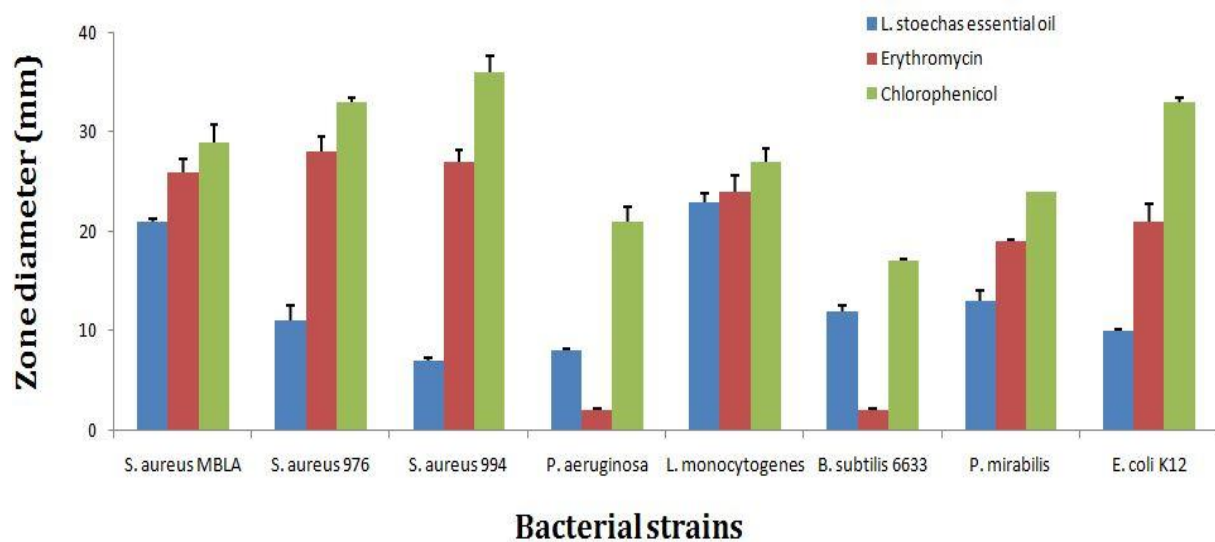
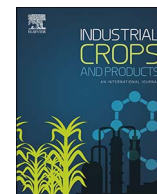


Figure 1: Antibacterial activity of *L. stoechas* essential oil and commercial antibiotic (Erythromycin and Chlorophenicol) against eight bacterial strains. Final bacterial density was around 10^6 CFU/mL and the values of diameter inhibition are means $\pm$ standard deviation of three separate experiments.



Research Paper

Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth)



Abdelhakim Bouyahya^{a,b,*}, Nadia Dakka^a, Ahmed Talbaoui^a, Abdeslam Et-Touys^{a,c}, Houria El-Boury^a, Jamal Abrini^b, Youssef Bakri^a

^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, and Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University of Rabat, Morocco

^b Biology and health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

^c National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health, Rabat, Morocco

ARTICLE INFO

Keywords:

Origanum compactum

Essential oil

Phenological stages

Antioxidant activity

Antibacterial activity

Antileishmanial activity

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the chemical composition, antibacterial, antioxidant and antileishmanial activities of essential oils extracted by hydrodistillation from the aerial parts of wild endemic Moroccan *Origanum compactum* at three phenological stages (vegetative, flowering and post-flowering). GC/MS analyses of the essential oils have revealed the presence of 37 components represented mainly by oxygenated monoterpenes (49.4–62.975%) and hydrocarbons monoterpenes (31.815–43.632%). Carvacrol, thymol, *p*-cymene and γ -terpinene were the major components of essential oils at three phenological stages. The antioxidant activity was estimated by DPPH free radical scavenging ability and reducing power. Essential oils obtained from post-flowering stage showed the highest antioxidant capacity with IC₅₀ values of $172.87 \pm 5.38 \mu\text{g/mL}$ and $IC_{50} = 53.28 \pm 2.64 \mu\text{g/mL}$ revealed by the DPPH and reducing power assay respectively. The antibacterial activity was tested against pathogenic strains using the diffusion method, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) by microtitration assay. The essential oil of vegetative and flowering stage showed remarkable antibacterial activities against *Proteus mirabilis* with an inhibition diameter of 43 ± 2.12 and 47 ± 2.73 mm respectively. Moreover, the best bactericidal action was revealed by the essential oil of flowering stage against *S. aureus* MBLA (MIC = MBC = 0.0312% (v/v)). The antiparasitic activity was tested against *Leishmania major*, *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. All essential oils showed remarkable cytotoxic activities against tested *Leishmania* species compared with Glucantime. The essential oil extracted at the flowering stage revealed the best antileishmanial activity. The leishmanicidal effect displayed against *L. infantum* was recorded at the low concentration with $IC_{50} = 0.02 \pm 0.004 \mu\text{g/mL}$. The findings highlighted in this study show that flowering stage is the best optimal harvesting times of *Origanum compactum* for food and pharmaceutical applications.

1. Introduction

Medicinal plants are a source of wide secondary metabolites such as essential oils (EOs), phenolic compounds and flavonoids which exhibit different biological activities (Chishti et al., 2013; Aneb et al., 2016; Ouedrhiri et al., 2016; Khouchlaa et al., 2017a, 2017b). Several genera which contain numerous medicinal plants are included in the Lamiaceae family. *Origanum* is one of these genera represented by 38 species; with 6 subspecies and 18 hybrids (Duman et al., 1998; Ietswaart, 1980).

Origanum species are worldwide used in traditional medicine for the treatment of several diseases such as diabetes and diarrhea (Ennabili et al., 2000; Eddouks et al., 2002; El-Hamsas El-Youbi et al., 2016). *In vitro* studies reported a wide range of pharmacological properties of this genus. They include antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, antifungal, antiviral, antileishmanial, etc (Bouyahya et al., 2016a; Ouedrhiri et al., 2016; Bouyahya et al., 2017a, 2017b). Several studies have reported that *Origanum* EOs contain numerous terpenoids and phenolic compounds such as carvacrol, thymol, γ -terpinene and *p*-

* Corresponding author at. Postal address : Bouyahya Abdelhakim, Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av. Ibn battouta BP1014 Rabat-Morocco.

E-mail address: boyahyaa-90@hotmail.fr (A. Bouyahya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.07.033>

Received 8 May 2017; Received in revised form 17 July 2017; Accepted 24 July 2017
0926-6690/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Fig. 1. *Origanum compactum* (Benth.) collected from studied area at three Phenological stages. a: Vegetative stage, b: Flowering stage and c: Post-flowering stage.

cymene (Bouhdid et al., 2008; Aboukhlid et al., 2016). These compounds have been shown several *in vitro* and *in vivo* biological properties such as anticancer, antimicrobial and antioxidant activities (Bagamboula et al., 2004; Oyedemi et al., 2009; Bouyahya et al., 2016b).

Origanum compactum Benth. (*O. compactum*) is one of the Moroccan endemic *Origanum* species. The aerial parts of this plant have been used for a long time against lung and gastrointestinal infections (Ennabili et al., 2000). It is used in decoction or infusion as spasmolytic and sedative (Merzouki et al., 2000; Lahsissene and Kahouadji, 2010). Leaves stem are used in infusion and decoction against digestive illnesses, cardiac diseases and diabetes (Ziyyat et al., 1997; Jouad et al., 2001; Eddouks et al., 2002; El Hilaly et al., 2003; Fakchich and Elachouri, 2014), inflammation (El Hamsas El Youbi et al., 2016), hypertension (Ziyyat et al., 1997; Jouad et al., 2001), apyelonphritis and cystitis (Ghourri et al., 2013), stomachic, febrifuge, against cooling and respiratory diseases (Benlamdini et al., 2014).

Origanum compactum essential oils (OCEO) possess a wide range of biological and pharmacological properties such as antibacterial (Bouhdid et al., 2009; Bouhdid et al., 2008), antioxidant (Bouhdid et al., 2008), cytotoxic (El Babili et al., 2011), antimutagenic (Mezzoug et al., 2007), antifungal (Fadel et al., 2013), antimalaria (El Babili et al., 2011), insecticidal (Pavela, 2005) and cercaricidal activities (Lahlou, 2002). These properties are mediated by the presence in OCEO of terpenic and phenolic compounds such as α -terpinene, *p*-cymene, γ -terpinene, linalool, α -terpineol, carvacryl methyl oxide, thymol, carvacrol, and caryophyllene (El Babili et al., 2011; Aboukhalid et al., 2016). The high content of thymol, carvacrol, γ -terpinene and *p*-cymene is almost correlated to biological activity. Indeed, these molecules have showed interesting *in vitro* and *in vivo* pharmacological effects (Li and Liu, 2009; Chauhan and Kang, 2014; Du et al., 2015; Andrade-Ochoa et al., 2015).

In North-West of Morocco (Province Ouezzane), people use traditional medicine to fight against several complications. However, a few studies on the pharmacological properties of the used species have been conducted in our laboratory (Bouyahya et al., 2016c, 2016d, 2016e; Khay et al., 2016; Et-Touys et al., 2016a; Bouyahya et al., 2017c, 2017d; Bouyahya et al., 2017e; Bouyahya et al., 2017f). *O. compactum* exists naturally in the Ouezzane province and constitutes an important medicinal plant for the local population (Laghmouchi et al., 2017). For the ethnopharmacological applications, the local inhabitants harvest the aerial part of this plant during phenological stages (vegetative, flowering and post-flowering). However, ethnopharmacological surveys indicated that they appreciate more the preparation of drugs from this plant when it is collected at a specific stage (some people prefer the plant at flowering and some other prefer it at post-flowering). This distinction between uses is certainly due to the difference in chemical composition of *O. compactum* at three phenological stages which lead to differentiated effects according to targeting illnesses. Indeed, it is very known that chemical composition of secondary metabolites from medicinal and aromatic plants, and consequently their biological

activities, is influenced by plant growth stages (Ebrahimi et al., 2008; Hamrouni et al., 2009; Almaoui Jamali et al., 2013). To the best of our knowledge, not data are available about the effect of phenological stages on the chemical composition of the OCEO and the consequent effect on its pharmacological properties. However, these characteristics are very important for the culture and the standardization of OCEO.

The aims of this study were to investigate firstly the variation of the chemical compounds of the OCEO at three phenological stages (vegetative VS, flowering FS and post-flowering PFS) the most favorable harvest time characterized by the highest content of bioactive compounds in order to determine the most favorable harvest stage characterized by the highest content of bioactive compounds. We have also evaluated the antibacterial, antioxidant and antileishmanial activities of these oils in order to correlate between pharmacological activities and OCEO compounds.

2. Material and methods

2.1. Plant material and essential oils extraction

The aerial parts of *O. compactum* used in this work were collected from its wild habitat in three phenological stages (Fig. 1): vegetative (April–May, 2015), flowering (June–July, 2015) and post-flowering (August, 2015) in Ouezzane province (North-west of Morocco: 34° 47' 50" N and 5° 34' 56" W). The identification of plant was carried out by Pr. Ennabili Abdessalam (PAMSN Laboratory, National Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fes, Morocco). The samples were air dried at room temperature in the shade. The extraction of essential oils was carried out by hydro-distillation method using Clevenger-type apparatus. The obtained oils were dried by anhydrous sodium sulphate, weighed and stored at 4°C until use.

2.2. GC–MS analysis of essential oils

The GC–MS analysis of EOs was carried out as described by Talbaoui et al. (2016). It was performed on a TRACE GC ULTRA equipped with non-polar VB5 (5% phenyl, 95% Methylpolysiloxane), Capillary Column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μ m), directly coupled to a mass spectrometer (Polaris Q) (EI 70 eV). The temperature of injector and detector was set at 250 and 300 °C, respectively. The oven temperature was programmed from 40 to 180 °C at 4 °C/min, for 180–300 °C at 20 °C/min. Helium was used as gas carrier with a flow rate of 1 mL/min; the sample (0.5 μ L) was injected splitless mode. Individual EOs components were identified by comparing their relative retention times with those of authentic samples or by comparison of the relative retention indices (RRI) of the GC peaks to those of a homologous series of *n*-alkanes (series of C-9 to C-24 *n*-alkanes) reported in the literature. Each compound was confirmed by comparison of its mass spectra with those of NIST02 library data of the GC/MS system and

Table 1
Chemical composition of OCEO aerial parts at three phenological stages.

no.	R _i	R _T (min)	Compounds	Molecular formula	% of compounds at three phenological stages			Identification
					Vegetative (April-May)	Flowering (June-July)	Post-flowering (August)	
1	925	7.926	α-Thujene	C ₁₀ H ₁₆	1.357	0.879	0.655	MS, I _R
2	931	8.157	α-pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.881	0.684	0.598	MS, I _R
3	946	8.69	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	0.136	–	0.100	MS, I _R
4	974	9.627	β-pinene	C ₁₀ H ₁₆	0.260	0.158	0.142	MS, I _R
5	977	9.748	1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	0.665	0.702	1.40	MS, I _R
6	985	9.901	3-Octanone	C ₈ H ₁₆ O	0.664	0.695	1.395	MS, I _R
7	990	10.064	β-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	2.03	1.219	1.077	MS, I _R
8	996	10.341	Octanol	C ₈ H ₁₈ O	0.089	0.106	0.327	MS, I _R
9	1004	10.631	α-Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	0.204	–	0.050	MS, I _R
10	1009	10.725	(+)-3-carene	C ₁₀ H ₁₆	0.084	–	0.059	MS, I _R
11	1015	11.022	α-terpinene	C ₁₀ H ₁₆	2.203	0.617	0.514	MS, I _R
12	1023	11.345	P-Cymene	C ₁₀ H ₁₆	17.815	18.587	19.245	MS, I _R
13	1027	11.479	D-limonene	C ₁₀ H ₁₆	0.526	0.398	0.412	MS, I _R
14	1029	11.565	1,8-cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	1.260	0.342	0.136	MS, I _R
15	1037	12.099	β-cis-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	0.068	–	–	MS, I _R
16	1057	12.569	γ-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	17.415	8.717	7.114	MS, I _R
17	1069	12.95	β-trans-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.229	0.267	0.284	MS, I _R
18	1087	13.493	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	0.151	–	0.115	MS, I _R
19	1089	13.647	p-cymenene	C ₁₀ H ₁₂	0.061	–	0.081	MS, I _R
20	1100	14.05	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	1.753	1.941	1.969	MS, I _R
21	1124	16.302	Trans-2-menthenol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.083	0.156	0.148	MS, I _R
22	1141	16.429	Cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.036	0.157	0.191	MS, I _R
23	1146	16.622	Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	0.0258	0.193	0.342	MS, I _R
24	1164	16.732	Brneol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.099	–	–	MS, I _R
25	1176	16.936	Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.780	0.782	1.107	MS, I _R
26	1186	17.179	p-cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.082	–	0.245	MS, I _R
27	1195	17.483	α-terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	2.891	3.253	7.359	MS, I _R
28	1235	18.983	Thymol methyl ether	C ₁₁ H ₁₆ O	0.303	0.562	1.912	MS, I _R
29	1292	20.921	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	15.324	10.331	38.014	MS, I _R
30	1301	21.252	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	24.714	43.584	6.398	MS, I _R
31	1417	25.051	β-Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	1.901	0.607	0.438	MS, I _R
32	1452	26.165	α-Humulene	C ₁₅ H ₂₄	0.085	–	0.070	MS, I _R
33	1484	27.793	p-mentha-2,8-dien-1-hydroperoxide	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	0.189	0.145	0.083	MS, I _R
34	1514	28.106	β-cadinene	C ₁₅ H ₂₄	0.068	–	–	MS, I _R
35	1576	29.997	Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	1.073	2.295	2.821	MS, I _R
36	1976	46.465	Methyl lonolenate	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	1.152	–	–	MS, I _R
37	21324	46.731	Ethyl linolenate	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	1.04	–	–	MS, I _R
Total identified					96.696	97.996	94.802	
No identified					3.304	2.004	5.198	
Yield (% v/w)					5.7	4.3	2.9	

R_i: Retention index.

