



N° d'Ordre : /2020

**Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies**

**Discipline : Biologie**

**Spécialité : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale**

**Laboratoire : Physiologie-Pharmacologie et Santé Environnementale**

## **THESE DE DOCTORAT**

Présentée par

**Yassine EL ATKI**

**Etude des activités biologiques de *Teucrium polium*  
et *Cinnamomum cassia* et évaluation du potentiel synergique  
antibactérien de leurs huiles essentielles combinées avec  
certains antibiotiques ou molécules volatiles**

Soutenue le 02 / 11 / 2020 devant le jury composé de :

<b>Pr. Badiaa Lyoussi</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès</b>	<b>Président</b>
<b>Pr. Younes Filali-Zegzouti</b>	<b>Faculté des Sciences et techniques-Errachidia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Chakib Alem</b>	<b>Faculté des Sciences et techniques-Errachidia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Mourad Er-rasfa</b>	<b>Faculté de médecine et de pharmacie-Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Abdelkader Gourch</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. Mohammed Benyahya</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr. Abdelfattah Abdellaoui</b>	<b>Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>

## Dédicace

*A mes chers parents **Fatima Massou** et **Moha El atki**  
en témoignage de ma reconnaissance pour leur patience, leur amour,  
leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études. Que Dieu leur  
procure une bonne santé et une longue vie.*

*A ma grand-mère **Itou Bakkas** qui m'a beaucoup encouragé toujours,  
que Dieu protège.*

*A mes sœurs **Meryem, Latifa, Hajar et Fatima** et mon frère  
**Abderahim**. Je vous remercie pour votre soutien, votre patience à mon  
égard et votre encouragement. Merci pour la chaleur humaine que vous  
m'apportez au quotidien.*

*A mes chers oncles **Ali et Ahmed** et leurs épouses qui m'ont beaucoup  
soutenu et encouragé pendant toute la période d'étude. Merci pour le  
bonheur que vous m'apportez.*

*A toutes mes tantes et mes oncles.*

*A mes cousines et cousins.*

*A mes chères amis, **Imane, Amal, Fatima, Abdelbasset, Hind,  
Aziza, Kamal, Fatima zohra, Mariam et Soumia**.*

*A tous mes autres amis.*

*A toute ma famille.*

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

## Remerciement

*C'est avec une grande joie que j'ai débuté cette thèse et un léger pincement au cœur que j'en arrive aujourd'hui à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de toutes ces années de travail.*

*Avant toute chose, je remercie **ALLAH** tout puissant pour m'avoir donné la force pour accomplir ce travail.*

*Cette thèse n'aurait été possible sans l'intervention de nombreuses personnes. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements pour leurs soutiens, leurs encouragements et leurs conseils.*

*Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude et mes remerciements à mon directeur de thèse le Professeur **Abdelfattah ABDELLAOUI** pour l'accueil heureux qu'il m'a accordé dans son laboratoire de recherche, pour sa disponibilité, son suivi tout au long de mes années de recherche, ses conseils, son soutien, sa générosité, sa gentillesse, son encouragement et sa confiance en moi tout au long de la préparation de ce travail qui n'aurait pas été le même sans son encadrement.*

*Mes vifs remerciements vont également à madame **Badiaa Lyoussi**, professeur à la faculté des sciences Dhar Mahraz et directrice du laboratoire pharmacologie, physiologie et santé environnemental, qui m'a orienté, m'a soutenu et qui m'a toujours aidé chaque fois que je désirais avancer dans la recherche de différentes solutions. Je la remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse.*

*J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur **Younes Filali-Zegzouti**, professeur à la faculté des Sciences et techniques-Errachidia, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis*

*particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse.*

*Que Monsieur **Chakib Alem**, professeur à faculté des Sciences et techniques Errachidia, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur et de participer au jury de ce travail. Sa grande expérience, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et humaines ont constitué un support permanent à ma réflexion.*

*J'adresse mes profonds remerciements au Professeur **Mourad Er-rasfa** de la Faculté de médecine et de pharmacie-Fès pour avoir accepté d'être rapporteur et de faire partie de mon jury de thèse.*

*Il m'est aussi agréable de remercier Monsieur **Abdelkader Gourchi**, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar Mahraz, Fès, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour les services rendus au cours de la préparation de cette thèse.*

*Je ne saurais oublier le soutien et les encouragements de mes collègues du laboratoire pharmacologie, physiologie et santé environnementale : **Imane Aouam, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Kamal Bouslham, Hind zejli et Aziza Lfitat**, je vous remercie pour votre esprit d'équipe, votre soutien pendant les moments difficiles de ce travail, et Je vous souhaite tous une bonne continuation.*

*Je remercie de tout cœur Mademoiselle **Mariame Najem**, et Monsieur **Abdelbasst Hmidani** qui m'ont fait partager les difficultés et les moments délicats.*

*Je remercie chaleureusement toute ma famille pour leur soutien et leur aide qui n'a pas cessé au cours de ces années de travail.*

*Enfin, mes remerciements iront à toutes les personnes dont l'empreinte restera dans ce travail plus encore dans ma mémoire, pour leurs soutiens, leurs conseils et leurs motivations.*

## RÉSUMÉ

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la valorisation de trois plantes médicinales, largement utilisées par la population marocaine : *Teucrium polium* ssp. *polium*, *Teucrium polium* ssp. *aureum* et *Cinnamomum cassia*. Ainsi, nous avons envisagé une étude des activités antibactériennes, antioxydantes et diurétique des extraits de plantes étudiées.

Les huiles essentielles de ces plantes ont été extraites par hydrodistillation et leur composition chimique a été déterminée par CPG/SM. Les profils chimiques ont montré que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *T. polium* ssp. *aureum* sont : le caryophyllène (19,13 %), le Muurolène (13,02 %) et le  $\tau$ -cadinol, (11,01 %) ; et ceux de *T. polium* ssp. *polium* sont : le 3-carène (16,49 %), le Muurolène (14,03 %) et le  $\alpha$ -pinène (9,94 %). Cependant, la composition chimique de l'huile essentielle de *C. cassia* est dominée par le trans-cinnamaldéhyde (91,01%).

L'activité antibactérienne *in-vitro* des huiles essentielles des trois plantes vis-à-vis sept souches bactériennes multirésistantes, montre que les huiles essentielles testées possèdent un pouvoir antibactérien contre toutes les souches testées.

Le potentiel synergique des huiles essentielles de *T. polium* ssp. *polium* et de *C. cassia* combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles a été évalué par la méthode d'échiquier. Les résultats obtenus montrent que la combinaison de ces huiles essentielles avec la streptomycine, l'ampicilline, le chloramphénicol, le thymol ou le carvacrol présente un effet synergique important vis-à-vis les bactéries multirésistantes principalement celles responsables des infections nosocomiales.

L'activité antioxydante *in-vitro* des huiles essentielles et des extraits non volatils évaluée par quatre méthodes ; ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, FRAP et phosphomolybdène, révèle que les différents extraits testés ont montré une activité antioxydante intéressante, dépendante de leur teneur en composés phénoliques. De même, les huiles essentielles, notamment, celles de *T. polium* ssp. *polium* possèdent un potentiel antioxydant remarquable.

L'effet diurétique des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* et de *T. polium* ssp. *aureum* a révélé que les deux extraits exercent un effet diurétique puissant après l'administration des doses uniques ou répétées (150 mg/kg de poids corporel) chez le rat Wistar. Toutefois, l'effet de l'extrait de *T. polium* ssp. *polium* a été plus puissant que celui de *T. polium* ssp. *aureum*.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude pourrait constituer une justification scientifique de l'usage traditionnel de la germandrée (*T. polium*) et la cannelle (*C. cassia*) par la population marocaine pour traiter diverses maladies.

**Mots clés :** *Teucrium polium*, *Cinnamomum cassia*, huile essentielle, synergie, antibiorésistance, polyphénols, pouvoir antioxydant, effet diurétique.

## ABSTRACT

This thesis is part of a contribution to the valorization of three medicinal plants, widely used by the Moroccan population: *Teucrium polium* ssp *polium*, *Teucrium polium* ssp *aureum* and *Cinnamomum cassia*. Therefore, we envisaged a study the antibacterial, antioxidant and diuretic activities of extracts of these plants.

The essential oils of these plants were extracted by hydrodistillation and their chemical composition was determined by GC/MS. The chemical profiles showed that the majority compounds of the *T. polium* ssp. *aureum* essential oil are: caryophyllene (19.13%), Muurolene (13.02%) and  $\tau$ -cadinol, (11.01%); and those of *T. polium* ssp. *polium* are: 3- carene (16.49%), Muurolene (14.03%) and  $\alpha$ -pinene (9.94%). However, the chemical composition of the essential oil of *C. cassia* is dominated by trans-cinnamaldehyde (91.01%).

The in-vitro antibacterial activity of the essential oils of the three plants against seven multi-resistant bacterial strains shows that these essential oils have antibacterial power against all the strains tested.

The synergistic potential of the essential oils of *T. polium* ssp *polium* and *C. cassia* combined with certain antibiotics or volatile molecules was evaluated by the checkerboard method. The results obtained show that the combination of these essential oils with streptomycin, ampicillin, chloramphenicol, thymol or carvacrol has a significant synergistic effect on multi-resistant bacteria, especially those responsible for nosocomial infections.

The *in-vitro* antioxidant activity of essential oils and non-volatile extracts evaluated by four methods; ABTS+, DPPH-, FRAP and phosphomolybdenum, reveals that the different extracts tested showed an interesting antioxidant activity, depending on their content of phenolic compounds. Similarly, essential oils, especially those of *T. polium* ssp. *polium*, have a remarkable antioxidant potential.

The diuretic effect of the aqueous extracts of *T. polium* ssp. *polium* and *T. polium* ssp. *aureum* revealed that both extracts have a powerful diuretic effect after single or repeated doses (150 mg/kg body weight) in Wistar rats. However, the effect of the *T. polium* ssp. *polium* extract was more potent than that of *T. polium* ssp. *aureum*.

All the results obtained during this study could constitute a scientific justification for the traditional use of Germander (*T. polium*) and cinnamon (*C. cassia*) by the Moroccan population to treat various diseases.

**Key words:** *Teucrium polium*, *Cinnamomum cassia*, essential oil, synergy, antibiotic resistance, polyphenols, antioxidant power, diuretic effect.