R_T: Retention time.

Bold values indicates the main representative compounds.

Adams libraries spectra (NIST/EPA/NIH, 2002) (Adams, 2007). For the percentage of individual components, we have established abundances by normalizing the GC peak areas of each compound without any correction factors.

2.3. Antibacterial activity

2.3.1. Bacteria strains and growth conditions

To evaluate the antibacterial activity of EOs, we have used the following bacteria: *Escherichia coli* K12 and *Staphylococcus aureus* MBLA (Laboratory of Food Microbiology, UCL, Belgium: MBLA), *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Staphylococcus aureus* CECT 994, *Listeria monocytogenes* serovar 4b CECT 4032 and *Proteus mirabilis* (Spanish Type Culture Collection: CECT), *Pseudomonas aeruginosa* IH (Institute of hygiene, Rabat, Morocco: IH) and *Bacillus subtilis* 6633 (German Collection of Microorganisms: DSM). Strains are maintained on an inclined agar medium at 4 °C. Before use, the bacteria were revived by two subcultures in an appropriate culture medium: Lysogeny broth (LB) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) at 37 °C for 18–24 h. For the test, final inoculums concentrations of 10⁶ CFU/mL bacteria were used according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA (NCCLS 1999).

2.3.2. Agar-well diffusion assay

The principle of this technique is to estimate the bacteriostatic activity of the EOs by measuring the growth inhibition zone of germs around wells. It is mostly used in a preliminary step to further study because it provides access to essentially qualitative results. Briefly, a basal layer was prepared by Muller-Hinton agar. After the agar plates were solidified, sterile 8 mm diameter cylinders were deposited. Six ml of LB medium in superfusion containing 0.8% agar were inoculated by a fresh culture of indicator bacterial strain (a final concentration was 10⁶ CFU/mL). After solidification, the wells were filled with 50 µL of OCEO. After incubation at appropriate temperature for 24 h, all plates were examined for any zone of growth inhibition, and the diameter of these zones was measured in millimeters (Bouhdid et al., 2008). All the tests were performed in triplicate.

2.3.3. Minimal inhibitory concentration (MIC)

MICs were determined using the broth micro-dilution assay as described (Bouhdid et al., 2009). Agar at 0.15% (w/v) was used as a stabilizer of the extract-water mixture and resazurin as a bacterial growth indicator. 50 µL of bacteriological agar (0.15% w/v) was distributed from the 2nd to the 8th well of a 96-well polypropylene microtitre plate. The dilutions of OCEO were prepared in Mueller Hinton Broth supplemented with bacteriological agar (0.15% w/v), to reach a

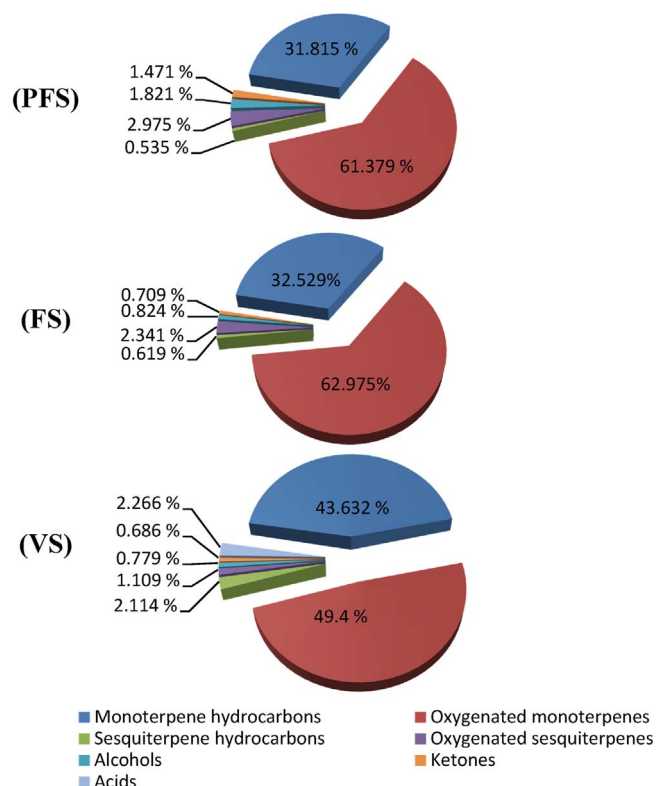


Fig. 2. Distribution of chemical group compounds of *O. compactum* essential oils at three phenological stages: Vegetative Stage (VS), Flowering stage (FS) and post-flowering stage (PFS).

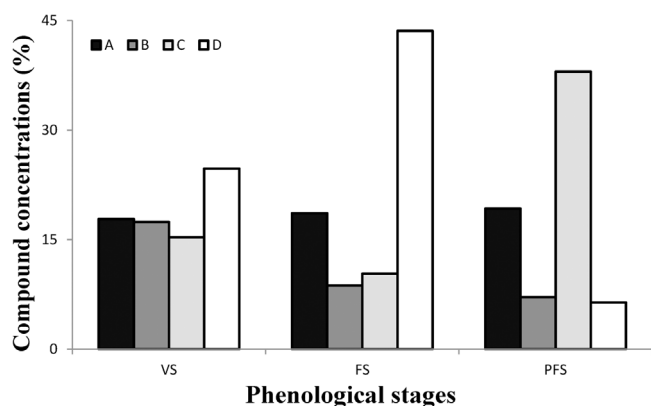


Fig. 3. Evolution of concentrations of main compounds (A: p-Cymene, B: γ-Terpinene, C: thymol and D: Carvacrol) of *O. compactum* essential oils at Vegetative Stage (VS), Flowering Stage (FS) and Post-Flowering Stage (PFS).

final concentration of 2%; 100 μL of these suspensions was added to the first test well of each microtitre line, and then 50 μL of scalar dilution was transferred from the 2nd to the 8th well. The 8th well was considered as growth control, because no essential oil was added. We then added 50 μL of a bacterial suspension to each well at a final concentration of approximately 10^6 CFU/mL. The final concentration of the EO was between 1 and 0.015% (v/v). Plates were incubated at 37 °C for 18 h. After incubation, 10 μL of resazurin was added to each well to assess bacterial growth. After further incubation at 37 °C for 2 h, the MIC was determined as the lowest EO concentration that prevented a change in resazurin color. Bacterial growth was detected by reduction in blue dye resazurin to pink resorufin. A control was carried out to ensure that, at the concentrations tested, the EO did not cause a color change in the resazurin (Bouyahya et al., 2017c). Experiments were performed in triplicate.

2.3.4. Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponded to the lowest concentration of the EO yielding negative subcultures after incubation at appropriate temperature for 24 h. It is determined in broth dilution tests by sub-culturing 10 μL from negative wells on plate count agar (PCA) medium. All the tests were performed in triplicate (Bouhdid et al., 2008).

2.4. Antioxidant activity

2.4.1. DPPH free radical-scavenging assay

The stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) was used for the determination of free radical-scavenging activity of OCEO (El Bouzidi et al., 2013). Aliquots (0.2 mL) of various concentrations of the EOs samples dissolved in methanol were added to 1.8 mL of a 0.004% methanolic solution of DPPH. After a 30 min incubation period at room temperature, the absorbance was read against a blank at 517 nm by using UV spectrophotometer (Bouyahya et al., 2017c). The percentage (%) to scavenge DPPH radical was calculated by the following formula: $\text{DPPH scavenging activity (AA in\%)} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$. A_c is the absorbance of the control (without oil) and A_t is the absorbance of the test (with oil). Trolox and ascorbic acid was used as positive control and EOs concentration providing 50% inhibition (IC_{50}) was calculated by plotting the inhibition percentages against the concentrations of the sample (El Bouzidi et al., 2013). The test was carried out in triplicate and the IC_{50} values were reported as means $\pm$ SD.

2.4.2. Reducing ferric power determination

Reductive ability was investigated by the Fe^{3+} to Fe^{2+} transformations in the presence of the oils (El Bouzidi et al., 2013). The OCEO at three phenological stages and control (ascorbic acid and Trolox) were mixed with phosphate buffer (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) and potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (2.5 mL, 1%). The mixture was then incubated at 50 °C for 20 min. A portion (2.5 mL) of trichloro acetic acid (10%) was added to the mixture, which was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm. Finally, the upper layer of solution (2.5 mL) was mixed with distilled water (2.5 mL) and $FeCl_3$ (0.5 mL, 0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm in a spectrophotometer. The sample concentration providing 0.5 of absorbance (IC_{50}) was calculated by plotting absorbance at 700 nm against the corresponding sample concentration. Trolox and ascorbic acid were used as positive controls. The test was carried out in triplicate and IC_{50} values were reported as means $\pm$ SD.

2.5. Antileishmanial activity

2.5.1. Culture of leishmania species

Leishmania species tested in this study are: *Leishmania infantum* (MHOM/MA/1998/LVTA), *Leishmania tropica* (MHOM/MA/2010/LCTIOK-4) and *Leishmania major* (MHOM/MA/2009/LCER19-09). These three species were isolated and identified from Moroccan infected patients at the National Reference Laboratory of Leishmaniasis, National Institute of Health of Rabat, Morocco. The species were cultivated as described by Et-Touys et al. (2016b). Briefly, parasite cultures of each *Leishmania* species were washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Cells were then re-suspended in RPMI 1640 (GIBCO) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% of Penicillin-Streptomycin mixture. Cultures were maintained at 23 °C.

2.5.2. Antileishmanial activity

Before evaluating the antileishmanial activity, the cellular density of each species was calculated using light microscopy. When cellular density was reached a threshold concentration of 10^6 cells/mL, *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major* promastigotes were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 2500 rpm for

Table 2

Antibacterial activity of OCEO areal parts at three phenological stages using agar-well diffusion assay.

Microorganisms ^a	Inhibition zone diameter (mm $\pm$ SD) ^b				
	Vegetative stage	Flowering stage	Post-flowering stage	Erythromycin	Chlorophenicol
<i>S. aureus</i> MBLA	32 $\pm$ 1.22 ^e	35 $\pm$ 0.94 ^e	28 $\pm$ 0.00 ^d	26 $\pm$ 3.0 ^d	29 $\pm$ 1.75 ^d
<i>S. aureus</i> 976	14 $\pm$ 1.34 ^c	16 $\pm$ 1.54 ^c	11 $\pm$ 0.61 ^c	28 $\pm$ 1.5 ^d	33 $\pm$ 0.5 ^e
<i>S. aureus</i> 994	12 $\pm$ 1.20 ^c	10 $\pm$ 1.25 ^c	14 $\pm$ 1.30 ^c	27 $\pm$ 1.25 ^d	36 $\pm$ 1.7 ^e
<i>P. aeruginosa</i>	na	09 $\pm$ 2.42 ^c	na	na	21 $\pm$ 1.5 ^c
<i>L. monocytogenes</i>	17 $\pm$ 0.44 ^c	21 $\pm$ 0.33 ^c	15 $\pm$ 1.34 ^c	24 $\pm$ 1.66 ^d	27 $\pm$ 2.33 ^d
<i>B. subtilis</i> 6633	26 $\pm$ 0.90 ^d	29 $\pm$ 1.16 ^d	31 $\pm$ 0.86 ^e	na	17 $\pm$ 0.25 ^c
<i>P. mirabilis</i>	43 $\pm$ 2.12 ^f	47 $\pm$ 2.73 ^f	38 $\pm$ 2.48 ^e	nd	nd
<i>E. coli</i> K12	19 $\pm$ 0.58 ^c	31 $\pm$ 0.91 ^e	26 $\pm$ 0.73 ^d	21 $\pm$ 2.66 ^c	33 $\pm$ 0.5 ^e

SD: standard deviation and values are means $\pm$ standard deviation of three separate experiments.nd (not determined), na (not active) values in the same row not sharing a common letter (c-d-e-f) differ significantly at $p < 0.05$.

Values in bold represent the most potent OCEO for each strain.

^a Final bacterial density was around 10^6 CFU/mL.^b Diameter of inhibition zone including well diameter of 6 mm, by the agar-well diffusion method at a concentration of 50 μ L of oil/well.**Table 3**

Minimum inhibitory concentration (MIC% (v/v)) and minimum bactericidal concentration (MBC% (v/v)) of OCEO aerial part at three phenological stages.

Microorganisms	Vegetative stage		Flowering stage		Post-flowering stage	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> MBLA	0.125	0.125	0.0312	0.0312	0.125	0.125
<i>S. aureus</i> 976	0.25	0.25	0.0625	0.0625	0.25	0.25
<i>S. aureus</i> 994	0.125	0.125	0.25	0.25	0.5	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	2	2	0.5	0.5	1	1
<i>L. monocytogenes</i>	0.5	0.5	0.125	0.125	0.25	0.25
<i>B. subtilis</i> 6633	0.5	0.5	0.625	0.625	0.0312	0.0312
<i>P. mirabilis</i>	0.25	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25
<i>E. coli</i> K12	0.25	0.25	0.0625	0.0625	0.25	0.25

MIC: Minimum inhibitory concentration (as% (v/v)).

MBC: Minimum bactericidal concentration (as% (v/v)).

Final bacterial density was around 10^6 CFU/mL.

10 min. To evaluate the anti-promastigote activity, 100 μ L of parasites culture were resuspended in a 96-well tissue culture plate, in fresh culture medium according to Et-Touys et al. (2016b). Briefly, parasites were incubated at 2.5×10^6 cells/well for 72 h at 23 °C in the presence of various concentrations of OCEO dissolved in 1% DMSO. DMSO was used at a final concentration never exceeding 1% which is not toxic to parasites (Oliveira et al., 2011; Essid et al., 2015; Bouyahya et al., 2017g). Sterile PBS and 1% DMSO (vehicle) were used as negative controls and Glucantime® was used as positive control.

2.5.3. Cell viability assay

The viability of leishmania species was evaluated the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay as described by Essid et al. (2015). Briefly, 10 μ L of MTT (5 mg/mL) were added to each micro-well and incubated for 3 h at 30 °C. The reaction was stopped by addition of 100 μ L of 50% (v/v) isopropanol-10% (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS) mixture to each well in order to dissolve insoluble formazan formed after tetrazolium dye reduction. After 30 min of incubation at room temperature, absorbance was measured at 560 nm using an ELISA plate reader. All assays were conducted in triplicate and compared to negative control (parasites) and reference drug (Glucantime). Cell viability was also evaluated by determination of the extracts concentration which inhibited half of the cell population (IC_{50}), obtained by modeling by plotting %age of inhibition versus concentration of OCEO. Cytotoxicity percentage was calculated using the following formula (Et-Touys et al., 2016b; Bouyahya et al., 2017h):

Cytotoxicity (%) = $100 \times (\text{Absorbance untreated cells} - \text{Absorbance treated cells}) / \text{Absorbance untreated cells}$.

2.6. Data analysis

The statistical analysis was performed by a one-way ANOVA analysis of variance. We considered that the difference is significant for $P \leq 0.05$. All experiences were carried out for three replicates and the results were expressed as mean $\pm$ SD.

3. Results and discussion

3.1. Essential oil yield and chemical composition

The yield of EOs obtained by hydrodistillation was calculated as the dry plant weight (v/w). As shown in Table 1, we note that EO yield of *O. compactum* is depending on the different growth stages. The highest EO yield was obtained at the vegetative stage (5.7%) and flowering stage (4.3%). Whereas, the lowest oil percentage was found at post-flowering stage (2.9%). This result shows clearly that the yield of OCEO correlates with phenological stages. Our results are more or less similar to the results of previous work carried out by Chebli et al. (2003) and Amakran et al. (2014) which obtained respectively a yield of 5.4% and 5.6%.