# SOMMAIRE

Dédicace .....	i
Remerciement .....	ii
Résumé.....	iv
Abstract .....	v
Liste des figures .....	7
Liste des tableaux .....	9
Liste des abréviations .....	11
Liste des publications .....	12
Introduction générale .....	14
<b>Partie I: Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1 : Plantes aromatiques et médicinales .....</b>	<b>17</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Plantes aromatiques et médicinales au Maroc.....</b>	<b>18</b>
<b>3 Métabolites secondaires des plantes.....</b>	<b>19</b>
3.1 Classification des métabolites secondaires.....	19
3.2 Les composés phénoliques .....	19
3.3 Les saponines.....	22
3.4 Les alcaloïdes .....	22
<b>4 Les huiles essentielles.....</b>	<b>22</b>
4.1 Définition des huiles essentielles.....	22
4.2 Procédés d'extraction des huiles essentielles .....	23
4.3 Méthodes d'analyses chimiques des huiles essentielles .....	23
4.4 Composition chimique des huiles essentielles.....	24
4.5 Variation de la Composition chimique des huiles essentielles.....	25
4.6 Toxicité des huiles essentielles .....	25
<b>Chapitre 2: Monographie des plantes étudiées .....</b>	<b>26</b>
<b>1 Teucrium polium L.....</b>	<b>26</b>
1.1 Généralités .....	26
1.2 Habitat et répartition géographique .....	26
1.3 Description botanique.....	26
1.4 Taxonomie et systématique .....	26
1.5 Utilisation en médecine traditionnelle.....	27
1.6 Les propriétés pharmacologiques .....	27
1.7 Données phytochimiques.....	28

1.8	Données toxicologiques.....	28
<b>2</b>	<b>Cinnamon Cassia</b> .....	<b>28</b>
2.1	Répartition géographique .....	29
2.2	Taxonomie et systématique .....	29
2.3	Usage traditionnel.....	29
2.4	Propriétés pharmacologiques.....	30
2.5	Données toxicologiques.....	31
	<b>Chapitre 3: Antibiotiques et résistance microbienne</b> .....	<b>32</b>
<b>1</b>	<b>Antibiotiques</b> .....	<b>32</b>
1.1	Antibiotiques et leurs cibles dans les cellules bactériennes .....	32
1.2	Résistance des bactéries aux antibiotiques .....	33
1.2.1	Résistance naturelle.....	33
1.2.2	La résistance acquise.....	33
<b>2</b>	<b>Mécanismes de résistance bactérienne</b> .....	<b>34</b>
2.1	Modification de l'antibiotique .....	34
2.2	Modification de la cible .....	34
2.3	Accessibilité réduite de la cible .....	34
2.4	Réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique.....	35
<b>3</b>	<b>Les plantes et la lutte contre la résistance bactérienne aux antibiotiques</b> .....	<b>35</b>
	<b>Chapitre 4: Le stress oxydatif et les antioxydants</b> .....	<b>37</b>
<b>1</b>	<b>Généralité</b> .....	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>Stress oxydatif</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Les radicaux libres</b> .....	<b>37</b>
3.1	Espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	38
<b>4</b>	<b>Les antioxydants</b> .....	<b>38</b>
4.1	Les antioxydants endogènes .....	39
4.1.1	La catalase .....	39
4.1.2	Le superoxyde dismutase (SOD).....	39
4.1.3	Le glutathion peroxydase .....	39
4.1.4	Les chélateurs de métaux .....	40
4.2	Les antioxydants exogènes .....	40
4.2.1	Vitamine E ( $\alpha$ Tocophérol) .....	40
4.2.2	Vitamine C (acide ascorbique).....	40

4.3	Antioxydants d'origine végétale.....	41
<b>5</b>	<b>Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro.....</b>	<b>42</b>
	<b>Chapitre 5: Les Diurétiques .....</b>	<b>43</b>
<b>1</b>	<b>Rappel sur l'anatomie et la physiologie rénale.....</b>	<b>43</b>
1.1	Le néphron.....	43
1.1.1	Fonction du néphron.....	44
<b>2</b>	<b>Les diurétiques .....</b>	<b>45</b>
2.1	La diurèse .....	45
2.2	Classification des diurétiques .....	45
2.3	Indications thérapeutiques des diurétiques .....	47
2.4	Effets indésirables des diurétiques .....	48
<b>3</b>	<b>Les plantes et l'effet diurétique .....</b>	<b>48</b>
<b>Partie II: Matériel et méthodes</b>		
<b>1</b>	<b>Matériel végétal.....</b>	<b>50</b>
<b>2</b>	<b>Méthodes d'extractions des composés bioactifs .....</b>	<b>50</b>
2.1	Extraction des huiles essentielles .....	50
2.2	Extraction par Soxhlet. ....	51
2.3	Extraction par macération.....	52
<b>3</b>	<b>Analyse chimique des huiles essentielles.....</b>	<b>52</b>
3.1	Chromatographie en phase gazeuse.....	52
3.2	Analyse des huiles essentielles par CG-SM .....	53
<b>4</b>	<b>Dosage des composés phénoliques dans les extraits de plantes .....</b>	<b>54</b>
4.1	Dosage des polyphénols totaux .....	54
4.2	Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux .....	54
4.3	Dosage des flavones et flavonols.....	55
<b>5</b>	<b>Activités biologiques .....</b>	<b>55</b>
5.1	Activités antibactériennes des HEs seules et en combinaison avec d'autres composés ..	55
5.1.1	Les souches bactériennes testées.....	55
5.1.2	Les composés étudiés .....	56
5.1.3	Les Milieux de culture utilisés .....	57
5.1.4	Activité antibactérienne des HEs par la méthode de diffusion de disques.....	57
5.1.5	Activité antibactérienne des HEs par la technique de microdilution .....	58

5.2	Potentiel synergétique des HEs combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles .....	59
5.3	Activités antioxydantes.....	63
5.3.1	Piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> .....	63
5.3.2	Piégeage du radical DPPH .....	63
5.3.3	Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	64
5.3.4	Test de phosphomolybdène.....	64
5.4	Effet diurétique des extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp <i>polium</i> et <i>T. polium</i> ssp <i>aureum</i> ....	65
5.4.1	Animaux.....	65
5.4.2	Traitement aigu .....	65
5.4.3	Traitement subchronique.....	65
5.4.4	Analyses statistiques .....	67

### Partie III: Résultats et discussion

<b>Axe I: Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de <i>T. polium</i> et <i>C. cassia</i></b> .....	69
<b>1 Résultats</b> .....	69
1.1 Composition chimique des huiles essentielles de <i>T. polium</i> et <i>C. cassia</i> .....	69
1.1.1 Composition chimique des huiles essentielles des deux sous-espèces de <i>T. polium</i> .	69
1.1.2 Composition de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i> .....	72
1.1 Activité antioxydante des huiles essentielles .....	72
<b>2 Discussion</b> .....	75
2.1 Composition chimique des huiles essentielles .....	75
2.2 Les huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i> .....	75
2.3 Composition de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i> .....	76
2.4 Activité antioxydante des huiles essentielles .....	76
<b>Axe 2 : Étude du potentiel synergique des huiles essentielles de <i>T. polium</i> et <i>C. cassia</i> combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles</b> .....	78
<b>1 Résultats</b> .....	78
1.1 Pouvoir antibactérien comparatif des HEs de <i>T. polium</i> , <i>C. cassia</i> et des molécules volatiles.....	78
1.1.1 La méthode de diffusion sur gélose.....	78
1.1.2 Concentrations minimales inhibitrices .....	79
1.2 Potentiel synergique des huiles essentielles avec les molécules volatiles .....	81

1.3 Étude du potentiel synergique des HEs de avec les antibiotiques.....	84
<b>2 Discussion.....</b>	<b>86</b>
2.1 Pouvoir antibactérien des huiles essentielles et les molécules volatiles .....	86
2.2 Combinaison des HEs avec certains antibiotiques ou molécules volatiles. ....	88
<b>Axe III : Dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>T. polium</i> et de <i>C. cassia</i> .....</b>	<b>91</b>
<b>1 Résultats.....</b>	<b>91</b>
1.1 Dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante des extraits des deux sous-espèces de <i>T. polium</i> et de <i>C. cassia</i> obtenus par Soxhlet .....	91
1.1.1 Rendement d'extraction.....	91
1.1.2 Teneur des extraits en composés phénoliques .....	91
1.1.2.2 Teneurs en flavonoïdes totaux,.....	92
1.1.3 Activité antioxydante des extraits de <i>T. polium</i> et <i>C. cassia</i> obtenus par Soxhlet ....	94
1.1.4 Corrélations entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques .....	96
1.2 Teneur en composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>T. polium</i> et <i>C. cassia</i> obtenus par macération.....	97
1.2.1 Rendement d'extraction.....	97
1.2.2 Teneur des composés phénoliques des extraits obtenus par macération .....	98
1.2.3 Activité antioxydante des extraits des deux sous-espèces de <i>T. polium</i> et de <i>C. cassia</i> obtenus par macération.....	100
1.3 Corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques .....	103
<b>2 Discussion.....</b>	<b>104</b>
2.1 Teneur en composés phénoliques.....	104
2.2 Activité antioxydante .....	105
<b>Axe IV: Exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> et <i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i> .....</b>	<b>109</b>
<b>1 Résultats.....</b>	<b>109</b>
1.1 Traitement aigu : effet sur le débit urinaire.....	109
1.2 Traitement subchronique.....	110
1.2.1 Effet sur le volume urinaire .....	110
1.2.2 Effet des extraits aqueux de <i>T. polium</i> sur l'excrétion des électrolytes. ....	111
1.2.3 Effet sur les taux plasmatiques des électrolytes .....	111
2.3 Effet sur les taux plasmatiques de l'urée, la créatinine et l'acide urique .....	112
1.2.4 Effet sur la filtration glomérulaire .....	112
1.2.5 Effet sur l'osmolarité et la clairance de l'eau libre.....	113

<b>2 Discussion.....</b>	<b>114</b>
Conclusion générale .....	117
Références bibliographiques .....	119
Annexes .....	138
Publications scientifiques .....	143

## Liste des figures

Figure 1: Classification des principaux composés phénoliques .....	20
Figure 2: Structure de base des flavonoïdes .....	21
Figure 3: Structure chimique des principaux phénols .....	24
Figure 4: Aspects morphologiques de l'espèce <i>T. polium</i> L.....	27
Figure 5 : <i>Cinnamomum Cassia</i> ; A : l'arbre ; B : les écorces .....	29
Figure 6: Représentation schématique du mode d'action des antibiotiques.....	32
Figure 7: Représentation schématique du mécanisme de résistance aux antibiotiques.....	35
Figure 8: Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries .....	36
Figure 9: Les antioxydant endogènes et exogènes .....	41
Figure 10: Structure de base du rein et néphron.....	44
Figure 11: Sites d'action des diurétiques.....	46
Figure 12: Montage expérimental de l'appareil d'hydrodistillation.....	51
Figure 13: Montage expérimental de l'appareil de Soxhlet .....	51
Figure 14 : Montage expérimental de la rotavapeur.....	52
Figure 15 : Principe de la chromatographie en phase gazeuse .....	53
Figure 16 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse. ....	54
Figure 17 : Schéma de la plaque utilisée lors de la combinaison de deux composés.....	60
Figure 18: Schéma des différentes interactions possibles .....	62
Figure 19 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> .....	70
Figure 20 : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i> .....	70
Figure 21 : Piégeage du radical libre ABTS <sup>+</sup> • par les HEs et le Trolox.....	73
Figure 22 : Piégeage du radical libre DPPH• par les HEs et le BHT .....	73
Figure 23 : Pouvoir réducteur du fer des HEs comparés à celui du quercétine et BHT.....	73
Figure 24 : Teneur en polyphénols totaux des extraits des trois plantes (mgEq AG/gMs)..	92
Figure 25 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits obtenus par Soxhlet.....	93
Figure 26 : Teneur en flavones et flavonols des extraits obtenus par Soxhlet .....	93
Figure 27 : Capacité antioxydante totale (mg Eq Vit C/g Ms) des extraits obtenus par Soxhlet .....	96
Figure 28 : Teneur en polyphénols des extraits obtenus par macération des trois plante (mg Eq AG/gMs).....	98
Figure 29 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits obtenus par macération des trois plantes (mgEq R/gMs).....	99

Figure 30 : Teneur en flavones et flavonols des extraits obtenus par macération des trois plantes (mg Eq Q/gMs). .....	100
Figure 31 : Capacité antioxydante totale des différents extraits obtenus par macération (mg Eq Vit C/g Ms). .....	103
Figure 32: Effet subchronique d'administration orale des extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>aureum</i> et du furosémide sur le volume urinaire (mL/24 h). .....	110
Figure 33 : Effet d'administration orale, d'extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>aureum</i> et du furosémide sur la clairance de la créatinine (mL/min). .....	113

## Liste des tableaux

Tableau 1: Mise en place des antibactériens pour la mesure de la synergie par microdilution .....	61
Tableau 2: Composition chimique des HEs de <i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i> et <i>T. polium</i> ssp <i>polium</i> .....	71
Tableau 3: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i> .....	72
Tableau 4 : Les valeurs d' IC <sub>50</sub> et EC <sub>50</sub> obtenus par les tests antioxydants des huiles essentielles de <i>T. polium</i> et <i>C. cassia</i> .....	74
Tableau 5 : Diamètre de la zone d'inhibition des composé étudiés (mm) .....	79
Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles et les molécules volatiles ..	80
Tableau 7 : Combinaisons de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i> avec les composés majoritaires .....	82
Tableau 8 : Combinaisons de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> avec certaines molécules volatiles .....	83
Tableau 9 : Combinaisons de l'huile essentielle de <i>C. cassia</i> avec les antibiotiques.....	84
Tableau 10 : Combinaisons de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> avec certains antibiotiques .....	85
Tableau 11 : Rendement (%) des extraits obtenus par Soxhlet .....	91
Tableau 12: Les IC <sub>50</sub> (mg/mL) de l'inhibition du radical ABTS de différents extraits .....	94
Tableau 13 : Les IC <sub>50</sub> (mg/mL) du piégeage du radical DPPH' des extraits obtenus par soxhlet .....	95
Tableau 14 : les IC <sub>50</sub> (mg/mL) du pouvoir réducteur de fer des extraits obtenus par soxhlet .....	95
Tableau 15 : Coefficients de corrélation de Pearson (r) entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques.....	97
Tableau 16 : Rendement (%) des extraits obtenus par la technique de macération .....	97
Tableau 17 : Les IC <sub>50</sub> (mg/mL) de l'inhibition du radical ABTS des extraits obtenus par macération .....	101
Tableau 18 : Les IC <sub>50</sub> (mg/mL) du piégeage du radical libre DPPH' des extraits obtenus par macération .....	101
Tableau 19 : les EC <sub>50</sub> (mg/mL) du pouvoir réducteur du fer des extraits obtenus par la macération des trois plantes étudiées. ....	102
Tableau 20 : Coefficients de corrélation de Pearson (r) entre les différents tests de l'activité antioxydante et les composés phénoliques.....	103
Tableau 21 : Effet aigu, des extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp. <i>Polium</i> et <i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i> et furosémide administrés par voie orale sur le volume urinaire (mL/h) chez les rats pendant 24 h .....	109
Tableau 22 : Effet des extraits aqueux de <i>T. polium</i> sur l'excrétion d'électrolytes urinaires (sodium, potassium et chlorure) à la fin d'un traitement de 16 jours.....	111
Tableau 23 : Effet de l'administration orale, d'extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>aureum</i> et du furosémide sur les électrolytes plasmatiques des rats .....	112
Tableau 24 : Effet d'administration orale, d'extraits aqueux de <i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> , <i>T. polium</i> ssp <i>aureum</i> et de furosémide sur la fonction rénale. ....	112

Tableau 25 : Effet d'administration orale, d'extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp *aureum* et du furosémide sur l'osmolarité plasmatique, l'osmolarité urinaire, la clairance urinaire et la clairance de l'eau libre. .... 113

## Liste des abréviations

ABTS	: 2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate
ADN	: Acide Désoxyribo Nucléique
AG	: Acide Gallique
AGPI	: Acides gras polyinsaturés.
ATCC	: American Type Culture Collection
BHA	: hydroxyanisole butyle
BHT	: Hydroxytoluène butylé
<i>C. cassia</i>	: <i>Cinnamomum cassia</i>
CAT	: Capacité Antioxydante Totale.
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
Cosm	: Clairance osmolaire
COX	: Cyclooxygénase
CPG/MS	: Chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
ERO	: Espèces réactives d'oxygène
FRAP	: Ferric reducing power activity
Gpx	: Glutathion peroxydase
H E	: Huile essentielle.
H <sub>2</sub> O	: Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: peroxyde d'hydrogène
IC <sub>50</sub>	: Inhibitory concentration 50%.
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
Posm	: Osmolarité plasmatique
SOD	: Superoxydedismutase
Ssp	: Sous-espèce
<i>T. polium</i>	: <i>Teucrium polium</i> L.
TTC	: Chlorure de 2,3, 5 triphényltétrazolium
Uosm	: Osmolarité urinaire
WHO	: World health organisation

## Liste des publications

1. **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Kaotar Nayme, Mohammed Timinouni, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2019; 10(2): 63-67.
2. **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Badiia Lyoussi, Bouchra Oumokhtar, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium L.* subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. *Arabian Journal of Chemistry* 2020, 13(20): 3866-3874.
3. **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Fatima. El kamari, Hind zejli, Amal. Taroq, Badiia. Lyoussi, Mustapha. Taleb, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activities, total phenol and flavonoid contents of two *Teucrium polium* subspecies extracts. *Mor.J. Chem* 2020; 8(2):446-455.
4. **Yassine El atki**, Imane Aouam, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activity of two wild *Teucrium* species from Morocco. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2019; 10(6): 2723-2729.
5. **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Fatima El Kamari, Amal Taroq, Badiia Lyoussi, Mustapha Taleb, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. *Materials Today: Proceedings* 2019: 777-783.
6. **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Fatima El kamari, Amal Taroq, Abdelkader Gouch, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection bacteria. *Journal of pharmaceutical sciences and research* 2019; 11(2): 306-309.
7. **El Atki Y**, Aouam I, Taroq A, El Kamari F, Timinouni M, Lyoussi B, Abdelfattah A. Antibacterial effect of a combination of cinnamon essential oil and thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol. *J Rep Pharm Sci* 2020; 9:104-9.
8. Abdelkader Gouch, Hind Zejli, Aziza Lfitat, Fatima Zohra Bousraf, **Yassine El Atki**, et al. Preventive impact of traditional medicine against covid-19. *Journal of Analytical Sciences and Applied Biotechnology* 2020, 2(2): 78-82.
9. Lfitat, A., Zejli, H., Bouselham, A., **El Atki, Y.**, Lyoussi, B., Gouch, A., & Abdellaoui, A. Comparative Evaluation of *Argania spinosa* and *Olea europaea* Leaf Phenolic Compounds and their Antioxidant Activity. *Botanica.* 2020; 26(1): 76-87.
10. Imane Aouam, **Yassine El Atki**, Mustapha Taleb, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Badiia Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents of *Thymus riatarum*. *Materials Today: Proceedings* 2019; 579-586.

11. Fatima El Kamari, Amal Taroq, **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. *Cymbopogon Nardus L.* Essential Oil: Phytochemical Screening and its Antibacterial Activity against Clinical Bacteria Responsible for Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2018 ; 50(1) : 14-17.
12. Fatima El Kamari, Amal Taroq, **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Chemical composition of essential oils from *Vitex agnus-castus L.* growing in Morocco and its *in vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2018; 11(10): 365-368.
13. Jalal Z, **El Atki Y**, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis L.* growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015; 5(6):458-61.
14. Fatima El Kamari, Amal Taroq, **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Total phenols content, flavonoid concentration and antioxidant activities of leaves extracts of *Vitex agnus-castus L.* Growing wild in Morocco. International journal of pharmaceutical sciences and research. 2019 ; 10(4) : 1670-1676.
15. Amal Taroq, Fatima El Kamari, Bouchra Oumokhtar, Imane Aouam, **Yassine El Atki**, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical Screening of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* and Antibacterial Activity against Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 2018 ; 48(1) : 58-61.
16. Amal Taroq, Fatima El Kamari, **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Antioxidant activities and total phenolic and flavonoid content variations of leaf extracts of *Laurus nobilis L.* from Morocco. Asian Journal of Pharmaceutical And Clinical Research. 2018 ; 11(12) :540-543.
17. Imane Aouam, **Yassine El Atki**, Amal Taroq, Fatima El Kamari, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Various Extracts of *Thymus Riatarum* from Morocco. Journal of pharmaceutical sciences and research 2018 ; 10 (11) :2689-2692.
18. Amal Taroq, Fatima El Kamari, **Yassine El Atki**, Imane Aouam, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui. Phytochemical screening, polyphenols content and a novel source of antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research .2019 ; 10(8): 3770-3776.