The chemical composition of OCEO (% of each compound, retention time, relative retention index and molecular structure) at three phenological changes is summarised in Table 1. We have identified 37 compounds representing 96.696% at the vegetative stage, 97.996% at the flowering stage and 94.802% at the post-flowering stage. These compounds are belonging to seven chemical families: monoterpene hydrocarbons, sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, oxygenated sesquiterpenes, alcohols, ketones and acids (Fig. 2). The oxygenated monoterpene compounds are the most representing in OCEO at the three phenological stages (49.4% at the vegetative stage, 62.975% at the flowering stage and 61.379% at the post-flowering stage) following by monoterpene hydrocarbon compounds (43.632% at vegetative stage, 32.529% at flowering stage and 31.815% at post-flowering stage). While, the yield of other chemical classes such as sesquiterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes, alcohols, ketones and acids is very weak.

These results are in consonance with other studies carried out by Ouedrhiri et al. (2016), Aboukhalid et al. (2016) and Sbayou et al. (2016). In the three stages of development, the chemical composition OCEO is rich in four major compounds (carvacrol, thymol, *p*-cymene and γ -terpinene); which are generally present as chemotypes in this oil (Bouhdid et al., 2008; ; El-Babili et al., 2011). However, the percentage yield of these compounds changes from one stage of development to another. At vegetative stage, the rate of carvacrol and thymol (two main oxygenated monoterpenes) is 24.71 and 15.32% respectively. At the flowering stage, we note a high percentage of carvacrol (43.584%) than thymol 10.33%. The percentage of these two compounds is

Table 4

Antioxidant activity of different concentrations of tested *Origanum compactum* essential oils at Vegetative stage (VS), Flowering Stage (FS) and Post-Flowering Stages (PFS) compared to a synthetic antioxidant Trolox and ascorbic acid by ferric reducing power.

Phenological stages	Concentration of OCEO (µg/mL)					
	15	30	60	125	250	500
VS	17.24 ± 1.62	23.54 ± 2.50	32.47 ± 1.84	63.19 ± 2.13	78.52 ± 2.42	93.24 ± 1.15
PS	11.82 ± 1.83	23.88 ± 3.54	46.39 ± 2.84	72.35 ± 5.13	82.37 ± 1.42	95.24 ± 2.44
PFS	24.56 ± 1.53	40.32 ± 2.45	57.83 ± 1.84	78.36 ± 3.13	89.92 ± 2.42	97.13 ± 1.44
Acide ascorbique	28.88 ± 2.27	43.62 ± 1.50	67.18 ± 2.35	89.42 ± 1.37	96.93 ± 2.09	97.21 ± 1.04
Trolox	31.63 ± 2.04	61.47 ± 1.54	44.73 ± 2.84	66.43 ± 2.13	77.15 ± 3.42	96.48 ± 1.43

Values are means ± standard deviation of three determinations.

reversed (38% of thymol and 6.4% of carvacrol) at the post-flowering stage (Table 1 and Fig. 3). This fluctuation can be explained by two suggestions: the first is based on the isomerization of carvacrol into thymol which is depending to the high temperature values that are present generally at post-flowering stage (Belkamel et al., 2013). The second suggestion focused on the fact that at the post-flowering stage, the plants recycle the secondary metabolites to remain in a state of maintenance. In the case of OCEO, this biodegradation is useful from thymol than carvacrol (Belkamel et al., 2013).

The chemical composition of EOs is affected by the stage of development, climates but also by the extraction methods (Aboukhalid et al., 2016; Belkamel et al., 2013). The results obtained in our study show clearly that the plant of *O. compactum* expresses the responsible enzymes of the synthesis of EOs in a stage-dependent manner. Indeed, these fluctuations in chemical composition are regulated by plants in space and time via various epigenetic factors, such as DNA methylation, histones modifications and remodeling of chromatin in order to respond against specific physiological functions (Vriet et al., 2015; Avramova, 2015). Our results are in agreement with many other studies that have shown the richness of OCEO by carvacrol, thymol, γ -terpinene and *p*-cymene (Bouhdid et al., 2008; Sfeir et al., 2013; Azizkhani et al., 2013; Bakhy et al., 2014; Sbayou et al., 2014; Amakran et al., 2014; Ouedrhiri et al., 2016; Aboukhalid et al., 2016). These studies however showed remarkable fluctuations in the percentages of the four major compounds from the Oregano collected at different Moroccan regions; this may be explained by the influence of the external environment on the regulation of secondary metabolism pathways in plants (Crisp et al., 2016).

3.2. Antibacterial activity

The antibacterial activity of OCEO is determined by using the well-agar diffusion method against eight bacterial strains. The results expressed as diameters of inhibition are summarized in Table 2. On the execution of *P. aeruginosa*, EOs obtained in the three phenological stages were showed to be effective against all the strains tested. The highest zone of inhibition was recorded in the oil obtained at the flowering stage against *P. mirabilis* (47 ± 2.73 mm). Whereas, the weakest zone of inhibition was obtained by the same EO against *P.*

aeruginosa (9 ± 2.42 mm).

In addition, the determination of MIC and CMB is an important quantitative method for determining the bacteriostatic and bactericidal action EOs in a liquid medium. Table 3 shows the MIC and MBC values obtained in our study. We note that OCEO Oregano in the flowering and post-flowering stages showed the significantly effects that OCEO at vegetative stage. The lowest MIC value was revealed by the OCEO at the flowering stage EO against *S. aureus* MBLA and the OCEO at the post-flowering stage against *B. subtilis* 6633 (MIC = 0.0312%). In both cases, the values of MIC are equal to the values of MBC indicating thus a bactericidal action at MIC values.

Antibacterial activity is certainly linked to the major compounds (thymol, carvacrol, γ -terpinene and *p*-cymene) present in the OCEO, to the synergistic effects between these components and to the additive effects of the minor compounds which can reinforce the antibacterial action (Bouhdid et al., 2008). Indeed, several studies have shown the antibacterial activity of the major compounds of OCEO such as carvacrol, thymol, γ -terpinene and *p*-cymene (Bagamboula et al., 2004; Xu et al., 2008; Chauhan and Kang, 2014; Li and Liu, 2009; Du et al., 2015; Andrade-Ochoa et al., 2015).

On the other hand, the antibacterial activity of OCEO has been evaluated by some studies against several bacterial strains (Bouhdid et al., 2008; Bouhdid et al., 2009; Azizkhani et al., 2013; Mith et al., 2014; Sbayou et al., 2014; Ouedrhiri et al., 2016). Our results are not quite similar to these studies because of the difference in the chemical composition, the strains tested and the experimental methods used. The anti bacterial mechanism of OCEO remains undervalued. Bouhdid et al. (2009) have demonstrated that this oil is able to cross the cell membrane inducing thus the leakage of potassium, the disturbance in the electron respiratory chain and the slight modifications in cellular morphology. Other antibacterial mechanisms of EOs have been investigated as related to the capacity EOs components to deregulates the quorum sensing signaling pathways leading thus to decrease in bacterial resistance (Bouyahya et al., 2017i).

3.3. Antioxidant activity

Several methods are used to evaluate the antioxidant activity of natural products. The complexity of the chemical composition of EOs

Table 5

Antioxidant activity of different concentrations of tested *Origanum compactum* essential oils at Vegetative stage (VS), Flowering Stage (FS) and Post-Flowering Stages (PFS) compared to a synthetic antioxidant Trolox and ascorbic acid by free radical DPPH scavenging activity.

Phenological stages	Concentration of OCEO (µg/mL)					
	15	30	60	125	250	500
VS	05.17 ± 1.53	13.25 ± 2.54	18.74 ± 1.84	24.02 ± 2.17	38.92 ± 2.41	73.20 ± 1.57
PS	11.82 ± 2.04	23.88 ± 1.63	23.67 ± 2.86	39.07 ± 2.16	63.87 ± 2.94	91.24 ± 1.43
PFS	07.37 ± 1.83	19.35 ± 3.51	33.82 ± 1.87	42.65 ± 3.11	74.92 ± 1.28	96.73 ± 2.55
Acide ascorbique	45.23 ± 2.27	97.32 ± 1.42	97.23 ± 2.35	97.42 ± 1.37	97.87 ± 2.09	97.52 ± 1.04
Trolox	31.62 ± 1.63	61.47 ± 1.17	97.38 ± 1.74	97.59 ± 2.03	97.55 ± 2.96	97.49 ± 3.12

Values are means ± standard deviation of three determinations.

Table 6IC₅₀ values (μg/mL) for the antioxidant activity of OCEO aerial part at three phenological stages.

Assays	Essential oils			Ascorbic acid	Trolox
	Vegetative stage	Flowering stage	Post-flowering stage		
DPPH	320 ± 2.71	211.41 ± 4.63	172.87 ± 5.38	27.20 ± 0.17	43.72 ± 0.31
Reducing power	94.18 ± 5.50	67.42 ± 1.77	53.28 ± 2.64	47.63 ± 0.58	85.45 ± 1.36

Values represent means (standard deviations) for triplicate experiments.

obliges us to test them using these different methods. In our study, we adopted two methods to reveal the antioxidant power of the OCEO collected during three phenological stages; the DPPH free radical scavenging method and the ferric reducing power assay. The ferric reducing power assay is a simple test that evaluates the ability of a product to reduce ferrocyanidin potassium solution. This reduction is accompanied by an increase in the absorbance at 700 nm. Table 4 summarizes the increase of ferric reducing power in different concentration of OCEO at three phenological stages. The results showed clearly that this reduction is a dose-dependent. To compare antioxidant capacity, we have calculated the concentrations of OCEO that reduce 50% of the ferric solution (IC₅₀) by modeling reducing power plotting the OCEO concentrations. The results obtained are summarized in Table 6. The ferric reducing power of OCEO at vegetative, flowering and post-flowering stages is respectively IC₅₀ = 94.18 ± 5.50, IC₅₀ = 67.42 ± 1.77 and IC₅₀ = 53.28 ± 2.64 μg/mL. It is clear that this ability is significantly high ($p < 0.05$) in OCEO at the flowering and post-flowering stage compared to the Trolox (IC₅₀ = 85.45 ± 1.36 μg/mL). Whereas, ascorbic acid showed an ability to reduce potassium ferrocyanidin at a very low concentration (IC₅₀ = 47.63 ± 0.58 μg/mL) compared to the OCEO ($p < 0.05$). The reducing power of a product is certainly associated with its electron donating capacity and therefore this product can prevent the peroxidation of the lipids and make the intermediates of the electron respiration chain more stable (Yen and Chen, 1995).

DPPH is a radical used frequently to test the ability of a product to trap free radicals. The test is based on the reduction of the DPPH molecule by the OCEO. The results expressed as the percent of inhibition of the DPPH free radical whose the modulation of these values plotting the concentration of the OCEO (Table 5) allows us to determine the concentration which reduces 50% of the DPPH free radical (IC₅₀). The results of antioxidant capacity (IC₅₀) are shown in Table 6. The OCEO tested at the vegetative stage flowering and post-blooming stages revealed the antioxidant capacity values of IC₅₀ = 320 ± 2.71, 211.41 ± 4.63 and IC₅₀ = 172.87 ± 5.38 μg/mL respectively. These values are less effective ($p < 0.05$) compared to Trolox (IC₅₀ = 43.72 ± 0.31 μg/mL) and ascorbic acid (IC₅₀ = 27.20 ± 0.17 μg/mL). The results of the antioxidant activity are interesting and confirm those obtained by various studies (Bouhdid

et al., 2008; El Babili et al., 2011; Amerkan et al., 2014; Sbayaou et al., 2016). However, there is no literature data regarding the antioxidant activity of OCEO at three phenological stages.

The results obtained in our study have demonstrated that harvest stage has a significant effect on the antioxidant activity of OCEO. The antioxidant activity of EOs at post-flowering stage has not in consonance with several studies that worked on other species and shown an antioxidant activity at flowering stage (Almaoui Jamali et al., 2012; Alaoui Jamali et al., 2013; El-Bouzidi et al., 2013). Antioxidant effects of carvacrol, thymol, γ-terpinene and *p*-cymene have been reported previously (Ruberto and Baratta, 2000). Therefore, the high content of these components could be the responsible of the antioxidant effect of OCEO. However, the synergetic effects of various essential components could also be contributed to the antioxidant activity. The fluctuations in the antioxidant capacities are may be due to the difference in composition and the method used.

3.4. Antileishmanial activity

The OCEO collected at three phenological stages were tested against three promastigote forms of *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* and *L. tropica*) using the MTT test. Thus, L-Glutamine was used as a positive control.

The three promastigotes species were exposed to increasing concentrations ranging from 0.015 μg/mL to 1 μg/mL. The results obtained are summarised in Table 7. They are expressed as the percentage of cytotoxicity at several concentrations. At low concentrations, EOs showed significant cytotoxicity effects against three *Leishmania* species with dose-dependent manner ($p < 0.05$), while the cytotoxic effects are not significantly variable with increasing concentrations ($p > 0.05$). However, to compare antileishmanial activity of these EOs and Glucantime, we should establish the IC₅₀ values.

The values of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) are calculated by modulating percentage of cytotoxicity plotting the concentration of OCEO. The results obtained are summarized in Table 8. Antileishmanial activity is depending also to leishmania species as well as to EO tested. We have noted that *L. infantum* is the most sensitive strain to OCEO tested at the vegetative, flowering and post-flowering stage with the inhibition values of IC₅₀ = 0.12 ± 0.06 μg/mL,

Table 7Antileishmanial activity of different concentrations of *Origanum compactum* essential oils at vegetative stage (VS), Flowering Stage (FS) and Post-Flowering Stage (PFS) against *Leishmania major*, *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* by MTT assay.

Leishmania Species	Phenological Stages	Concentration (μg/mL)						
		0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1
<i>Leishmania major</i>	VS	02.50 ± 0.53	09.52 ± 2.54	14.5 ± 1.84	23.86 ± 3.13	48.62 ± 2.42	67.38 ± 1.44	94.25 ± 1.32
	FS	30.14 ± 2.27	56.8 ± 1.50	62.87 ± 2.35	47.29 ± 1.37	61.35 ± 2.09	83.04 ± 1.04	96.82 ± 1.19
	PFS	4.91 ± 1.04	9.46 ± 1.54	17.51 ± 2.84	27.06 ± 2.13	39.24 ± 3.42	74.13 ± 1.44	93.24 ± 2.18
<i>Leishmania infantum</i>	VS	08.53 ± 1.83	19.47 ± 3.44	34.55 ± 2.74	52.36 ± 4.21	68.62 ± 1.43	87.38 ± 2.86	95.25 ± 1.78
	FS	37.14 ± 2.27	59.68 ± 1.53	69.67 ± 2.34	87.89 ± 1.40	91.37 ± 2.11	94.56 ± 1.22	97.73 ± 1.03
	PFS	23.37 ± 1.62	41.82 ± 1.45	58.07 ± 1.48	77.16 ± 2.13	89.24 ± 2.42	94.13 ± 1.16	97.24 ± 1.26
<i>Leishmania tropica</i>	VS	03.15 ± 0.83	09.63 ± 1.37	14.87 ± 2.79	22.36 ± 1.64	38.66 ± 4.13	57.38 ± 2.03	73.25 ± 3.12
	FS	11.04 ± 1.08	16.86 ± 2.26	19.67 ± 1.97	31.22 ± 3.04	56.93 ± 2.18	74.54 ± 2.56	87.17 ± 4.09
	PFS	03.07 ± 0.52	07.52 ± 0.83	08.06 ± 1.05	17.66 ± 1.02	32.71 ± 2.21	44.53 ± 1.86	62.84 ± 2.33

Values are means ± standard deviation of three determinations.

Table 8

IC₅₀ values (µg/mL) for the antileishmanial activity of OCEO aerial part at three phenological stages.