## **Introduction générale**

La résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue une grande menace pour la santé publique. Les bactéries résistent à tout traitement et limitent la gamme d'antibiotiques disponibles en thérapeutique médicale. La situation est d'autant plus alarmante que les infections causées par ces bactéries insensibles conduisent souvent à un accroissement de l'état pathologique et une augmentation du taux de mortalité.

Le stress oxydant est décrit réellement comme un facteur crucial impliqué dans l'étiologie de plusieurs maladies chroniques humaines à savoir les maladies cardiovasculaires (Schlienger, 2018) neurodégénératives et inflammatoires, le cancer, le diabète et le vieillissement (Zhuang *et al.*, 2014; Mota *et al.*, 2015; Fuentes *et al.*, 2017). Il est dû à l'attaque des radicaux libres sur de diverses biomolécules, notamment les lipides, les protéines et les acides nucléiques, entraînant ainsi, de profondes altérations dans le métabolisme de la cellule et par conséquent la mort cellulaire. En effet, le recours aux antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluène butyle (BHT), le tert-butylhydroquinone (TBHQ) et l'hydroxyanisole butyle (BHA) utilisés dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique semble inadéquat vu leurs effets toxiques tant sur la santé humaine que sur l'environnement (Yang *et al.*, 2018; Barreira *et al.*, 2019).

D'autre part, les diurétiques sont des médicaments préservatifs de l'homéostasie interne, ils sont prescrits dans les cas de l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale chronique, l'hypercalciurie et le syndrome néphrétique (Jardim *et al.*, 2018; Alonso-Castro *et al.*, 2019). Cependant, ils sont associés à plusieurs effets indésirables, tels que le déséquilibre électrolytique et stimulation du système rénine-angiotensine (Adin *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019).

La prise de conscience de la fatalité de la résistance bactérienne, du stress oxydant et les effets secondaires des médicaments diurétiques nécessite l'orientation de la recherche scientifique vers la découverte de nouvelles voies alternatives qui constituent une source d'inspiration de nouveaux diurétiques, des agents antioxydants et des agents antibactériens visant de nouvelles cibles d'action chez les microorganismes.

En effet, les pistes de recherche sont nombreuses. Toutefois, les plantes aromatiques et médicinales apparaissent les plus prometteuses, car celles-ci constituent une source potentielle de molécules à activités biologiques et pharmacologiques très variées. Les huiles essentielles (HEs) extraites des plantes aromatiques constituent une source inépuisable de molécules naturelles inhibitrices des mécanismes de résistances aux antibiotiques. En plus, l'utilisation des HEs en synergie avec d'autres agents antimicrobiens constitue une nouvelle approche pour

résoudre le problème de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Plusieurs études ont indiqué l'efficacité de l'association des HEs avec les antibiotiques pour augmenter leurs effets à de faibles doses et pour diminuer la toxicité de certains antibiotiques (Kwiatkowski *et al.*, 2017; Vitanza *et al.*, 2019).

C'est dans cette optique que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est la valorisation de deux espèces de plantes médicinales, *T. polium* et *C. cassia* par l'étude de leur composition chimique et de leur activité antioxydante, diurétique, ainsi, par l'évaluation du potentiel synergique antibactérien de leurs huiles essentielles combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles.

Pour sa part, le document est structuré comme suit :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dédiée aux notions essentielles à la compréhension de notre étude. Elle se compose de cinq chapitres, le premier concerne des généralités sur les plantes aromatiques et médicinales, les métabolites secondaires, les huiles essentielles et leurs activités biologiques et pharmacologiques ; le deuxième est une monographie des plantes choisies pour la réalisation de ce travail. Les trois derniers chapitres sont consacrés respectivement aux généralités sur le stress oxydatif et les antioxydants, la résistance bactérienne et les antibiotiques et la diurèse et les diurétiques.

La deuxième partie est réservée à l'ensemble des expériences réalisées pour l'extraction des polyphénols, des huiles essentielles des plantes choisies et l'évaluation de leurs activités biologiques.

La troisième partie présente les résultats et les discussions de ce travail, cette partie est divisée en quatre axes :

- ✓ Le premier se focalise sur la détermination de la composition chimique des huiles essentielles de *T. polium* et *C. cassia* et l'évaluation de leur pouvoir antioxydant.
- ✓ Le deuxième est consacré à l'étude de l'activité antibactérienne et l'effet synergique des huiles essentielles de *T. polium* et *C. cassia* combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatils.
- ✓ Le troisième se rapporte à la détermination de la teneur en polyphénols et l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits de *T. polium* et *C. cassia*.
- ✓ Le quatrième présente les résultats de l'exploration de l'effet diurétique des extraits des deux sous-espèces de *T. polium* sur un modèle animal.



**Partie I : Synthèse bibliographique**

# Chapitre 1 : Plantes aromatiques et médicinales

## 1 Introduction

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui contiennent une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (Joy *et al.*, 1998). Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé les plantes comme remèdes contre les maladies. Le pouvoir thérapeutique des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent chez les plantes comme un moyen de défense contre les parasites pathogènes. De nos jours, et dans plusieurs pays en voie de développement, une grande partie de la population utilise les plantes médicinales soit par la recommandation d'un médecin ou d'un pharmacien ou par automédication. Ces plantes sont employées indépendamment ou en mélange avec des médicaments synthétiques. En effet, pour une thérapie adéquate et appliquée avec succès, il est important de connaître les activités pharmacologiques de leurs constituants (Fakchich *et al.*, 2014). Il a été rapporté que 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins un composé actif d'origine végétale (Boudjelal *et al.*, 2013). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 2014), environ 80 % de la population mondiale utilisent la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire. Au Maroc, les plantes médicinales sont utilisées principalement dans les zones rurales par les personnes âgées et qui possèdent encore l'expérience de quelques recettes à base de plantes (Fakchich *et al.*, 2014). Ces plantes sont utilisées principalement en cosmétiques (cicatrisantes, astringentes, adoucissantes, capillaires, pigmentaires et anti-ecchymose) (Bellakhdar, 2006), dans le domaine d'aromathérapie, condimentaire, alimentaires et industriels (tinctoriales, fibres textiles, insecticides). Aujourd'hui encore, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes dont les vertus thérapeutiques ont été confirmées. Quelles que soient les parties utilisées des plantes, elles sont extrêmement riches en métabolites secondaires. Ces dernières contiennent des milliers de composés appartenant à des classes chimiques très diverses, telles que les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes (Nguyen *et al.*, 2016; Walters *et al.*, 2019). Elles sont exploitées dans plusieurs domaines : dans le domaine agroalimentaire comme arômes, antioxydants et colorants ; dans le domaine médical comme antimicrobiens, antioxydant, et dans le domaine agricole comme pesticides. En fait, les huiles essentielles (HE) sont les plus exploitées grâce à leur large spectre d'activités biologiques connues. De nombreux composés volatils des HES sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques à savoir le menthol,

le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le cinamaldéhyde qui entrent dans les formulations de plusieurs agents antimicrobiens (Peña-Gómez et al., 2019; Vitanza et al., 2019; Lee et al., 2020).

## **2 Plantes aromatiques et médicinales au Maroc**

Le Maroc occupe le second rang après la Turquie en biodiversité en Méditerranée. Le bioclimat varié et les conditions géographiques hétérogènes ont favorisé l'installation de plus de 4200 espèces et sous-espèces dont 800 espèces sont endémiques avec un taux d'endémisme qui atteint 25% (Joy *et al.*, 1998).

Les plantes utilisées en médecine traditionnelle au Maroc sont estimées aux près de 800 espèces, réparties dans 107 familles et 352 genres. Les familles les plus répandues sont au nombre de neuf seulement et regroupent plus de la moitié de la richesse spécifique totale du pays. Ces plantes sont impliquées dans plus de 500 recettes et utilisées pour traiter 28 maladies dont les plus importantes sont les affections de système digestif et respiratoire, les problèmes cardiovasculaires et les affections dermatologiques (Hmamouchi, 2001).

À côté de cette propriété naturelle prometteuse, le Maroc dispose d'un savoir-faire important tel que, le soin par les plantes, leur utilisation pour la conservation et l'aromatization des aliments, ainsi que pour l'extraction des composés aromatiques destinés à la parfumerie familiale ou au marché (Benslimane, 2010).

La production des plantes aromatiques et médicinales au Maroc se révèle aussi diversifiée et riche. Plusieurs produits y sont connus comme étant des produits typiquement marocains. Cela signifie que l'exploitation des PAM au Maroc a réussi à introduire de nouveaux produits sur le marché international, ce qui constitue un important avantage pour le développement du secteur des PAM (Benslimane, 2010). De même, le Maroc est classé le 12ème exportateur mondial des plantes médicinales. Le marché de l'UE constitue la principale destination des exportations marocaines en PAM (Babba, 2015).

D'un autre côté, l'exploitation et le commerce des plantes médicinales au Maroc représentent une source de revenu non négligeable pour plusieurs populations, surtout dans les zones rurales, de plus des coopératives et des petites entreprises qui se sont développées ces dernières années (Zrira, 2015).

Selon une enquête réalisée sur la médecine traditionnelle marocaine, 71 % des personnes interrogées utilisent les plantes pour se soigner (Hmamouchi, 2001). Toutefois, divers problèmes en relation avec l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales risquent d'exposer la santé à des maladies graves. Parmi ces problèmes, la diversité et la complexité des

noms vernaculaires des plantes utilisées qui rend leur identification difficile, les doses et la durée d'utilisation ne sont pas précises et diffèrent d'un herboriste à l'autre, l'utilisation de la même espèce pour plusieurs maladies désignées comme une seule maladie, la mauvaise conservation et la mauvaise qualité des plantes utilisées ce qui risque de les rendre toxiques (Sijelmassi, 2000; Bellakhdar, 2006). À cet égard, des études scientifiques de toutes les plantes médicinales et une réglementation de leur prescription sont impératives pour une utilisation sans danger.

### **3 Métabolites secondaires des plantes**

Les métabolites secondaires sont des produits du métabolisme secondaire (spécifique des végétaux), ayant une répartition limitée. Ils exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement, ils assurent la résistance des plantes aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.) (Xu *et al.*, 2016).

Sur le plan pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des substances présentes chez les végétaux et on estime actuellement qu'environ 1/3 des médicaments sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale. D'un point de vue agronomique, ces métabolites jouent un rôle dans la protection des cultures à savoir, la résistance, aux infections microbiennes et à certains insectes (Martelli *et al.*, 2018).

#### **3.1 Classification des métabolites secondaires**

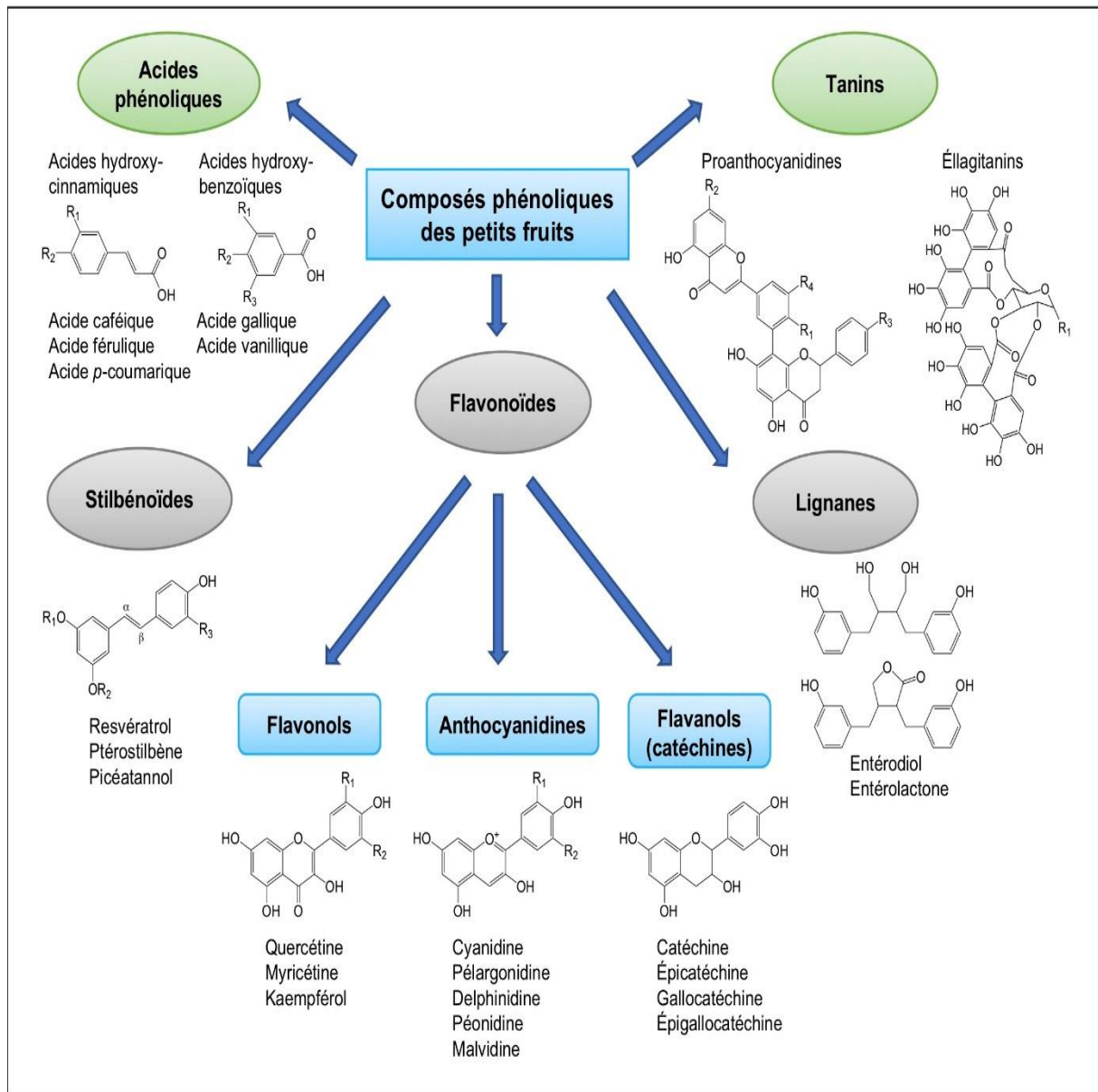
Les métabolites secondaires sont d'une large variété structurale et ils sont divisés principalement en trois grands groupes ; les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Marouf *et al.*, 2007).

#### **3.2 Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques ou les polyphénols regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules (González-Gallego *et al.*, 2010). Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique qui est l'élément structural fondamental auquel est lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (Méthyle, Glycoside, Ester...).

Ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, ce sont surtout des antioxydants, des anti-inflammatoires et des antimicrobiens (Martelli *et al.*, 2018). Les polyphénols sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base. Il existe plusieurs classes des polyphénols à savoir, les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols les acides phénoliques simples, les phénols simples, les stilbènes, les coumarines, les tanins, les

quinones, les lignanes et les lignines et xanthones (Tapiero *et al.*, 2002). Les classes les plus importants sont citées ci-après :



*Figure 1: Classification des principaux composés phénoliques (Nile et al., 2014)*

➤ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes occupent une place dominante dans le groupe des composés phénoliques. Ils sont considérés comme des pigments responsables de la coloration des végétaux. Ils interviennent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponses à certains stress (radiations UV). Ce sont également des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. Ainsi, ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Seyoum *et al.*, 2006).

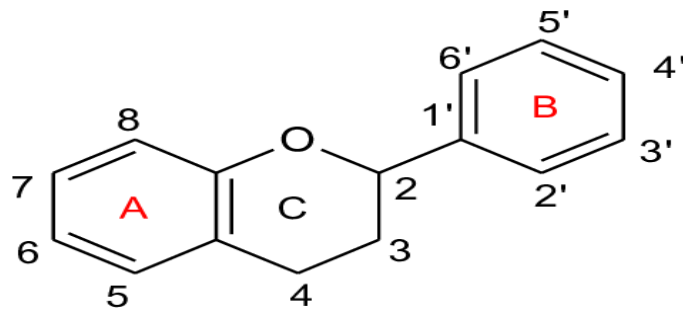


Figure 2: Structure de base des flavonoïdes

En se basant sur la structure des flavonoïdes ils peuvent être divisés en différents groupes : flavones, flavonoles, flavanones, anthocyanidines, isoflavonoles, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, isoflavanones...(Bruneton, 2009).

➤ **Les tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques de structure variée, ils sont caractérisés par leur saveur astringente et leur la propriété de tanner la peau, cette caractéristique de tannage provient de la création de liaisons entre les composés de tanins et les fibres de collagène. Leur rôle biologique chez les végétaux est mal connu. Cependant, leur présence confère à la plante des propriétés antioxydantes, antiseptique, et antidiarrhéique (Mamadou, 2002).

➤ **Terpénoïdes**

Les terpénoïdes constituent le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des plantes. Tous les terpènes peuvent être formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées ramifiées du 2-méthylbutadiène.

Les terpénoïdes ont une particularité structurale importante, c'est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone (C5) (figures 1). Ils sont classés selon le nombre d'unités isoprénique ; hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique, monoterpénoïdes sont formés de deux isoprènes (C10), sesquiterpénoïdes, constitués de trois unités isopréniques (C15), diterpénoïdes, formés par l'association de quatre isoprènes (C20) (Hernandez Ochoa, 2005).

Les terpènes sont les constituants majeurs des huiles essentielles. Leur effet thérapeutique (antioxydant, anti-inflammatoire) et leur emploi industriel (parfumerie) font de cette classe de métabolites secondaires une classe d'intérêt (Hernandez Ochoa, 2005). Néanmoins, si l'on peut savoir l'intérêt thérapeutique de monoterpènes ou de sesquiterpènes isolés, il est difficile de

connaître les effets synergiques des terpènes des HEs qui sont des composés complexes et variés.

### **3.3 Les saponines**

Ce sont des glycosides contenus dans nombreuses plantes médicinales. Ils détiennent leur nom de leur capacité de former une solution moussante en dissolvant dans l'eau (Iserin et Masson, 2007). Les saponines existent sous deux formes : les stéroïdes et les triterpénoïdes. La forme stéroïdienne est similaire à celle de plusieurs hormones humaines (oestrogène, cortisone). Elles sont généralement expectorantes et facilitent l'absorption des aliments. Les saponines connues par leurs activités pharmacologiques telles que : immunomodulatrice, anti-inflammatoire, antioxydante, anticoagulante, antalgique et antipyrétique (Guo *et al.*, 2018).

### **3.4 Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amères et ayant des effets thérapeutiques ou toxiques (Iserin *et al.*, 2017). Ils ont des structures très variées et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique. Leur rôle dans la plante synthétisante est la régulation de la croissance et le métabolisme interne, et la désintoxication et la transformation des substances nocives à la plante, ils protègent la plante contre les rayons UV (Mauro, 2006).

Les alcaloïdes figurent parmi les composés les plus importants en médecine et en pharmacologie. En effet, ils ont un effet anticancéreux, anti-hypertensif, sédatif, antimicrobien. Ainsi, ils affectent le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques comme la dopamine, l'acétylcholine, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), et la sérotonine (Iserin *et al.*, 2017). Cependant, il est la base de plusieurs poisons dangereux comme l'atropine par exemple, est extraite de la belladone (fortement toxique) et qui peut être utilisée à faible dose dans un intérêt thérapeutique (Mauro, 2006).

## **4 Les huiles essentielles**

### **4.1 Définition des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des composants liquides de métabolites secondaires volatils, obtenues à partir des organes végétaux par hydrodistillation ou par expression mécanique. En effet, les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules hautement volatiles marquées par une forte et caractéristique odeur, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques (Ntezurubanza *et al.*, 1984).