Leishmania species	Vegetative	Flowering stage	Post-flowering stage	Glucantime
<i>L. major</i>	0.26 ± 0.09	0.13 ± 0.05	0.17 ± 0.02	> 5
<i>L. infantum</i>	0.12 ± 0.06	0.02 ± 0.004	0.04 ± 0.01	> 5
<i>L. tropica</i>	0.35 ± 0.03	0.22 ± 0.05	0.72 ± 0.02	> 5

Values represent means (standard deviations) for triplicate experiments.

IC₅₀ = 0.02 ± 0.004 µg/mL and IC₅₀ = 0.04 ± 0.01 µg/mL respectively. On the other hand, the OCEO at the flowering stage is more active than other two oils against three parasites tested. All essential oils showed more effective antileishmanial activities than Glucantime (IC₅₀ > 10 µg/mL). The difference in the antileishmanial activity of OCEO at three phenological stages is certainly due to the difference in the chemical composition of these EOs. For example, the OCEO at the flowering is very rich in carvacrol (43.584%) which could be responsible for a leishmanicidal action. The sensitivity of each parasitic strain depends on its ability to tolerate the action of EO compounds. So far, no studies have been carried out on the antileishmanial activity of the OCEO. Furthermore, some studies on EOs of other medicinal plants belonging to the Lamiaceae family have shown the efficacy of these oils to inhibit the growth of Leishmania species at low concentrations (Essid et al., 2015).

The antileishmanial properties of OCEO are certainly linked to the bioactive molecules presents in these oils. Indeed, some phenolic compounds present in this EO such as carvacrol and *p*-cymene have demonstrated an antileishmanial effect a low concentrations against *L. major* and *L. infantum* (Essid et al., 2015). EOs and their derivatives have several mechanism of action that could come from the morphological destruction to the regulation levels. These mechanisms including the induction of apoptosis, the disruption of the electron transport chain and the inhibition of DNA topoisomerase (Castro et al., 1992).

4. Conclusion

The results obtained in this study showed that the chemical profile of OCEO is affected by growth developmental stages. Antibacterial and antileishmanial effects of OCEO were best at the flowering stage, which was thus identified as the optimal harvest time as aromatic and medicinal plant for this medicinal valuable against microbial infections. However, antioxidant activities were best at the post-flowering stage. The findings of our results provide more information concerning economical value of OCEO as an antibacterial, antioxidant and antileishmanial agents.

References

- Aboukhalid, K., Lamiri, A., Agacka-Moldoch, M., Doroszewska, T., Douaïk, A., Bakha, M., Casanova, J., Tomi, F., Machon, N., Al Faiz, C., 2016. Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco. *Chem. Biodiv.* 13, 1126–1139.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co., CarolStream, IL, USA.
- Almaoui Jamali, C., El Bouzidi, L., Bekkouche, K., Hassani, L., Markouk, M., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A., 2012. Chemical composition, antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan thymus species. *Chem. Biodivers.* 9, 1188–1197.
- Almaoui Jamali, C., Kasrati, A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A., 2013. Phenological changes to the chemical composition and biological activity of the essential oil from Moroccan endemic thyme (*Thymus maroccanus* Ball). *Ind. Crop Prod.* 49, 366–372.
- Amakran, A., Hamoudane, M., Ramdan, B., Ben mehdi, N., Ben mrid, R., 2014. Etude des propriétés antioxydants, antitrypanosomiques et photochimiques de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* de Tétouan. *Sci. Lib. Ed. Mersenne* 6, 2111–4706.
- Andrade-Ochoa, S., Nevárez-Moorillón, G.V., Sánchez-Torres, L.E., Villanueva-García, M., Sánchez-Ramírez, B.E., Rodríguez-Valdez, L.M., Rivera-Chavira, B.E., 2015. Quantitative structure activity relationship of molecules constituent of different

- essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 332.
- Aneb, M., Talbaoui, A., Bouyahya, A., Boury, E.L.H., Amzazi, S., Benjouad, A., Dakka, N., Bakri, Y., 2016. In vitro cytotoxic effects and antibacterial activity of Moroccan medicinal plants *Aristolochia longa* and *Lavandula multifida*. *Euro. J. Med. Plant* 16, 1–13.
- Avramova, Z., 2015. Transcriptional memory of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant J.* 83, 149–159.
- Azizkhani, M., Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M.V., Aznar, R., 2013. Comparative efficacy of *Zataria multiflora* Boiss., *Origanum compactum* and *Eugenia caryophyllus* essential oils against *E. coli* O157:H7: feline calicivirus and endogenous microbiota in commercial baby-leaf salads. *Inter. J. Food Micro.* 166, 249–255.
- 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 Microbiol.* 21, 33–42.
- Bakhy, K., Benhabib, O., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F., Al Faiz, C., 2014. Yield and chemical variability of the essential oil isolated from aerial parts of wild *Origanum compactum* Benth From Moroccan Western Rif. *Amer. J. Essent. Oils Nat. Prod.* 1, 9.
- Belkamel, A., Bammi, J., Belkamel, A., Douira, A., 2013. Etude de la composition chimique de l'huile essentielle d'une endémique Ibéro-marocaine: *Origanum compactum* (Benth.). *J. Anim. Plant Sci.* 19, 2880–2887.
- Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi, A., Zidane, L., 2014. Étude floristique et ethnobotanique de La flore Médicinale du haut atlas oriental (Haute moulouya). *J. Appl. Biosci.* 78, 771–787.
- Bouhdid, S., Skali, S.N., Idaomar, M., Zhiri, J., Baudoux, A., Abrini, J., 2008. Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *Afr. J. Biotech.* 7, 1563–1570.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Zhiri, A., Espuny, M.J., Manresa, A., 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1558–1568.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016a. Essential oils as anticancer agents news on mechanisms of action. *Phytothérapie* 14 <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-016-1058-z>. (In press).
- Bouyahya, A., Abrini, J., El-baoboua, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2016b. Determination of phenol content and antibacterial activity of five medicinal plants ethanolic extracts from North-West of Morocco. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 7, 107–110.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Khay, E.L., Charfi, S., Boujida, N., Harsal, E.L.A., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2016c. In vitro antibacterial of organic extracts from North-West Moroccan medicinal plant myrtus communis (L.). *Brit. Biotech. J.* 16, 1–9.
- Bouyahya, A., El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2016d. Determination of phenolic contents: antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *Leaf Extracts Brit. Biotech. J.* 14, 1–10.
- Bouyahya, A., Jamal, A., Edaoudi, F., Et-Touys, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2016e. *Origanum compactum* benth: a review on phytochemistry and pharmacological properties. *Med. Aromat. Plants* 5, 252. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000252>.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N., 2017a. Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>. (in press).
- Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Bakri, Y., Dakka, N., 2017b. Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. *Eur. J. Integr. Med.* 13, 9–25.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Lagrouh, F., Dakka, N., Bakri, Y., 2017c. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant activity of Moroccan honey samples. *Phytoth.* <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1122-3>. (n press).
- Bouyahya, A., Abrini, J., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Chatoui, K., Harhar, H., Bakri, Y., Dakka, N., 2017d. Phytochemical screening, antiradical and antibacterial activities of *cistus crispus* from Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* 8, 1560–1566.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N., 2017e. Phytochemical Screening and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Origanum compactum* extracts. *Phytothérapie*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1101-8>. in press.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Belmehdi, O., Et-Touys, A., Abrini, J., Dakka, N., 2017f. Phenolic extracts of *Centaurium erythraea* with novel antiradical, antibacterial and antileishmanial activities. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 7, 433–439.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Yahyaoui, El, Idrissi, A., Abrini, J., Dakka, N., 2017g. In vitro screening of antibacterial and antioxidant activities of essential oils from four moroccan medicinal plants. *Micro. Res. J. Inter.* 18, 1–10.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Khay, E.O., Edaoudi, F., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Dakka, N., 2017h. Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: a review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 7, 57–64.
- Bouyahya, A., Et-Touys, A., Dakka, N., Fella, H., Abrini, J., Bakri, Y., 2017i. Antileishmanial potential of medicinal plant extracts from the North-West of Morocco. *Beni-Suef Univ. J. Bas. Appl. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.06.003>. (In press).
- Castro, C., Jimenez, M., Gonzalez-De-Parra, M., 1992. Inhibitory effect of piquierol A on the growth of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 58, 281.
- Chauhan, A.K., Kang, S.C., 2014. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* Ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. *Res. Microb.* 165, 559–565.
- Chebli, B., Achouri, M., Idrissi, H.L.M., Hmamouchi, M., 2003. Chemical and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. *J. Ethnopharmacol.* 89, 165–169.
- Chishti, S., Kaloo, Z.A., Sultan, P., 2013. Medicinal importance of genus *origanum*: a

- review. *J. Pharm. Phytol.* 5, 170–177.
- Crisp, A.P., Ganguly, D., Eichten, S.R., Borevitz, O., Pogson, B.J., 2016. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sci. Adv.* 2. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1501340>.
- Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., Guo, Y., 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J. Anim. sci. Biotech.* 6, 58.
- Duman, H., Baser, K.H.C., Ayteç, Z., 1998. Two new species and a new hybrid from Anatolia. *Turk. J. Bot.* 22, 51–55.
- Ebrahimi, N.S., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A., Yousefzadi, M., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chem.* 110, 927–931.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Lemhadri, A., Ouahidi, M.L., Jouad, H., 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J. Ethnopharmacol.* 82, 97–103.
- El Bouzidi, L., Bouajila, J., Souchard, J.P., Bertrand, C., Bellvert, F., Fouraste, I., Moulis, C., Valentin, A., 2011. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J. Food Sci.* 76, 512–518.
- El Bouzidi, L., Almaoui Jamali, C., 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. *Ind. Crops Prod.* 43, 450–456.
- El Hamsas El Youbi, A., Ouahidi, I., Mansouri, E.L.L., Daoudi, A., Bousta, D., 2016. Ethnopharmacological survey of plants used for immunological diseases in four regions of Morocco. *Eur. J. Med. Plan.* 13, 1–24.
- El Hilaly, J., Hammouchi, M., Lyoussi, B., 2003. Études ethnobotaniques et l'évaluation économique des plantes médicinales dans la province de Taounate (nord du Maroc). *J. Ethnopharmacol.* 86, 149–158.
- Ennabili, A., Gharnit, N., El Hamdouni, E.L., 2000. Inventory and social interest of medicinal: aromatic and Honey-plants from Mokriset region (NW of Morocco). *Ediciones Universidad de Salamanca* 19, 57–74.
- Essid, R., Rahali, F.Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F., 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Ind. Crop Prod.* 77, 795–802.
- Et-Touys, A., Fellah, H., Mniouil, M., Bouyahya, A., Dakka, N., Abdennebi, E.H., Sadak, A., Bakri, Y., 2016a. Screening of antioxidant: antibacterial and antileishmanial activities of *Salvia officinalis* L. extracts from Morocco. *Brit. Micro. Res. J.* 16, 1–10.
- Et-Touys, A., Fellah, H., Sebti, F., Mniouil, M., Aneb, M., Elboury, H., Talbaoui, A., Dakka, N., Sadak, A., Bakri, Y., 2016b. In vitro antileishmanial activity of extracts from endemic moroccan medicinal plant *salvia verbenaca*(L.) briq. sspverbenaca maire (S. clandestina batt. non L). *Euro. J. Med. Plan.* 16, 1–8.
- Fadel, F., Ben Hmamou, D., Salghi, R., Chebli, B., Benali, O., Zarrouk, A., Ebenso, E.E., Chakir, A., Hammouti, B., 2013. Antifungal activity and anti-corrosion inhibition of origanum compactum extracts. *Int. J. Electrochem. Sci.* 8, 11019–11032.
- Fakchich, J., Elachouri, M., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmac.* 28, 76–87.
- Ghourri, M., Zidane, L., Douira, A., 2013. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement de la lithiase rénale dans la province de Tan-Tan (Maroc saharien). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7, 1688–1700.
- Hamrouni, S.I., Maamouri, E.E., Chahed, T., Wannes, A.W., Kchouk, E.M., Marzouk, B., 2009. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Ind. Crops Prod.* 30, 395–402.
- Ietswaart, J.H.A., 1980. Taxonomic Revision of the Genus *Origanum* (Labiatae), Leiden Botanical Series, vol. 4 Leiden University Press, The Haag.
- Jouad, H., Haloui, M., Rhiaoui, H., El Hilaly, J., Eddouks, M., 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharm.* 77, 175–182.
- Khay, E.O., Bouyahya, A., El Issaoui, K., Zinebi, S., Abrini, J., 2016. Study of synergy between *Mentha pulegium* essential oil, honey and bacteriocin-like inhibitory substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 3, 29–35.
- Khouchlaa, A., Bouyahya, A., Ait Lahcen, S., Youssef, B., Nadia, D., Tijane, M., 2017a. Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *zizyphus lotus* l. extracts. *World J. Pharm. Res.* 6, 1354–1367.
- Khouchlaa, A., El-mehyaoui, A., Bouyahya, A., Tijane, M., 2017b. Determination of phenol content and evaluation of in vitro litholytic effects on urolithiasis of Moroccan *Zizyphus lotus* L. extract. *Phytothérapie* s1. <http://dx.doi.org/10.1007/s10298-017-1106-3>.
- Laghmouchi, Y., Belmehdi, O., Bouyahya, A., Skali Senhaji, N., Abrini, J., 2017. Effect of temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum compactum*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 10, 156–160.
- Lahlou, M., 2002. Potential of *Origanum compactum* as a cercaricide in Morocco. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 96, 587–593.
- Lahsissene, H., Kahouadji, A., 2010. Ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Zaër region of Morocco. *Phytothérapie* 8, 202–811.
- Li, G.X., Liu, Z.Q., 2009. Unusual antioxidant behavior of alpha- and gamma-terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3943–3951.
- Merzouki, A., Ed-derfoufi, F., Molero Mesa, J., 2000. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district NW Morocco. *Fitoterapia* 71, 278–307.
- Mezzoug, N., Elhadri, A., Dallouh, A., Amkiss, S., Skali, N.S., Abrini, J., Zhiri, A., Baudoux, D., Diallo, B., El Jaziri, M., Idaomar, 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.* 629, 100–110.
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., Clinquart, A., 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci. Nutr.* 2, 403–416.
- Oliveira, L.F.O., Schubach, A.O., Martins, M.M., Passos, S.L., Oliveira, R.O., Marzochi, M.C., Andrade, C.A., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 118, 87–96.
- Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdi, S., Moja, S., Ouazzani Chahdi, O., Taleb, M., Greche, H., 2016. Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. *Ind. Crops Prod.* 89, 1–9.
- Oyedemi, S.O., Okoh, A.I., Mabinya, L.V., Pirochenva, G., Afolayan, A.J., 2009. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, α -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotech.* 8, 1280–1286.
- Pavela, R., 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of Spodoptera littoralis. *Fitoterapia* 76, 691–696.
- Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69, 167–174.
- Sbayou, H., Ababou, B., Boukachabine, K., Manresa, A., Zerouali, K., Souad, A., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia herba-alba* and *Mentha pulegium* essential oils. *J. Life Sci.* 8, 35–41.
- Sbayou, H., Boumaza, A., Hilali, A., Amghar, S., 2016. Antioxidant properties of *artemisia herba-alba* asso., *Mentha pulegium* L. and *Origanum compactum* benth. Essential oils. *J. Mater. Environ. Sci.* 7, 2908–2912.
- Sfeir, J., Lefrançois, C., Baudoux, D., Derbré, S., Licznar, P., 2013. In Vitro Antibacterial Activity of Essential Oils Against *Streptococcus Pyogenes* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. pp. 1–9.
- Talbaoui, A., El amdaoui, H., El Moussaoui, M., Aneb, M., Amzazi, S., Bakri, Y., 2016. GC–MS analysis and antibacterial activity of hydro-distillation oil from *Tetraclinis articulata* wood grown in Khemisset (Morocco). *J. Indian Acad. Wood Sci.* <http://dx.doi.org/10.1007/s13196-016-0173-7>. (in press).
- Vriet, C., Hennig, L., Laloi, C., 2015. Stress-induced chromatin changes in plants of memories, metabolites and crop improvement. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1261–1273.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.P., Pei, R.S., Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 174–179.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 43, 27–37.
- Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.* 58, 45–54.