## **4.2 Procédés d'extraction des huiles essentielles**

L'huile essentielle est un mélange de produits ou un produit obtenu à partir d'une matière d'origine végétale. L'hydrodistillation reste la technique de référence la plus employée dans le domaine de la recherche pour extraire et étudier les composés volatils d'une plante (Golmohammadi *et al.*, 2018). Cette technique consiste à immerger le matériel végétal directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Ensuite, le tout est porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes seront condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par la différence de densité. En effet, l'HE surnage au-dessus de l'hydrolat, car l'HE est plus légère que l'eau. Néanmoins, dans quelques rares exceptions l'HE se décante au-dessous (l'HE de cannelle et de clou de girofle). Les huiles essentielles peuvent aussi être obtenues par la pression à froid, comme pour les agrumes. De nouvelles techniques, permettant d'augmenter le rendement de production, ont été développées, comme l'extraction par l'explosion de vapeur (Golmohammadi *et al.*, 2018), l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes (Zhao *et al.*, 2019) et l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide sous haute pression et à basse température (Kimbaris *et al.*, 2006).

## **4.3 Méthodes d'analyses chimiques des huiles essentielles**

L'identification des constituants d'une huile essentielle est généralement réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID), et par la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Wianowska *et al.*, 2016).

### **➤ Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La CPG est une technique de séparation et d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner des informations sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative (Bicchi *et al.*, 2008). L'identification d'une molécule peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention (TR) qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. Les meilleurs résultats peuvent être obtenus grâce à l'utilisation des indices de rétention (IR), mesurés sur les colonnes apolaires et polaires, qui sont plus fiables que les TR. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires (Bicchi *et al.*, 2008). Bien que dans la grande majorité des cas, chaque molécule possède des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire qui lui sont propres, deux molécules peuvent co-éluer et présenter des IR identiques. Cependant, de meilleurs résultats sont obtenus quand les produits de référence et les composés à analyser sont étudiés

rigoureusement dans les mêmes conditions expérimentales et lorsque les indices des constituants sont mesurés au laboratoire (Adams, 2007).

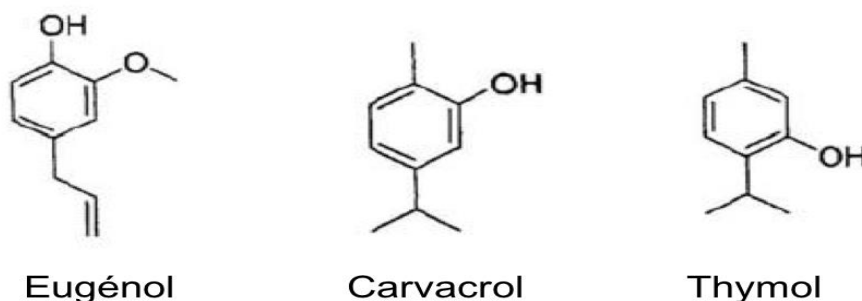
➤ **CPG-SM**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en mode impact électronique, dite CPG-SM(IE), est la technique la plus utilisée pour analyser des huiles essentielles (Hassanabadi *et al.*, 2019). Le principe de la spectrométrie de masse (SM) consiste à bombarder à l'aide des électrons un composé qui sera fragmenté, ainsi les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse du composé. Cette technique permet d'identifier une molécule en comparant son spectre à ceux contenus dans la bibliothèque des spectres informatisée (Adams, 2007).

#### **4.4 Composition chimique des huiles essentielles**

Plus de 300 constituants peuvent être identifiés dans les huiles essentielles. Trois classes de composés ont été décrites. La classe la plus répondeuse est celle de terpènes et les terpénoïdes, les autres classes comprennent les composés aromatiques (phénols) et dans une moindre mesure des composés aliphatiques (alcane et alcène). Tous ces composés sont caractérisés par un faible poids moléculaire (Hassanabadi *et al.*, 2019).

Les mono et les sesquiterpénoïdes sont les composés les plus répondeus dans les huiles essentielles. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol (Figure 3) qui sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques (la phénylalanine et la tyrosine) (Vitanza *et al.*, 2019). Les terpénoïdes et les phénols sont les plus responsables de l'effet antimicrobien des huiles essentielles. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels et du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (Sellem *et al.*, 2020).



*Figure 3: Structure chimique des principaux phénols*

#### **4.5 Variation de la Composition chimique des huiles essentielles**

La composition chimique des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, la période et la zone géographique de récolte, les organes prélevés et la méthode d'extraction (Hassanabadi *et al.*, 2019). De même, selon les conditions de vie et environnementales, la composition chimique des huiles essentielles au sein d'une même espèce peut être différente, cette différence est définie par le chémotype (Golmohammadi *et al.*, 2018).

#### **4.6 Toxicité des huiles essentielles**

Les huiles essentielles, même si elles sont d'origine naturelle, ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme la majorité des médicaments, que ce soient d'origine naturelle ou synthétique, les composés présents dans les HEs ont la capacité d'engendrer des effets toxiques graves, voire mortels, s'ils sont ingérés en très grandes quantités (Tabarraei *et al.*, 2019).

## Chapitre 2 : Monographie des plantes étudiées

### 1 *Teucrium polium* L.

#### 1.1 Généralités

*Teucrium polium* L. (*T. polium*) est une plante dicotylédone appartenant à la famille des Lamiacées et au genre *Teucrium*. Ce dernier comprend plus de 340 espèces et 12 sous-espèces (Heywood *et al.*, 2007). Cette plante est connue sous le nom français : Germandrée tomenteuse, et le nom anglais Feltygermander ou Ezovion. Elle est reconnue sous plusieurs noms vernaculaires, arabe ou amazigh : Kayatta ou jaâida (Maroc) (Bellakhdar, 2006), Djaada (Algérie), Elgaslam et Elhelal (Yémen), Hachichet elrih (Liban) (Quenzel, 1963) et Tif telba (Amzigh-Maroc).

#### 1.2 Habitat et répartition géographique

*T. polium* est présentée dans la majorité des pays du Moyen-Orient et de la Méditerranée (Lemoine, 2005). C'est une plante commune dans l'atlas saharien, elle pousse dans les lieux rocaillieux et secs, dans les lits arides pierreux et dans les sables (Quenzel, 1963). Une vingtaine de cette espèce pousse spontanément, aux Maroc et prédomine dans la région du moyen Atlas (Sijelmassi, 2000; Bellakhdar, 2006).

#### 1.3 Description botanique

*T. polium* est une plante herbacée vivace souvent pérenne, très parfumée, de 20-40 cm de haut, recouvertes de poils laineux qui lui donnent une couleur grise bleutée (Figure 4). Elle est ramifiée dès la base, avec des feuilles linéaires, vert-grisâtre fortement révolutes sur les marges. Elle est plus ou moins feutrée, ses fleurs sont blanches ou jaunâtres en grappes denses au sommet des rameaux. Ses fleurs ne possèdent qu'une seule lèvre, la lèvre inférieure, regroupant les 5 pétales soudés (Lemoine, 2005). La corolle est blanche, le calice est vert-grisâtre, les inflorescences en têtes compactes et les capituliformes sont situées au sommet des tiges (Quenzel, 1963).

#### 1.4 Taxonomie et systématique

*Teucrium polium* L. est classé comme suit (Caddick *et al.*, 2002) :

- **Règne** : Plantae
- **Sous-règne** : Tracheobionta
- **Division** : Magnoliophyta
- **Embranchement** : Phanérogames

- **Sous Embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones/Magnoliopsida
- **Sous-classe** : Gamopétales/Astéride
- **Ordre** : Tubiflorales/Lamiales
- **Famille** : Labiées/Lamiacée
- **Genre** : *Teucrium*
- **Espèce** : *Teucrium polium* L.



*Figure 4: Aspects morphologiques de l'espèce T. polium L.*

(Photo Yassine El Atki; avril 2015; Lieu: Gourrama-Lahri, Sud-Est Maroc)

### **1.5 Utilisation en médecine traditionnelle**

La germandrée (*T. polium*) est une plante utilisée depuis longtemps comme fébrifuge chez les anciens Égyptiens. Elle a des propriétés communes aux plantes amères et aromatiques, en effet, elle est tonique, appétitive, carminative, fébrifuge et vermifuge. Elle est utilisée, en infusion, en cas de la goutte, des rhumatismes, des mucosités abondantes et dans le cas de la fièvre (Bellakhdar, 2006). En bain de bouche, elle traite les gingivites, et en lotion, elle accélère la cicatrisation des blessures (Debuigne, 1972). Également, la germandrée est utilisée pour traiter les troubles de tube digestif, les douleurs abdominales et dans le cas des bronchites chroniques (Rafieian-Kopaei *et al.*, 2013).

### **1.6 Les propriétés pharmacologiques**

Les études réalisées sur *Teucrium polium* ont révélé nombreux effets pharmacologiques tels que, antimicrobiens, antioxydants (Belmekki *et al.*, 2013 ; El Atki *et al.*, 2019) anticancéreux (Al-Shalabi *et al.*, 2020), anti-inflammatoires (Menichini *et al.*, 2009), antispasmodiques, anti-nociceptives (Parsaee *et al.*, 2006) hypoglycémiques et insulinothropes (Kasabri *et al.*, 2011)

hypolipidémiques (Rasekh *et al.*, 2001), neuroprotecteurs (Schröder *et al.*, 2013) et antipyrétiques (Kabouche *et al.*, 2007).

### **1.7 Données phytochimiques**

Les études antérieures réalisées sur les parties aériennes de *T. polium* ont montré que les extraits de cette plante contiennent les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins (Parsae *et al.*, 2006), les saponines, les stéroïdes, les alcaloïdes (Sharififar *et al.*, 2009) et les diterpénoïdes avec un squelette neoclerodane (Fiorentino *et al.*, 2011). D'autres études ont révélé que l'huile essentielle de cette plante comprend principalement les monoterpènes sesquiterpènes, hydrocarbures et les sesquiterpènes oxygénés (Djabou *et al.*, 2012; Djabou *et al.*, 2013; Fertout-Mouri *et al.*, 2017), dont le  $\alpha$ -cadinol, le 3  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -muurolène sont les composés majoritaires de *T. polium* ssp. *aurasicum* tandis que le caryophyllène et le carvacrol sont les principaux constituants de l'HE de *T. polium* ssp. *Capitatum* (Menichini *et al.*, 2009).