Essential oils of *Origanum compactum* induce membrane permeability, disturb cell membrane and suppress quorum sensing phenotype in *Bacillus subtilis* 6633 and *Escherichia coli* K12

Abdelhakim Bouyahya^{a,b}, Nadia Dakka^a, Jamal Abrini^b, Youssef Bakri^a

^a Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, and Genomic Center of Human Pathologies, Mohammed V University, Rabat, Morocco

^b Biology and health Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

*Corresponding author: Abdelhakim Bouyahya

E-mail: boyahyaa-90@hotmail.fr ; Phone: +212601350878

Postal address : Bouyahya Abdelhakim, Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences of Rabat, University Mohammed V of Rabat 4, Av. Ibn battouta BP1014 Rabat-Morocco.

ABSTRACT

Bacteria have developed several mechanisms to resist against antibiotics and the search of new antibacterial agents such as essential oils (EOs) is of great interest. The aim of this study was the investigation of antibacterial activity of *Origanum compactum* essential oils (OCEO) at three phenological stages on gram negative bacteria (*Escherichia coli* K12) and gram positive bacteria (*Bacillus subtilis*). The EOs were obtained by hydrodistillation, and the chemical composition was determined using GC-MS analysis. The antibacterial activity was evaluated using the agar-well diffusion assay. The MIC and MBC values were determined using micro-dilution assay. Investigation of the antibacterial action was carried out by the evaluation of the effect of EOs on the antibacterial kinetic growth, the integrity of cell membrane and permeability of cell membrane. The anti-quorum sensing activity was tested by the measure of the biofilm growth inhibition. In this study, OCEO at three phenological stages showed potent inhibitory effect against *E. coli* and *B. subtilis*. The MIC values are equal to MBC values in all case thus indicating a bactericidal action at MIC values. The lowest inhibition value against *B. subtilis* was obtained with OCEO at the post-flowering stage (MIC=MBC=0.0312% (v/v)). The antibacterial kinetic curves indicated that the antibacterial activity of OCEO was concentration-dependent. Cell membrane permeability assay showed that OCEO at flowering increased membrane permeability, in particular for *E. coli*. The increase in proteins and nucleic acids absorbing materials of bacterial cell suspensions indicated that OCEO destroy cell membrane integrity, thus indicating a lytical action. Moreover, OCEO was able to inhibit the formation of biofilms of *B. subtilis*, a phenotype that has been known to be QS-regulated. The findings of this study showed that OCEO has potential antibacterial activities against *E. coli* and *B. subtilis*. The antibacterial mechanisms of OCEO are related to the irreversible damage to the cell wall and membrane, leading to the leakage of absorbing materials (DNA and RNA). These oils also increased the membrane permeability and the QS deregulation in bacteria cells. However, further investigations are required for proper scientific validation of the folk use of this plant species.

Keywords: *Origanum compactum*; essential oil; antibacterial action; cell membrane; quorum sensing inhibition.

1. Introduction

The emergence and re-emergence of infectious diseases is primarily caused by the ability of bacteria to withstand the antibiotics. Indeed, bacteria have developed sophisticated means to counteract the actions of antibiotics [1]. The implication of the quorum sensing in the establishment of resistance mechanisms by linking the interactions between bacteria is a recently deciphered the mode of regulation. In addition, bacteria are the main cause of food deterioration in the food industry. The deterioration of food causes damage to the health of consumers and / or industry. Moreover, due to the toxicological side effects of synthetic antibacterial products and the problems associated with their biodegradation, efforts have been made in recent years to find effective alternatives to the pharmaceutical and food industry [2].

EOs are natural molecules of complex mixture possess several chemical structures synthesized by aromatic plants as secondary metabolites [1]. The role of these essential oil molecules in plants is mainly related to the process of defense against pathogenic microorganisms. EOs have found a variety of applications, particularly in the cosmetic and food industries and as a source of drugs [2, 3]. *In vitro* and *in*

vivo studies have shown that EOs and their active compounds possess several biological effects such as antimicrobial, antioxidant, antitumor and anti-inflammatory properties [2, 3, 4, 5].

Oregano (*O. compactum*, Benth) is an aromatic and medicinal plant known in Morocco by its vernacular names "Zaatar" and "Sahtar". This species has long been used in the Moroccan pharmacopoeia for its multiple medicinal virtues. Indeed, the aerial parts of *O. compactum* are used by the Moroccan population to fight against pulmonary and gastrointestinal infections [6, 7]. In addition, leaves and stems are used against pathologies of the digestive system, heart diseases, inflammation, hypertension and diabetes [8, 9, 10]. Several studies have shown that OCEO are rich in terpenic compounds of phenolic classes such as carvacrol, thymol, γ -terpinene and p-cymene [11, 12, 13]. However, this composition is much more affected by genetic determinisms, environmental factors [14] and phenological stages of the plant [15].

In vitro studies showed the biological activities of OCEO, particularly the antibacterial activity [11, 12]. The antibacterial action of OCEO was carried out by Bouhdid et al. [16] in a previous work against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The results showed that the EO appears to be altered at a physiological and a structural level leading to the death of bacterial cells. However, the study could not correlate between action targets and active compounds of the OCEO. Certainly, the mechanism of antibacterial action of EOs and their derivatives is related to the ability of the phenolic compounds to cross the cell membrane and consequently disturb its integrity. However, they can also deregulate the communication system between bacteria, thus leading them to lose their ability to coordinate the interactions between themselves and their environment in order to survive [17].

In a previous study, we evaluated the antibacterial, antileishmanial and antioxidant activity of OCEO collected from the province of Ouezzane (North-West of Morocco) at the three developmental stages [15]. The results obtained were remarkably encouraging, particularly with regard to the antibacterial activity. Indeed, OCEO tested at three phenological stages showed bacteriostatic and bactericidal effects at very low concentrations especially against *E. coli* and *B. subtilis*. In order to understand the mechanisms leading to the death of these two bacteria, OCEO at different phenological stages were tested. We also examined the action of OCEO on dynamic kinetics, membrane permeability, membrane integrity and QS suppression phenotype of *B. subtilis* and *E. coli*.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and essential oils extraction

The aerial parts of *O. compactum* used in this work were collected from its wild habitat in three phenological stages: vegetative, flowering and post-flowering from the North-West of Morocco. The samples were air dried at room temperature in the shade. The extraction of EOs was carried out by hydrodistillation method using Clevenger-type apparatus. The obtained oils were dried by anhydrous sodium sulphate, weighed and stored at 4°C until use. The chemical composition of OCEO was determined in our publication using GC-MS analysis [15].

2.2. Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli K12 (Laboratory of Food Microbiology, UCL, Belgium: MBLA) and *Bacillus subtilis* 6633 (German Collection of Microorganisms: DSM) were chosen to evaluate the antibacterial activity of EOs. Strains are maintained on an inclined agar medium at 4°C. Before use, the bacteria were revived by two subcultures in an appropriate culture medium: Lysogeny broth (LB) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) at 37°C for 18 to 24h. For the test, final inoculums concentrations of 10⁶ CFU/mL bacteria were used according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA (NCCLS 1999).

2.3. Antibacterial activity

2.3.1. Agar-well diffusion assay

In order to estimate the bacteriostatic activity of the EOs by measuring the growth inhibition zone of germs around wells. Six ml of LB medium in superfusion containing 0.8% agar were inoculated by a fresh culture of indicator bacterial strain (a final concentration was 10⁶ CFU/mL). After solidification, the wells were filled with 50 μ L of OCEO. After incubation at appropriate temperature for 24h, all plates were examined for any zone of growth inhibition, and the diameter of these zones was measured in millimeters [15]. All the tests were performed in triplicates.

2.3.1. Minimal inhibitory concentration (MIC)

MICs were determined using the broth micro-dilution assay as described [15]. Agar at 0.15% (w/v) was used as a stabilizer of the extract-water mixture and resazurin as a bacterial growth indicator. 50 μ L of

bacteriological agar (0.15% w/v) was distributed from the 2nd to the 8th well of a 96-well polypropylene microtitre plate. The dilutions of OCEO were prepared in Mueller Hinton Broth supplemented with bacteriological agar (0.15% w/v), to reach a final concentration of 2%; 100 μ L of these suspensions was added to the first test well of each microtitre line, and then 50 μ L of scalar dilution was transferred from the 2nd to the 8th well. The 8th well was considered as growth control, because no EO was added. We then added 50 μ L of a bacterial suspension to each well at a final concentration of approximately 10⁶ CFU/mL. The final concentration of the EO was between 1 and 0.015% (v/v). Plates were incubated at 37°C for 18 h. After incubation, 10 μ L of resazurin was added to each well to assess bacterial growth. After further incubation at 37°C for 2 h, the MIC was determined as the lowest EO concentration that prevented a change in resazurin color. Bacterial growth was detected by reduction in blue dye resazurin to pink resorufin. A control was carried out to ensure that, at the concentrations tested, the EO did not cause a colour change in the resazurin. Experiments were performed in triplicates.

2.3.3. Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponding to the lowest concentration of the EO yielding negative subcultures after incubation at appropriate temperature for 24h, was determined in broth dilution tests by sub-culturing 10 μ L from negative wells on plate count agar (PCA) medium. All the tests were performed in triplicates [15].

2.4. Mechanisms of antibacterial action

2.4.1. Antibacterial Kinetics assay

The growth curve assay was used to investigate the bactericidal effects of the essential oil. Bacteria were treated with the EO at MIC, 2×MIC, MIC/2 the control containing only DMSO (1%). Then the bacteria were cultivated at 37 °C for 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 h, respectively. At selected time intervals, the measure of optical density of supernatants was determined by UV-Vis spectrophotometer. All measurements were carried out in triplicate. Through the assay above, the growth curve of *E. coli* and *B. subtilis* was ordered, the time as the horizontal axis (0 h to 24 h), the OD₆₀₀ of supernatant as the vertical axis [18].

2.4.2. Cell membrane integrity

2.4.2.1. Leakage of DNA and RNA through the bacterial membrane

The integrity of cell membrane could be monitored by the release of cytoplasmic constituents of the cell [19]. The experiments were designed as follows: the bacteria were incubated in NB medium at 37 °C for 12 h. Logarithmic growth phase cells of bacteria was treated with the essential oil at 1×MIC, 2×MIC and MIC/2 value except the control. Then the samples were incubated at 37 °C 24 h. The samples were then immediately centrifuged (10,000 g) for 5 minutes at 4 °C. To determine the amounts of the DNA and RNA released from the cytoplasm, the supernatant was used to measure the optical density at 260 nm.

2.4.2.2. Leakage of proteins through the bacterial membrane

The cell integrity was examined by determining the release of proteins into the supernatant. The concentrations of proteins in supernatants were determined by the Bradford's method [20]. Logarithmic growth phase was estimated for bacteria cells treated with the essential oil at MIC, 2×MIC and MIC/2 except the control, during an incubation period of 24h at 37 °C. Bacteria were separated by centrifugation (10,000 g) for 5 minutes at 4 °C, and the concentrations cytoplasmic proteins was determined in the supernatant by measuring the optical density at 595 nm.

2.4.3. Permeability of cell membrane

The membrane permeability assay was monitored by neighboring nitrobenzene beta-D-galactose glucoside (ONPG) (Ryon) as described by Li et al. [21]. Briefly, bacteria suspension was diluted to 10⁷ CFU/mL. Then ONPG (25mmol/mL) and OCEO were added to the suspension, the final concentrations of EOs were MIC, 2×MIC and MIC/2. Physiological saline was used as control. Inoculated suspension was incubated at 37 °C and samples were collected at 0, 1, 2, 4 and 8 h, respectively. The absorbance of sample supernatant was measured by spectrophotometer at 420 nm.

2.4.4. Anti-quorum sensing activity

Anti-QS activity of OCEO was carried out by the measure of biofilm inhibition (the major phenotype of quorum sensing). The biofilm formation assay was performed in 96-well polystyrene plates as previously reported by several studies [22, 23]. An overnight culture of *E. coli* and *B. subtilis* was diluted with LB broth and grown for another 4 hour. After addition of different concentrations of OCEO (1×MIC, 2×MIC

and MIC/2), 100 μ L aliquots (10^7 CFU/mL) of culture were inoculated into the wells of the microtiter dishes and incubated for 24 h at 37 °C. Thereafter, we have removed the medium and added 100 μ L crystal violet 1% (w/v), dissolved in 95% ethanol, to each well. Following staining at room temperature for 20 min, the dye was removed and the wells were washed thoroughly with sterile water. For quantification of attached cells the bound crystal violet was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the absorbance was determined at 570 nm. The absorbance was measured at 570 nm to quantify total biofilms formation. The well without EOs as considered as negative control for biofilm inhibition [24, 25].

3. Results

3.1. Antibacterial effect, MIC and MBC

OCEO at three phenological stages (vegetative, flowering and post-flowering) were tested for their antibacterial activity in our previous study [15]. The results showed an interesting antibacterial activity (Table 2). Diameter of inhibition values showed that OCEO had a broader spectrum of antibacterial inhibition than those proved by Chloramphenicol and streptomycin used as positive controls. The MIC and MBC values ranged between 0.5 and 0.0312 % (v/v). The EO at vegetative and flowering stage had similar MIC and MBC inhibition values against *E. coli* and *B. subtilis*, whereas the EO at post-flowering stage showed lowest MIC and MBC values.

3.2. Antibacterial mechanisms

3.2.1. Antibacterial Kinetics of essential oils

OCEO were tested against the kinetic of bacterial growth of *E. coli* and *B. subtilis*. The growth curves of *E. coli* and *B. subtilis* affected by the EO from *O. compactum* are presented in figure 1 and figure 2, respectively. As summarized, OCEO proved the reduction in bacterial growth of *E. coli* and *B. subtilis*, with all used concentrations. For *E. coli*, OCEO at flowering stage (Fig. 1B) showed significant inhibition on kinetic growth of *E. coli* when treated with 2×MIC, MIC and MIC/2. This oil affects the growth of bacteria at different phases. For *B. subtilis*, the best inhibition of bacterial growth was obtained significantly with OCEO at post-flowering stage (Fig. 2C).

3.2.2. Cell membrane integrity

3.2.2.1. Leakage of DNA and RNA

Further antibacterial action of OCEO at three phenological stages against the *E. coli* and *B. subtilis* was confirmed using the assay of DNA and RNA Leakage through the bacterial membrane. The disruption of membrane was determined by the measurement of cell constituents release (i.e. DNA and RNA) by assessing the absorbance at 260 nm in the supernatant of bacterial culture treated with OCEO at three phenological stages. The results, summarized in Figure 3A and 3B, indicated that for bacteria exposed to OCEO at three phenological stages, the cell constituent's release (DNA and RNA) increased significantly in EO concentrations depending manner.

OCEO at the flowering and vegetative stage induced important release of genetic materials from *E. coli* (Figure 3A). The OD₂₆₀ of supernatant from *E. coli* treated with OCEO at MIC/2 concentration were 0.25 ± 0.02 , 0.17 ± 0.01 , and 0.11 ± 0.01 for vegetative, flowering and post-flowering stages respectively. After the treatment by MIC concentration, genetic material release is more interestingly. At high concentration (2×MIC) of OCEO induced important leakages of DNA and RNA from *E. coli* with DO values of 0.67 ± 0.02 , 0.79 ± 0.03 and 0.57 ± 0.01 respectively at vegetative, flowering and post-flowering stage. The post-flowering and vegetative stage of OCEO induced the best leakages of DNA and RNA from *B. subtilis* (Figure 3B). The leakage of DNA and RNA from *B. subtilis* treated with various concentrations (2×MIC, MIC and MIC/2) of OCEO at three phenological stages also shows an increase in genetic materials leakage with the increase of OCEO concentration.