### **1.8 Données toxicologiques**

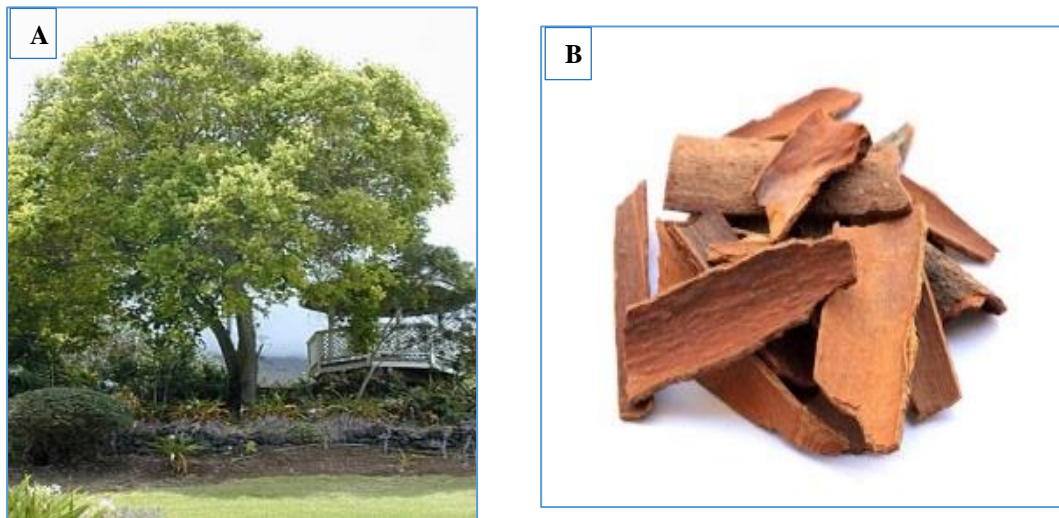
Selon l'étude de Fiorentino *et al.* (2011), l'extrait de *T. polium* induit une nécrose hépatique. Ainsi, le même effet est également obtenu par l'administration d'un extrait enrichi en diterpènes. D'autre part, le dosage cytotoxique in vitro sur trois lignées de cellules cancéreuses humaines a montré que l'HE de *T. polium* ssp. *Capitatum* possède un effet antiprolifératif avec une DL50 de l'ordre 52,7  $\mu\text{g/mL}$  (Elmasri *et al.*, 2016). En plus Al-Shalabi *et al.* (2020) ont testé l'effet cytotoxique de Cirsiliol (une molécule extraite à partir de *T. polium*) sur des cellules de cancer du sein MCF-7, les résultats montrent une cytotoxicité dose-dépendante du Cirsiliol avec une IC50 de 53  $\mu\text{M}$ , l'HE *Teucrium polium*. (Baradaran *et al.*, 2013) ont montré que l'administration intrapéritonéale d'un extrait hydroalcoolique de *T. polium* pendant 28 jours chez les rats provoque des lésions rénales, y compris la destruction, vacuolisation et la dégénérescence des reins.

## **2 Cinnamomum Cassia**

La Cannelle (*Cinnamomum cassia*) est un arbre de grande taille peut atteindre 7 à 16 mètres de haut à l'état sauvage. En culture il le maintient à l'état de sous-arbrisseau buissonneux de 2 à 3 mètres. L'écorce du tronc, rugueuse et épaisse, est d'abord verdâtre puis devient brun rougeâtre.

## 2.1 Répartition géographique

La cannelle est présentée dans la Chine, Laos, l'Inde et dans l'Indonésie. Il pousse dans un climat humide et chaud (Wichtl *et al.*, 2003). Le cannelier sauvage se développe dans des forêts tropicales humides jusqu'à une altitude de 1800 m. Le cannelier de culture pousse bien à 300-350 m. Sa culture nécessite une pluviométrie de 1500-2500 mm et une température moyenne de 26 °C à 30 °C et un sol sablonneux avec une incorporation d'humus pour obtenir une écorce douce et odorante. La proximité de la mer est le milieu favorable pour sa culture (Joy *et al.*, 1998).



*Figure 5 : Cinnamomum Cassia ; A : l'arbre ; B : les écorces*

## 2.2 Taxonomie et systématique

Selon (Cortella *et al.*, 1994), *Cinnamomum cassia* est classé comme suit :

- **Règne** : Planta.
- **Embranchement** : Spermaphytes.
- **Sous embranchement** : Angiospermes.
- **Classe** : Dicotylédones.
- **Famille** : Lauracée.
- **Genre** : *Cinnamomum*.
- **Espèce** : *Cinnamomum cassia*.

## 2.3 Usage traditionnel

La cannelle est la plus ancienne des épices. Les romains et les Grecs lui reconnaissent des propriétés stomachiques, diurétiques, toniques et antiseptiques (Bandara, Uluwaduge et Jansz 2012). De nos jours, elle est utilisée en grande partie dans l'art culinaire. Aussi, son huile essentielle est utilisée pour stimuler le système immunitaire et contre les états grippaux, les douleurs et les fièvres (Hul *et al.*, 2017).

## **2.4 Propriétés pharmacologiques**

Les épices sont souvent employées dans l'alimentation comme exhausteur de goût et d'arôme. Mais il semble que certaines épices et notamment l'écorce de la cannelle présentent divers effets thérapeutiques.

### ➤ *Antidiabétique*

La cannelle joue un rôle sur le métabolisme du glucose. Une étude récente a montré que le composé actif de la cannelle est un polyphénol trimère de procyanidine (Anderson *et al.*, 2004). Ce dernier se comporte comme un mimétique de l'insuline en déclenchant la même chaîne de réaction biochimique et en stimulant la synthèse du glycogène. Cependant, ce polyphénol a un effet synergique avec l'insuline sur les enzymes responsables de la phosphorylation-déphosphorylation des récepteurs de l'insuline au niveau des tissus utilisateurs de glucose (Hul *et al.*, 2017). Une étude clinique concernant l'effet de l'administration de 500 mg de l'extrait de cannelle pendant 2 mois sur des adultes présentant une glycémie élevée, a montré une réduction du taux de cholestérol total, de cholestérol LDL et de glycémie (Anderson *et al.*, 2016).

### ➤ *Anti-infectieux*

L'huile essentielle de l'écorce de cannelle a fait ses preuves comme agent antiseptique, antimicrobien. Elle présente un large spectre, agissant sur des germes particulièrement résistants aux traitements classiques à savoir, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillusjlavus* et *Cryptococcus néoformans* (Cox *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2006; Firmino *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2011). Ces propriétés sont dues principalement au cinnamaldéhyde qui est le composé majoritaire de cette l'huile essentielle (Lee *et al.*, 2020).

### ➤ *Propriétés anti-inflammatoires*

De nombreuses recherches mettent en évidence l'effet anti-inflammatoire de la cannelle. Gunawardena *et al.* (2015), ont révélé que les extraits de cannelle et leurs constituants majoritaires, E-cinnamaldehyde et o-methoxycinnamaldehyde sont des agents anti-inflammatoires puissants. Dans une autre étude, la même équipe de recherche a montré que la cannelle du Sri Lanka est l'aliment anti-inflammatoire le plus puissant parmi 115 aliments testés (Gunawardena *et al.*, 2014). Une autre contribution a testé l'effet de la cannelle sur le facteur de nécrose tumorale (TNF)  $\alpha$  entraîné par les lipopolysaccharides (LPS), les résultats montrant que l'administration, par voie orale de l'extrait aqueux de cannelle chez les souris, induit une

inhibition du gène (TNF)  $-\alpha$  via la modulation de la dégradation de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  et l'activation de JNK, p38 et ERK1/2 (Hong *et al.*, 2012).

➤ **Activité antitumorale**

Plusieurs recherches mettent en évidence l'effet des extraits de la cannelle sur les différents types de cancers (Lin *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017). L'extrait de la cannelle réduit la prolifération des cellules cancéreuses du colon DLD-1, COLO 201 et module la progression de leur cycle cellulaire via l'arrêt du G2/M, couplé à une réduction des cellules en phase S (Carriere *et al.*, 2017). Récemment une équipe chinoise, en testant *in vitro* l'extrait de la cannelle sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines, HeL et HL-60, montre que l'extrait inhibe la prolifération des cellules tumorales d'une manière dépendante de la dose par la réduction de l'expression des protéines cycline A, cycline B1, ERK2 et p-ERK (Xie *et al.*, 2018). Ainsi, la cannelle réduit la prolifération des cellules cancéreuses via nombreuses voies liées à l'apoptose (Sadeghi *et al.*, 2019).

## **2.5 Données toxicologiques**

La toxicité de la cannelle se rencontre principalement chez les personnes qui sont exposées à la cannelle en poudre, principalement, dans les ateliers de transformation. Mais également chez les grossistes d'épices. La toxicité de l'huile essentielle de cannelle semble liée au cinnamaldéhyde. En effet, le cinnamaldéhyde est métabolisé en acide cinnamique puis dégradé en acide benzoïque, ce qui diversifie le risque toxique (Gonçalves *et al.*, 2019).

## Chapitre 3 : Antibiotiques et résistance microbienne

### 1 Antibiotiques

Un antibiotique est défini comme étant une substance organique capable de tuer les bactéries sensibles (antibiotique bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (antibiotique bactériostatique) (Waksman, 1947). L'étendue du potentiel antibactérien d'un antibiotique définit son spectre d'action. En effet, Plus un antibiotique agit sur différents microorganismes, plus son spectre d'action est large. Les antibiotiques sont généralement produits par des microorganismes, mais certains sont synthétiques. Néanmoins, les antibiotiques d'origine naturelle peuvent être modifiés chimiquement et ils deviennent alors hémisynthétiques (Bhardwaj *et al.*, 2016).