3.2.2.2. Leakage of proteins through the bacterial membrane

As shown in Figure 4A and 4B, OCEO at three phenological stages oil could enhance the leakage of proteins through the membrane of *E. coli* and *B. subtilis*. For *E. coli*, OCEO at flowering and vegetative stages were the most actives (Figure 4A). Indeed, the leakage amount of proteins from *E. coli* treated with OCEO at flowering stage was 5.47 ± 0.21 μ g/mL (2×MIC), 3.16 ± 0.23 μ g/mL (1×MIC) and 2.62 ± 0.14 μ g/mL (MIC/2), respectively. While, the leakage amount of proteins from the bacteria treated with OCEO at vegetative stage were 5.05 ± 0.3 μ g/mL (2×MIC), 3.07 ± 0.29 (1×MIC) and 2.57 ± 0.22 μ g/mL (MIC/2), respectively. These amounts from *E. coli* treated were stronger than those obtained with the leakage amount of proteins (0.53 ± 0.2 μ g/mL) from *E. coli* without treatment (control) (Figure 4A). Therefore, the cells of *B.*

subtilis importantly released proteins before its exposure to OCEO at post-flowering stages and vegetative (Figure 4B). Indeed, the leakage amount of proteins from *B. subtilis* treated with OCEO at post-flowering stage was 5.25 ± 0.23 $\mu\text{g/mL}$ ($2 \times \text{MIC}$), 4.39 ± 0.15 $\mu\text{g/mL}$ ($1 \times \text{MIC}$) and 3.02 ± 0.14 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{MIC}/2$), respectively. While, the leakage amount of proteins from the bacteria treated with OCEO at vegetative stage were 4.45 ± 0.22 $\mu\text{g/mL}$ ($2 \times \text{MIC}$), 3.87 ± 0.28 ($1 \times \text{MIC}$) and 2.56 ± 0.18 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{MIC}/2$), respectively. These amounts from *B. subtilis* treated were higher than this that obtained with the amount of leaking proteins (0.83 ± 0.19 $\mu\text{g/mL}$) from *B. subtilis* without treatment (control). Moreover, the leakage of proteins from *E. coli* and *B. subtilis* cells either treated with OCEO increased in concentration dependent manner.

3.2.3. Permeability of cell membrane

Further antibacterial mode of action of OCEO at three phenological stages against *E. coli* and *B. subtilis* was confirmed using the assay of cell membrane permeability. The membrane permeability of bacteria was measured by the ONP subtract. The obtained results of the effects of OCEO against membrane permeability are summarized in figure 5 (5A, 5B and 5C) and figure 6 (6A, 6B and 6C). As indicated, the results showed that when treated with OCEO, absorbance values of ONP in treated bacteria increased directly after the addition of OCEO at $2 \times \text{MIC}$ and MIC concentrations and it also increased by increasing the time of exposure and OCEO concentration. It means that the permeability of *E. coli* and *B. subtilis* membrane would be increased, which caused the leakage of intracellular ingredients.

3.2.4. Anti-quorum sensing activity

The anti-quorum sensing effect of OCEO against *E. coli* and *B. subtilis* was measured by the capacity of OCEO to inhibit the initial bacteria cell attachment (biofilm inhibition). Results of inhibition of bacteria attachment by OCEO at three concentrations ($2 \times \text{MIC}$, MIC and $\text{MIC}/2$) were presented in table 3. As summarized, OCEO at vegetative and post-flowering stages seem to inhibit (98.32 and 87.48% inhibition activity respectively) bacteria cell attachment of *B. subtilis* at $2 \times \text{MIC}$, while the percentage of biofilm formation by OCEO at flowering stage was moderate (Table 3). *E. coli* was more resistant than *B. subtilis* as observed and proved by lower percentage inhibition values. The inhibition percentages of biofilm formation were obtained at $2 \times \text{MIC}$ concentration of OCEO at vegetative (34.06%) and post-flowering stages (37.94%).

Discussion

Bacteria have a particular growth period characterized by an important phase: exponential phase. The time required to reach this phase depends on the micro-organism and culture medium [26, 27]. To reveal the ability of OCEO to lower the growth rate at the exponential level, we studied their action at different time points in order to show the rate of growth reduction. The study of bacterial inhibition through growth kinetics is a very useful indication of the level of antibacterial action of the tested product. This gives important suggestions on the bacterial recalcitrance with respect to a product according to its phase of growth. Indeed, the action of antibacterial agents should be evaluated on the phase of exponential growth, phase for which the bacteria has a maximum growth rate, thus revealing the *in vivo* life state of the bacterium under the conditions of pathology. In our work, EOs showed significant effects on the kinetics of bacterial growth of *B. subtilis* and *E. coli*. Indeed, at sub-inhibitory concentrations ($2 \times \text{MIC}$), OCEO inhibited the total growth (bactericidal action) of *B. subtilis* and *E. coli*. This result thus confirmed the bactericidal effect at MIC values. This action was recorded even in the exponential phase, which demonstrates the high bactericidal power of these tested oils. The decrease in cell viability of the tested strains indicates growth blockage accompanied by cell lysis. Other studies have revealed an important inhibition of the growth kinetics of *E. coli* and *B. subtilis* by OCEO [16].

The cell membrane of bacteria is a barrier of selective permeability which organizes exchanges between the intra and extracellular environment by providing an intracellular environment suitable for the various vital processes. Moreover, the loss of this phenotype is often identified as an indicator of cell death [28]. Moreover, the bacterial cytoplasmic membrane provides a permeability barrier to the access of small ions such as K^+ , Na^+ and H^+ , which are essential to facilitate cell membrane functions, maintain enzyme activity and keep the normal metabolism [29]. The impermeability to small ions is sustained and managed by structure and chemical compositions of its membrane. Maintenance of ion homeostasis is of great importance to maintain the energy status of the cell as it is significant to energy relevant processes such as solute transport, control of metabolism, management of pressure and motility [30]. Hence, even relatively minor variations of the structure of membranes can adversely affect cell metabolism and result in bacteria death [31].

Several techniques are used to evaluate the membrane permeability [16]. In our study we opted for the use of the β -D-galactose glucoside (ONPG) method. The penetration of this substrate indicated that bacteria lose their capacity to control molecule penetration. The results indicated that OCEO increased the membrane permeability of two tested strains, in particularly for *B. subtilis*. The recalcitrance of gram-positive bacteria is related to the nature of the complex cell wall that prevents the penetration of antimicrobial agents [1]. Moreover, the loss of permeability is remarkably obtained with OCEO at flowering stage (rich in carvacrol) and vegetative stage (rich in carvacrol and thymol) compared with OCEO at post-flowering stage (very rich in thymol) [15]. This clearly shows the ability of carvacrol to cross the cell membrane; the property that was long suggested by several works [32, 33, 34].

Generally, EOs and their constituents are characterized by a high hydrophobicity, which enables them to partition in the lipids of the bacterial cell membrane and mitochondria, disturbing the structures and rendering them more permeable [35]. Leakage of ions and other cell contents can then occur [30, 36]. These results may be attributed to the carvacrol and thymol. Indeed, other studies showed that the antimicrobial effect of thymol and carvacrol is attributed to the perturbation of the lipid fraction of the bacterial membrane resulting in the increase of membrane permeability [37].

The integrity of the cytoplasmic membrane is a critical factor to bacteria growth. Researchers have reported that the evaluation of cell leakage markers including absorbance at 260 nm for nucleic acid and the determination of proteins are indicators of membrane integrity [38]. Nucleic acids and proteins provide major structural functions and they are also involved in the transfer of cellular information in bacteria [39].

The present study indicated that OCEO at flowering stage (rich in carvacrol) could act on the cytoplasmic membrane of *E. coli*, thus affecting the integrity of cytoplasmic membrane, while the cell membrane of *B. subtilis* was strongly affected by OCEO at post-flowering stage (rich in thymol). Therefore, OCEO at three phenological stages decreased the content of cellular DNA, RNA and proteins by permeating and disrupting cell membrane. The results indicated that the irreversible damage to the cytoplasmic membranes might occur, which lead to the loss of cell constituents such as nucleic acid and proteins and to cell death (Figure 7). Moreover, our results are in concordance with other studies that have proved that the damage of cytoplasmic membranes of bacteria treated by EOs lead to the loss of large molecules (DNA and RNA) and some proteins [29, 40].

However, it should be noted that OCEO at vegetative and flowering stages caused a greater loss of integrity of *E. coli*, while OCEO at post-flowering stage is shown to be more bactericidal against *B. subtilis*. This result depends, certainly, on the major active compounds present in each EO. In a previous work, Xu et al. [32] showed that carvacrol induced a bactericidal action against *E. coli*. The mechanism associated with this action has been related to the perturbation of the potential of the membrane follows to a loss of its permeability. Other studies have also shown the antibacterial mechanisms of carvacrol against several bacterial including *E. coli* [41, 42]. The carvacrol inhibited the efflux pump and down-regulated some gene expressions. On the other hand, the antibacterial action could be attributed to other molecules participating in the antibacterial effect [1].

In addition to their activities on the cell membrane, the EOs may affect higher levels of regulation in bacteria. Indeed, bacteria coordinate their pathogenesis by communicating with each other through a communication system called quorum sensing. This system triggers certain specific phenotypes such as the formation of biofilms [17]. We have thus studied the action of OCEO against the QS by inhibiting the biofilm formation using the violet crystal as indicator. Indeed, the attachment of the bacteria to each other and to the neighboring surfaces requires the formation of the biofilms. Biofilm is therefore an associative network of a bacterial community whose expression and functioning are governed by the QS [17]. To reveal the action of OCEO against quorum sensing, their ability to inhibit the biofilm formation was tested. OCEO inhibited the biofilm formation of *E. subtilis* importantly than those of *E. coli*. In addition, OCEO at post-flowering stage (rich in thymol) showed a very important anti-biofilm action, in particular its almost total inhibition against *B. subtilis* with sub-inhibitory concentrations. The inhibition of QS in *B. subtilis* indicates the presence of cells that have maintained the membrane integrity, but have lost the ability to form colonies due to lack of communication between them. Therefore *B. subtilis* underwent cell lysis after a minimal maintenance state, which lead to lysis of the cells after a long period incubation (Figure 8). This result suggests that thymol (the main compounds of OCEO at post-flowering stage) has anti-biofilm action against *B. subtilis*. Indeed, Raein et al. [43] showed that thymol and carvacrol strongly inhibited the biofilm formation of bacilli. In addition, thymol demonstrated anti-biofilm effects related to QS inhibition of other bacteria such as *Salmonella enteric* [44, 45]. Recently, several studies have focused on anti-QS effects of EO [46, 47, 48]. Indeed, the QS regulate several function, in particular this implication in biofilm formation,

resistance to antibiotics and pathogenicity. The inhibition of biofilm formation by EOs is certainly attributed to bioactive molecules that have specific target on QS signaling pathways [17]. Thus, EOs and their active compounds could inhibit signaling pathways of QS that are implicated of biofilm formation [49, 50].

Conclusion

The trend of using EOs as natural antimicrobial agents is, therefore, gradually becoming an attractive approach in the field of drug discovery and food preservation. Current researches have explored the use of OCEO as a natural antibacterial agent and gave insight into its mode of action on *E. coli* and *B. subtilis* as representatives of Gram-positive and Gram-negative bacteria. OCEO exhibited significant antibacterial activity against *E. coli* and *B. subtilis*. The mechanism of action against *E. coli* may be due to the irreversible damage caused OCEO on the cell wall and membrane, leading to the leakage of proteins and 260 nm absorbing materials (DNA and RNA). However, the mechanism of action of OCEO against *B. subtilis* seems to be related to the QS deregulation. However, because OCEO have many kinds of chemical constituents, it seems impossible that there is only one antibacterial mechanism or that only one component is responsible for the antibacterial activity. Therefore, further researches such as separating the new chemical compounds, *in vivo* antibacterial activity and transmission electron microscopy are necessary to fully investigate the antibacterial mechanism of OCEO against *E. coli* and *B. subtilis*.

References

- [1] A. Bouyahya, Y. Bakri, A. Et-Touys, A. Talbaoui, A. Khouchlaa, S. Charfi, J. Abrini, N. Dakka, Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie*. (2017). doi: 10.1007/s10298-017-1118-z.
- [2] M. Lahlou, The success of natural products in drug discovery. *Pharmacol Pharm* 4 (2013) 17-31.
- [3] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils-a review. *Food. Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446-475.
- [4] A. Bouyahya, A. Et-Touys, Y. Bakri, A. Talbaoui, H. Fellah, J. Abrini, N. Dakka, 2017. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microb Pathog.* 111 (2017) 41-49.
- [5] A. Bouyahya, Y. Bakri, E.O. Khay, F. Edaoudi, A. Talbaoui, A. Et-Touys, J. Abrini, N. Dakka, Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: A review. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 7 (2017) 57-64.
- [6] A. Merzouki, F. Ed-derfoufi, J. Molero Mesa, Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district NW Morocco. *Fitoterapia*. 71 (2000) 278-307.
- [7] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Et-Touys, Y. Bakri, N. Dakka, Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities. *Europ J Integ Med.* 13 (2017) 9-25.
- [8] M. Hachi, O. Benkhniue, T. Hachi, M. El Bouhaddioui, I. Bouabadi, A. Rochdi, Contribution to the ethnobotanical study of antidiabetic medicinal plants of the Central Middle Atlas region (Morocco). *Lazaroa*. 37 (2016) 135-44.
- [9] J. Fakchich, M. Elachouri, Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J Ethnopharmacol.* 28 (2014) 76-87.
- [10] H. Orch, L. Zidane, A. Douira, Ethnobotanical study of the plants used in the treatment of the digestive diseases by the riverine population of the forest of Izarène. *Int J Recent Sci Res.* 8 (2017) 15213-19.
- [11] S. Bouhdid, SN. Skali, M. Idaomar, J. Zhiri, A. Baudoux, J. Abrini, Antibacterial and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil. *Afr. J. Biotech.* 7 (2008) 1563-1570.
- [12] W. Ouedrhiri, M. Balouiri, S. Bouhdid, S. Moja, F. Ouazzani Chahdi, M. Taleb, Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: optimization of their antibacterial effect. *Ind Crops Prod.* 89 (2016) 1-9.
- [13] K. Aboukhalid, A. Lamiri, M. Agacka-Mołodoch, T. Doroszewska, A. Douaik, M. Bakha, Chemical polymorphism of *Origanum compactum* grown in all natural habitats in Morocco. *Chem Biodivers.* 13 (2016) 1126-39.

- [14] K. Aboukhalid, C. Al Faiz, A. Douaik, M. Bakha, K. Kurs, M. Agacka- Mołdoch, Influence of environmental factors on essential oil variability in *Origanum compactum* Benth. growing wild in Morocco. Chem Biodiv. (2017). doi: 10.1002/cbdv.201700158.
- [15] A. Bouyahya, N. Dakka, A. Talbaoui, A. Et-Touys, H. El-Boury, J. Abrini, Y. Bakri, Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum* Benth). Indus. Crop. Prod. 108 (2017) 729–737.
- [16] S. Bouhdid, J. Abrini, A. Zhiri, M.J. Espuny, A. Manresa, Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. J. Appl. Microbiol. 106 (2009) 1558–1568.
- [17] A. Bouyahya, N. Dakka, A. Et-Touys, J. Abrini, Y. Bakri, Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. Asian. Pac. J. Trop. Med. 10 (2017) 729–743.
- [18] D. Zhou, D.M. Wang, L.N. Yang, Z.H. Liu, Y.W. Zhang, A Modified and Improved Assay Based on Microbial Test System (MTS) to Evaluate Antioxidant Activity. Food Anal. Methods. (2015) .DOI 10.1007/s12161-015-0266-8.
- [19] C.Z. Chen, L.C. Stuart, Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. Biomaterials. 23 (2002) 3359–3368.
- [20] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [21] L. Li, X. Song, R. Jia, X. Zhou, Y. Zou, L. Yin, G. Yue, G. Ye, C. Lv, W. Shi, Y. Fu, The antibacterial activity and action mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis* in vitro. Microbiol Res. 186–187 (2016) 139–45.
- [22] J.C. Taganna, J.P. Quianico, R.M.G. Perono, E.C. Amor, W.L. Rivera, Tannin-rich fraction from Terminalia catappa inhibits quorum sensing (QS) in Chromobacterium violaceum and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylytic activity in Pseudomonas aeruginosa. J. Ethnopharmacol. 134 (2011) 865–871.
- [23] G. O'Toole, R. Kolter, Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 28 (2002) 449–461.
- [24] J.H. Lee, J.H. Park, H.S. Cho, S.W. Joo, M.H. Cho, J. Lee, Antibiofilm activities of quercetin and tannic acid against Staphylococcus aureus. Biofouling. 29 (2013) 491–499.
- [25] M.M. Bazargani, G. Rohloff, Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against Staphylococcus aureus and Escherichia coli biofilms. Food. Control. 61 (2016) 156–164.
- [26] S.E. Rowe, B.P. Conlon, L. Keren, K. Lewis, Persisters: Methods for Isolation and Identifying Contributing Factors--A Review. Methods Mol Biol. 1333 (2016) 17–28.
- [27] I.A. Swinnen, K. Bernarts, E.J. Dens, Geeraerd AH., Van Impe JF., 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. Int J Food Microbiol. 94, 137–159.
- [28] E.R. Simões, E.A. Santos, M.C. de Abreu, J.D.N. Silva, N.M. Bunes, M.P. de Costa, O.D. Pessoa, P.M. Ferreira, Biomedical properties and potentiality of Lippia microphylla Cham. and its essential oils. J Intecult Ethnopharmacol. 4 (2015) 256–263.
- [29] W.D. Diao, O.P. Hu, H. Zhang, J.G. Xu, Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (Foeniculum vulgare Mill.). Food Control. 35 (2014) 109–116.
- [30] S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham, J.E. Gustafson, J.R. Warmington, S.G. Wyllie, Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. Molecules. 6 (2001) 87–91.
- [31] A. Sharma, V.K. Bajpai, K.H. Baek, Determination of antibacterial mode of action of Allium sativum essential oil against foodborne pathogens using membrane permeability and surface characteristic parameters. J. Food. Safety, 33(2013)197–208.
- [32] J. Xu, F. Zhou, R.S. Pei, N. Xu, The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli. Lett Appl Microbiol. 47 (2008) 174–179.

- [33] S. Mooyottu, G. Flock, Venkitanarayanan K, Carvacrol reduces *Clostridium difficile* sporulation and spore outgrowth in vitro. *J Med Microbiol.* 66 (2017)1229-1234.
- [34] S.E.C.B. Vasconcelos, H.M. Melo, T.T.A. Cavalcante, FEAC Junior, M.G. de Carvalho, FGR. Menezes, O.V. de Sousa, R.A. Costa, *Plectranthus amboinicus* essential oil and carvacrol bioactive against planktonic and biofilm of oxacillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complement Altern Med.* 17(2017) 462.
- [35] J. Sikkema, J. De Bont, B. Poolman, Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269(1994) 8022-8028.
- [36] A. Ultee, M. Bennik, R. Moezelaar, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002)1561-1568.
- [37] CG. Sokolik, R. Ben-Shabat-Binyamini, A. Gedanken, J.P. Lelouche. Proteinaceous microspheres as a delivery system for carvacrol and thymol in antibacterial applications. *Ultrasonics Sonochemistry.* 41 (2018) 288-296.
- [38] V.K. Bajpai, A. Sharma, K.H. Baek, Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control.* 32 (2013) 582-590.
- [39] Y.B. Zhang, X.Y. Liu, Y.F. Wang, P.P. Jiang, Y.Q. Siew, Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food. Control.* 59 (2016) 282-289.
- [40] A. Talbaoui, N. Jamaly, M. Aneb, A. Il Idrissi, M. Bouksaim, S. Gmouh, S. Amzazi, A. Benjouad, Y. Bakri, Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *J Med Plants.Res.* 6 (2012) 4593-600.
- [41] S.D. Patil, R. Sharma, S. Srivastava, N.K Navani, R. Pathania, Downregulation of *yidC* in *Escherichia coli* by antisense RNA expression results in sensitization to antibacterial essential oils eugenol and carvacrol. *PLoS One.* 8 (2013) 57370.
- [42] H. Miladi, T. Zmantar, Y. Chaabouni, K. Fedhila, A. Bakhrouf, K. Mahdouani, K. Chaieb, Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microb Pathog.* 99 (2016) 95-100.
- [43] P. Raein, T. Poursak, M.Y. Memar, N. Alizadeh, E. Zeinalzadeh, M. Asgharzadeh, H.S. Kalif HS., Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase-producing Gram negative bacilli. *Cell Mol Biol.* 63 (2017) 108-112.
- [44] H. Miladi, T. Zmantar, B. Kouidhi, Y. Chaabouni, K. Mahdouani, A. Bakhrouf, K. Chaieb, Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains to nalidixic acid. *Microb Pathog.* 104 (2017) 56-63.
- [45] A. Nostro, R. Scaffaro, M. D'Arrigo, L. Botta, A. Filocamo, A. Marino, G. Bisignano, Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96 (2012) 1029-1038.
- [46] A. Luís, A. Duarte, J. Gominho, F. Domingues, A.P. Duarte. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Ind Crops Prod* 79 (2016) 274-282.
- [47] K. Myszk, M.T. Schmidt, M. Majcher, W. Juzwa, M. Olkiewicz, K. Czaczyk. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *Intern. Biodet Biodeg.* 114 (2016) 252-259.
- [48] BD. Oliveira, A.C. Rodrigues, BMI. Cardoso, ALCC. Ramos, M.C. Bertoldi, J.G. Jason Guy Taylor, Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Ind Crop Prod* 84 (2016) 59-66.
- [49] M.A. Szabo, G.Z. Varga, J. Hohmann Schelz, E. Szegedi, L. Amara, J. Molnar, Inhibition of quorum-sensing signals by essential oils. *Phytothera Res.* 24 (2010) 782-786.
- [50] B. Jaramillo-Colorado, J. Olivero-Verbej, E.E. Stashenko, I. Wagner-Dobler, B. Kunze, Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Nat Prod Res.* 26 (2012) 1075-1086.

Figure Caption

Figure 1: The growth curves of *E. coli* affected by the essential oil from *O. compactum* collected at vegetative stage **(A)**, flowering stage **(B)** and post-flowering stage **(C)**. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

Figure 2: The growth curves of *B. subtilis* affected by the essential oil from *O. compactum* collected at vegetative stage **(2A)**, flowering stage **(2B)** and post-flowering stage **(2C)**. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

Figure 3: Release of 260 nm absorbing genetic material (DNA and RNA) from *E. coli* **(3A)** and *B. subtilis* **(3B)** treated with OCEO at three phenological stages: VS (vegetative stage), FS (flowering stage) and PFS (post-flowering stage). The results are expressed as the absorbance of the sample (treated) – the absorbance of the control (no treated). Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

Figure 4: Leakage of protein from *E. coli* **(4A)** and *B. subtilis* **(4B)** treated with OCEO at three phenological stages: VS (vegetative stage), FS (flowering stage) and PFS (post-flowering stage). The results are expressed as the absorbance of the sample (treated) – the absorbance of the control (no treated). Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

Figure 5: The OD₄₂₀ nm values of ONP measured after the action of OCEO at vegetative stage **(5A)**, flowering stage **(5B)** and post-flowering stage **(5C)** against *E. coli* K12. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

Figure 6: The OD₄₂₀ nm values of ONP measured after the action of OCEO at vegetative stage **(6A)**, flowering stage **(6B)** and post-flowering stage **(6C)** against *E. coli* K12. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=3).

Figure 7: Possible antibacterial mechanisms of OCEO against *E. coli*. *OCEO increased the membrane permeability which induced a disturbance in the membrane integrity justified by the release of cytoplasmic materials such as nucleic acids and proteins. In the end, the loss of membrane integrity led to cell lysis justified by the fall of bacterial growth dynamics.*

Figure 8: Possible antibacterial mechanisms of OCEO against *E. coli*. **(A):** *OCEO inhibited the bacterial growth of B. subtilis by the inhibition of some intercellular communication pathways (oligopeptide of quorum sensing) justified by the inhibition of biofilm formation. The inhibited cells are maintained in a state of minimum viability. During this period, the cells remain isolated without any ability to divide (inhibition of their growth).* **(B):** *The inhibition of B. subtilis growth led to its lysis after some time, which leaked cytoplasmic materials such as nucleic acids and proteins.*

Table 1: Chemical composition of OCEO aerial parts at three phenological stages [15].

Compounds	% of compounds at three phenological stages		
	Vegetative	Flowering	Post-flowering
α -Thujene	1.357	0.879	0.655
α -pinene	0.881	0.684	0.598
1-Octen-3-ol	0.665	0.702	1.40
3-Octanone	0.664	0.695	1.395
β -Myrcene	2.03	1.219	1.077
α -terpinene	2.203	0.617	0.514
<i>P</i> -Cymene	17.815	18.587	19.245
D-limonene	0.526	0.398	0.412
1,8-cineole	1.260	0.342	0.136
γ -Terpinene	17.415	8.717	7.114
Linalool	1.753	1.941	1.969
Terpinen-4-ol	0.780	0.782	1.107
α -terpineol	2.891	3.253	7.359
Thymol	15.324	10.331	38.014
Carvacrol	24.714	43.584	6.398
β -Caryophyllene	1.901	0.607	0.438
Caryophyllene oxide	1.073	2.295	2.821

Table 2: Antibacterial activity of OCEO areal parts at three phenological stages [15].

Bacteria	Vegetative stage			Flowering stage			Post-flowering stage		
	Diameter (mm $\pm$ SD) ^b	MIC	MBC	Diameter (mm $\pm$ SD)	MIC	MBC	Diameter (mm $\pm$ SD)	MIC	MBC
<i>B. subtilis</i> 6633	26 $\pm$ 0.90	0.5	0.5	29 $\pm$ 1.16	0.625	0.625	31 $\pm$ 0.86	0.0312	0.0312
<i>E. coli</i> K12	19 $\pm$ 0.58	0.25	0.25	31 $\pm$ 0.91	0.0625	0.0625	26 $\pm$ 0.73	0.25	0.25

Table 3: Inhibition of biofilm formation

Strains	OCEO	Concentration	% Inhibition of bacteria attachment
<i>E. coli</i>	Vegetative stage	CMI/2	11.52
		CMI	19.23
		2 $\times$ CMI	34.06
	Flowering stage	CMI/2	08.28
		CMI	16.29
		2 $\times$ CMI	22.86
	Post- Flowering stage	CMI/2	14.62
		CMI	26.47
		2 $\times$ CMI	37.94
	Without essential oil		8.72
<i>B. subtilis</i>	Vegetative stage	CMI/2	47.18
		CMI	60.32
		2 $\times$ CMI	87.48
	Flowering stage	CMI/2	26.73
		CMI	45.29
		2 $\times$ CMI	57.93
	Post- Flowering stage	CMI/2	63.47
		CMI	85.05
		2 $\times$ CMI	98.32
	Without essential oil		13.06

Fig. 1a

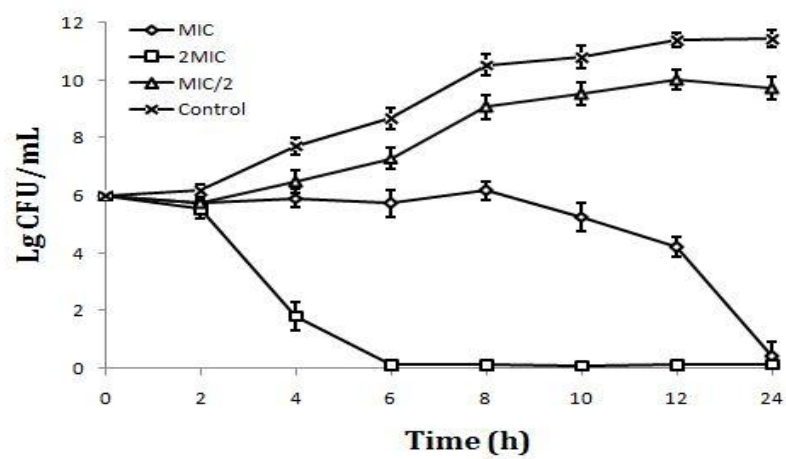


Fig. 1b

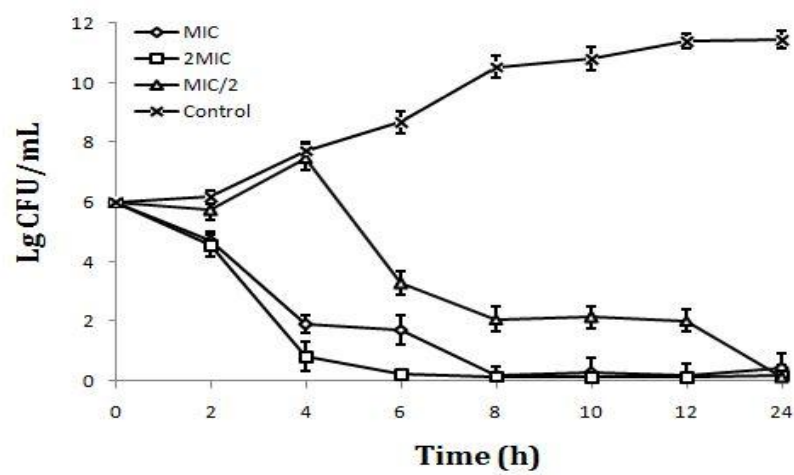


Fig. 1c

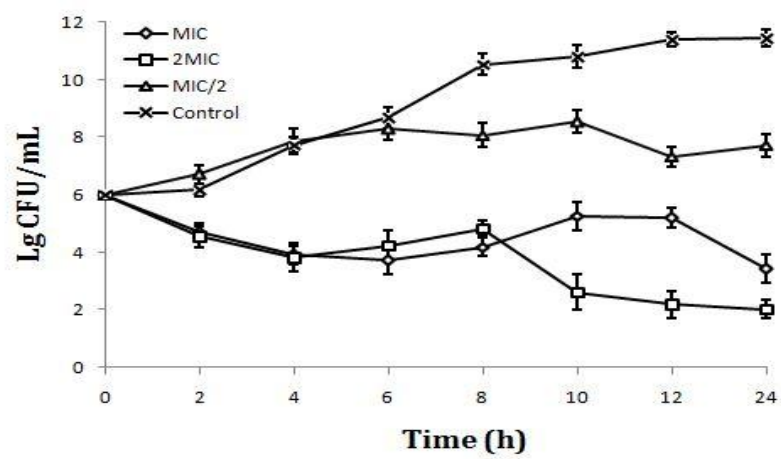


Figure 2a

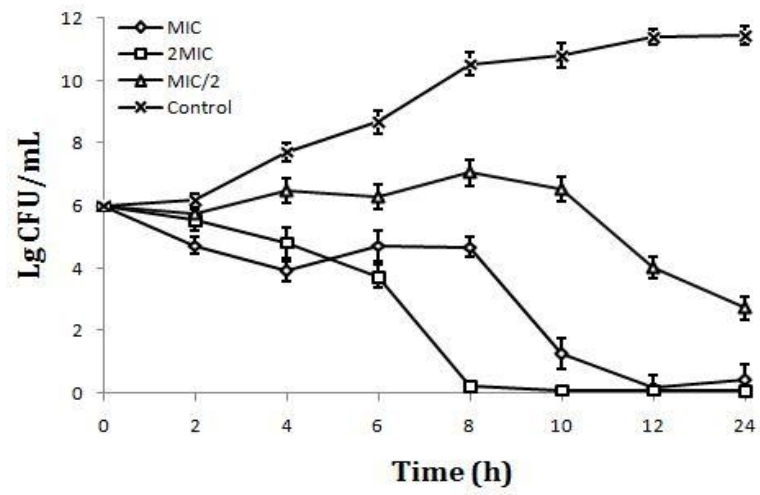


Fig. 2b

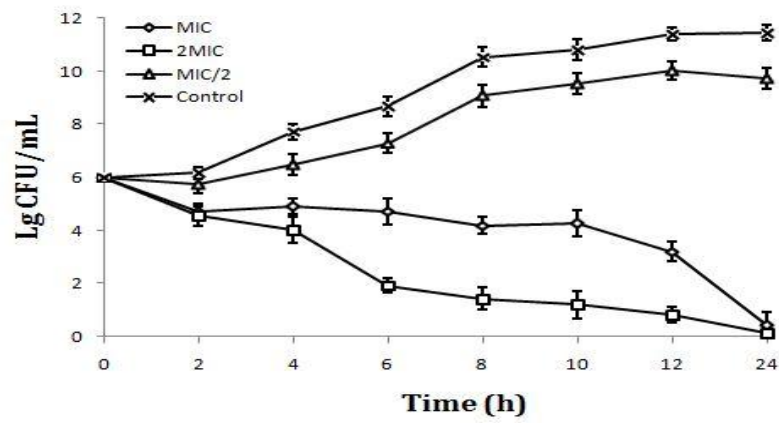


Fig. 2c

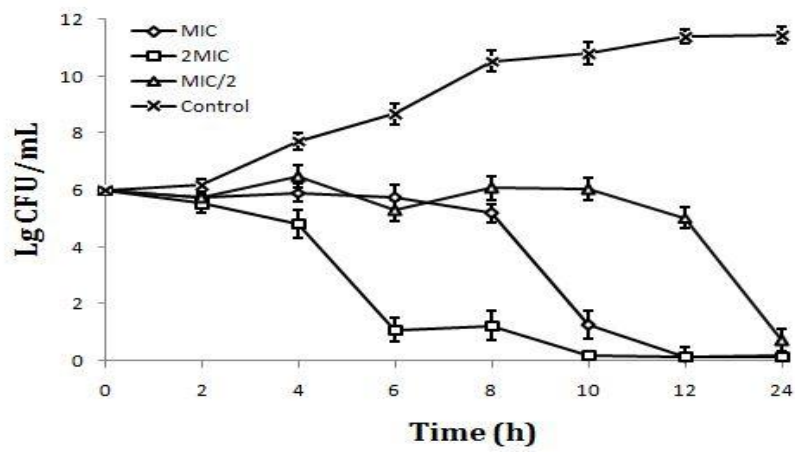


Fig. 3a

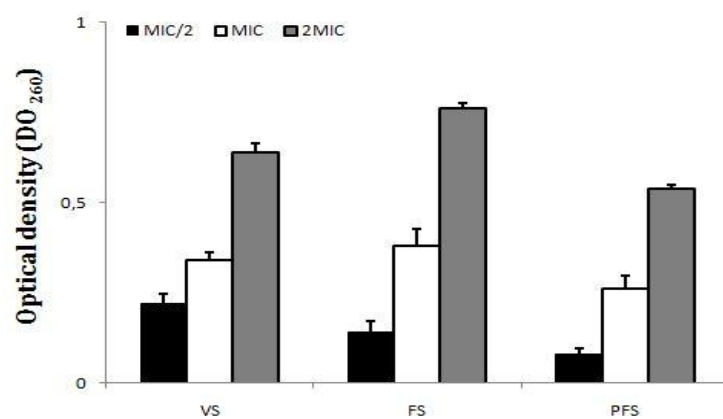


Fig. 3B

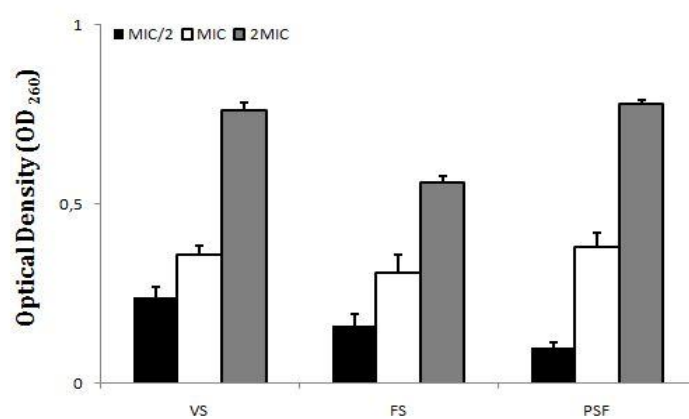


Fig. 4a

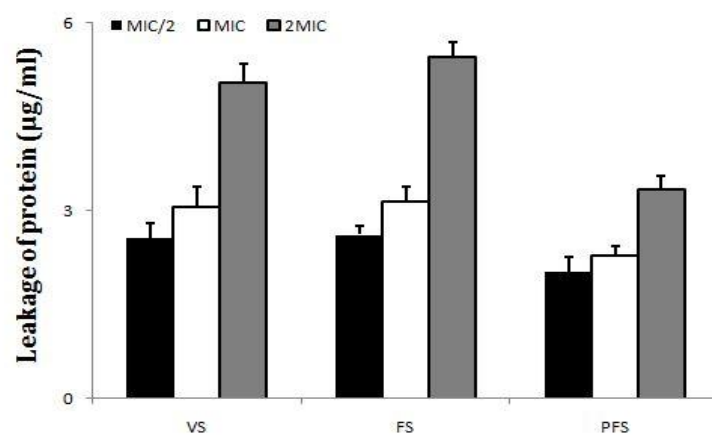


Fig. 4b

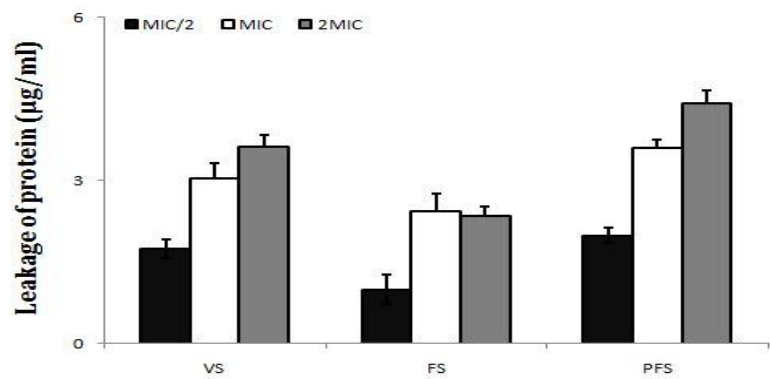


Fig. 5A

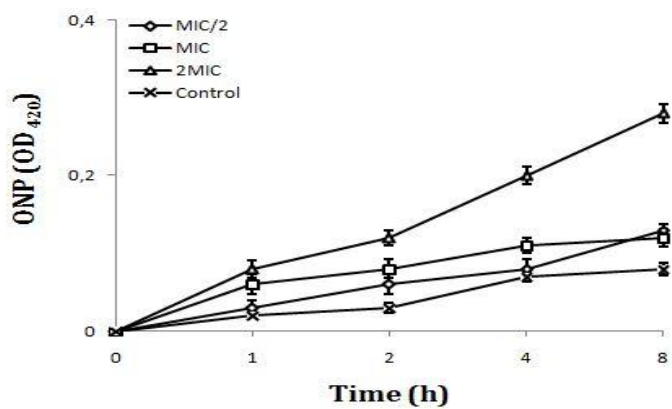


Fig. 5B

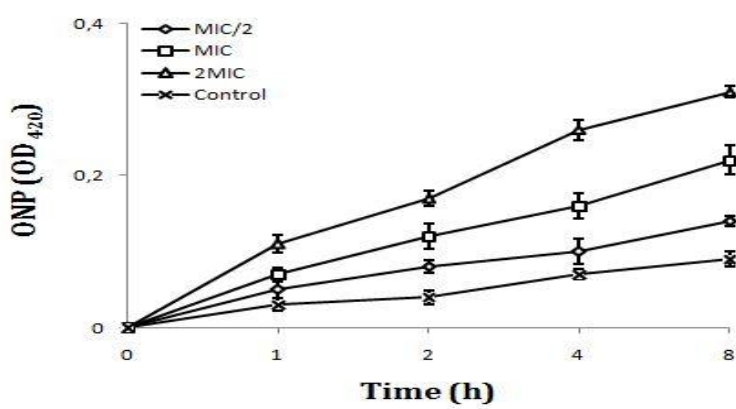


Fig. 5C

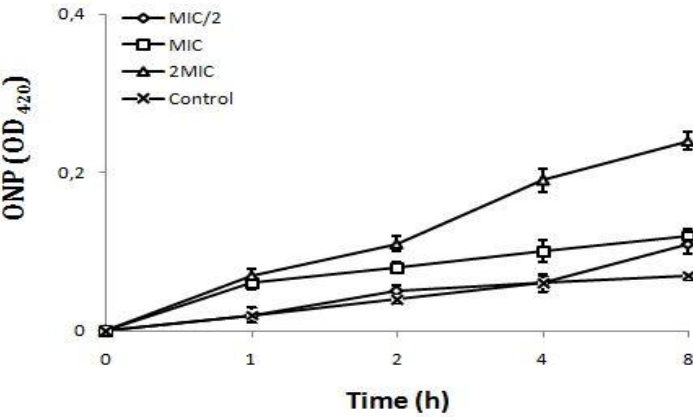


Figure 6A

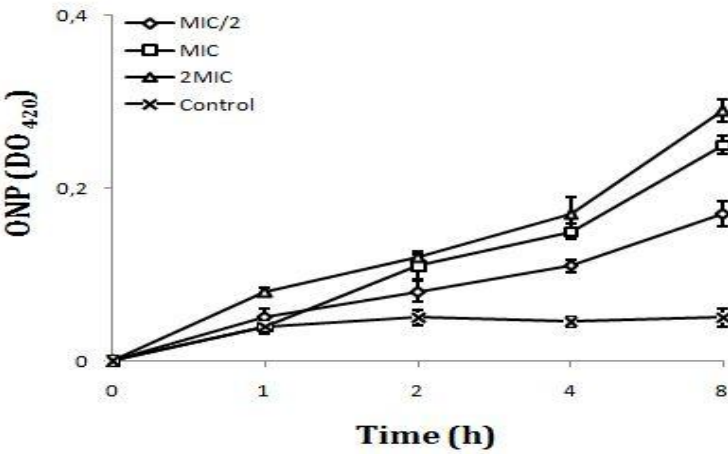


Figure 6B

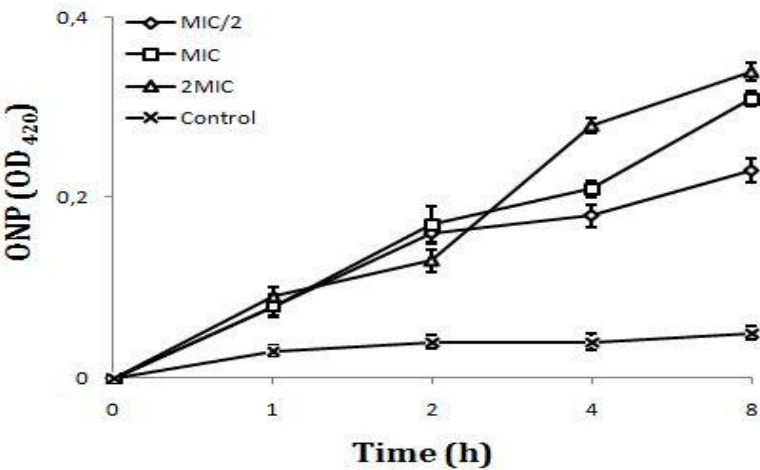


Fig. 6C

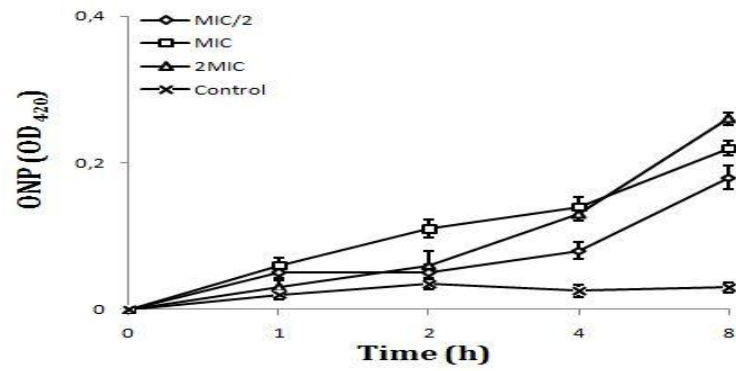


Fig. 7

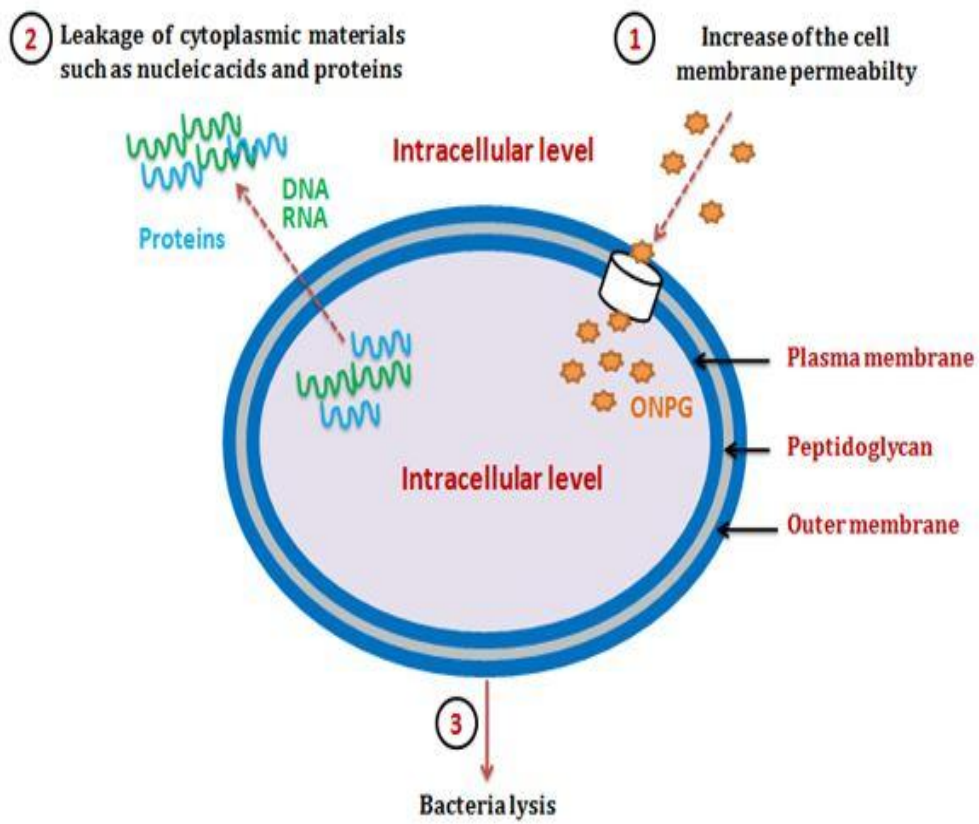


Fig. 8