#### 1.1 Antibiotiques et leurs cibles dans les cellules bactériennes

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques bactériennes. L'antibiotique peut attaquer la paroi bactérienne ou inhiber la synthèse des protéines, entraînant un arrêt progressif de la croissance jusqu'à la mort cellulaire. Il peut aussi prévenir la biosynthèse du matériel génétique (ADN et ARN) et interférer avec les processus liés à la synthèse de l'ADN (Figure 6). La complexité structurale et la variabilité des groupements fonctionnels des antibiotiques, leur permettent d'établir des interactions spécifiques avec leurs cibles bactériennes. Cette spécificité est liée à la capacité d'adaptation des bactéries et participe à la sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques (Singh *et al.*, 2006).

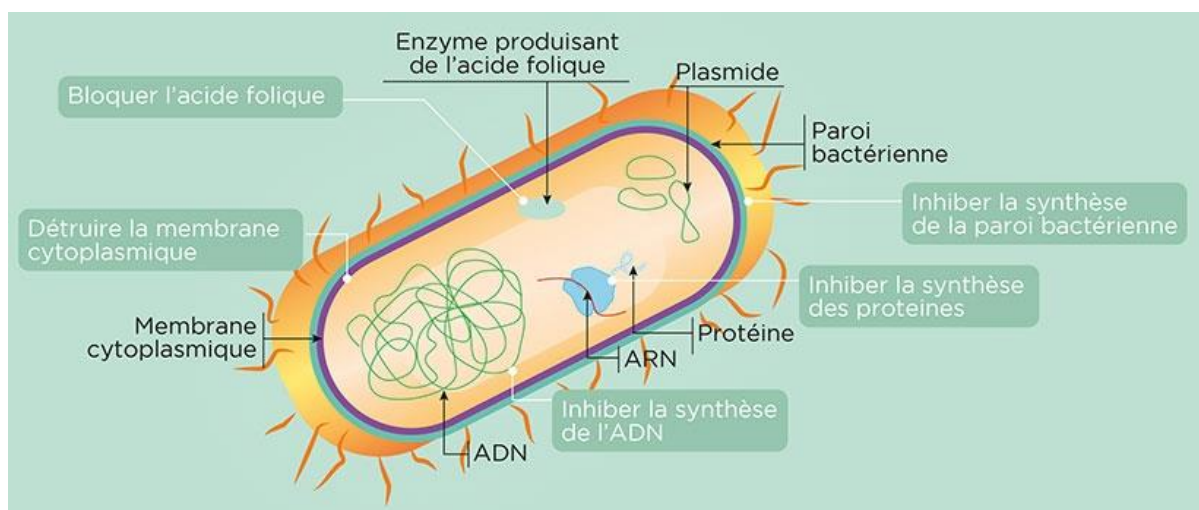


Figure 6: Représentation schématique du mode d'action des antibiotiques

## **1.2 Résistance des bactéries aux antibiotiques**

Après une période de forte efficacité contre les infections bactériennes, les antibiotiques se présentent de moins en moins efficaces contre certaines maladies infectieuses. Depuis 1940, juste après la découverte de la pénicilline, une étude avait mis en évidence la présence de résistance à cet antibiotique chez la bactérie *Escherichia coli* (Abraham *et al.*, 1940). Actuellement, la résistance bactérienne est connue pour toutes les familles d'antibiotiques. Les bactéries développent une résistance par l'incorporation dans leurs gènes d'un facteur de résistance pour échapper à l'action des antibiotiques (Bush *et al.*, 2011). Cette résistance peut être transmise rapidement à d'autres espèces bactériennes via l'intermédiaire des fragments de chromosome. Elle est exprimée par une augmentation de la vitesse d'absorption cellulaire ou de décharge hors de la cellule, ce qui limite la concentration et le temps d'existence de l'antibiotique dans la cellule, ou la production d'enzymes qui rendent l'antibiotique inefficace (Hamilton-Miller, 2004). Il existe deux types de résistances bactériennes : la résistance naturelle et la résistance acquise.

### **1.2.1 Résistance naturelle**

Une résistance naturelle survient lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à une famille d'antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques de pénétrer à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs qui conditionnent la résistance naturelle. C'est le cas des bacilles à Gram négatif, présente une résistance naturelle aux antibiotiques hydrophobes, car ces derniers ont des difficultés à franchir la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes (bactéries dépourvues de parois) résistent naturellement aux  $\beta$ -lactames, puisque le mécanisme d'action de ces molécules consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (Alekhun *et al.*, 2007).

### **1.2.2 La résistance acquise**

La résistance acquise à un antibiotique apparaît lorsque quelques souches d'une même espèce, habituellement sensibles à cet antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut s'effectuer par acquisition des gènes transférés d'une autre bactérie ou par mutation. Le transfert des gènes de résistance peut se faire au sein d'une même espèce bactérienne, mais aussi d'une espèce à l'autre (Alekhun *et al.*, 2007). Les souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine ont acquis cette propriété grâce à un transfert plasmidique de l'opéron vanA, effectué par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble *et al.*, 1992).

## **2 Mécanismes de résistance bactérienne**

Les bactéries ont développé divers mécanismes pour échapper à l'action de l'antibiotique. Soit par la production d'enzymes qui empêchent l'action des antibiotiques, par la modification des cibles de ces derniers ou par la réduction des concentrations intracellulaires des antibiotiques.

### **2.1 Modification de l'antibiotique**

Plusieurs enzymes peuvent modifier les antibiotiques, à savoir les chloramphénicol acétyl-transférases, les enzymes modifiant les aminoglycosides et les bêta-lactamases. En général, ces enzymes confèrent un niveau élevé de résistance aux antibiotiques contre lesquels ils sont actifs (Walsh, 2000). À titre d'exemple, *E. coli* résiste à l'action de l'ampicilline par l'expression de TEM-1  $\beta$ -lactamase qui est capable d'augmenter la concentration minimale inhibitrice de cet antibiotique (Azita *et al.*, 2019).

### **2.2 Modification de la cible**

La modification de la cible entraîne une diminution ou une perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible via l'apparition de nouvelles molécules assumant les fonctions de cible, mais avec une structure n'ayant pas d'affinité pour l'antibiotique (Walsh, 2000). Par exemple, la résistance aux  $\beta$ -lactames chez les bactéries Gram positif peut s'effectuer par modification des PBPs (penicillin-binding proteins), ce qui affecte l'affinité de ces cibles pour les  $\beta$ -lactames (Malouin *et al.*, 1986). D'autres exemples concernent la résistance aux glycopeptides par l'altération des précurseurs de la paroi cellulaire, la résistance aux fluoroquinolones par la mutation de la topoisomerase IV et de l'ADN, la résistance à la rifampicine par les mutations de l'ARN polymérase (Lambert, 2005).

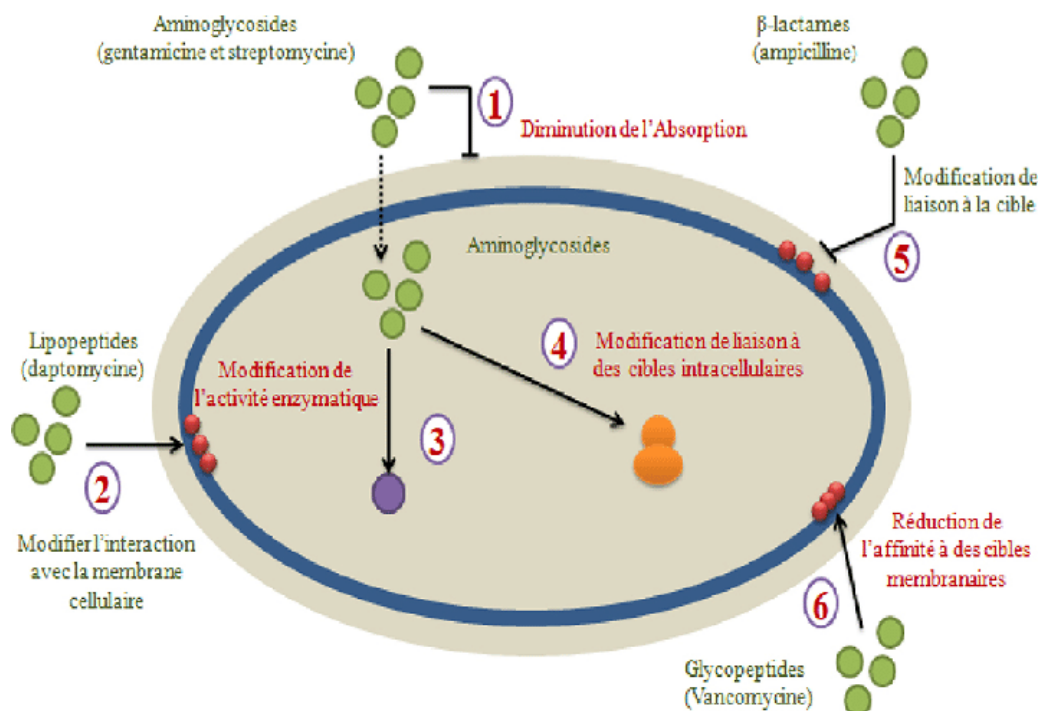
### **2.3 Accessibilité réduite de la cible**

L'antibiotique doit atteindre la cible pour agir et lorsqu'il doit traverser des barrières pour y arriver, celles-ci constituent un mécanisme de résistance efficace. Toutes les bactéries gram négatif ont une membrane externe qui doit être franchie avant d'atteindre la membrane cytoplasmique. Il a été reporté que la réduction des purines contribue à la résistance à certains antibiotiques. Dans beaucoup de cas, cette accessibilité réduite doit être associée à la production d'au moins une  $\beta$ -lactamase pour obtenir un niveau élevé de résistance aux  $\beta$ -lactames (Bouyahya *et al.*, 2017). Les barrières d'entrée peuvent aussi exister dans la membrane cytoplasmique. Le mouvement des aminoglycosides à travers la membrane cytoplasmique est

un processus oxygénodépendant, ainsi ces antibiotiques sont-ils inactifs dans un environnement anaérobie (Azita *et al.*, 2019).

## 2.4 Réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique.

Ce mécanisme peut être dû à une imperméabilité membranaire et/ou une exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces dernières sont spécifiques d'une famille d'antibiotiques ou au contraire responsables de la résistance bactérienne; pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par hydrolyse d'ATP ou encore par dissipation d'un gradient de protons ou d'ions sodium (Cattoir, 2004).



**Figure 7: Représentation schématique du mécanisme 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. (6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires.

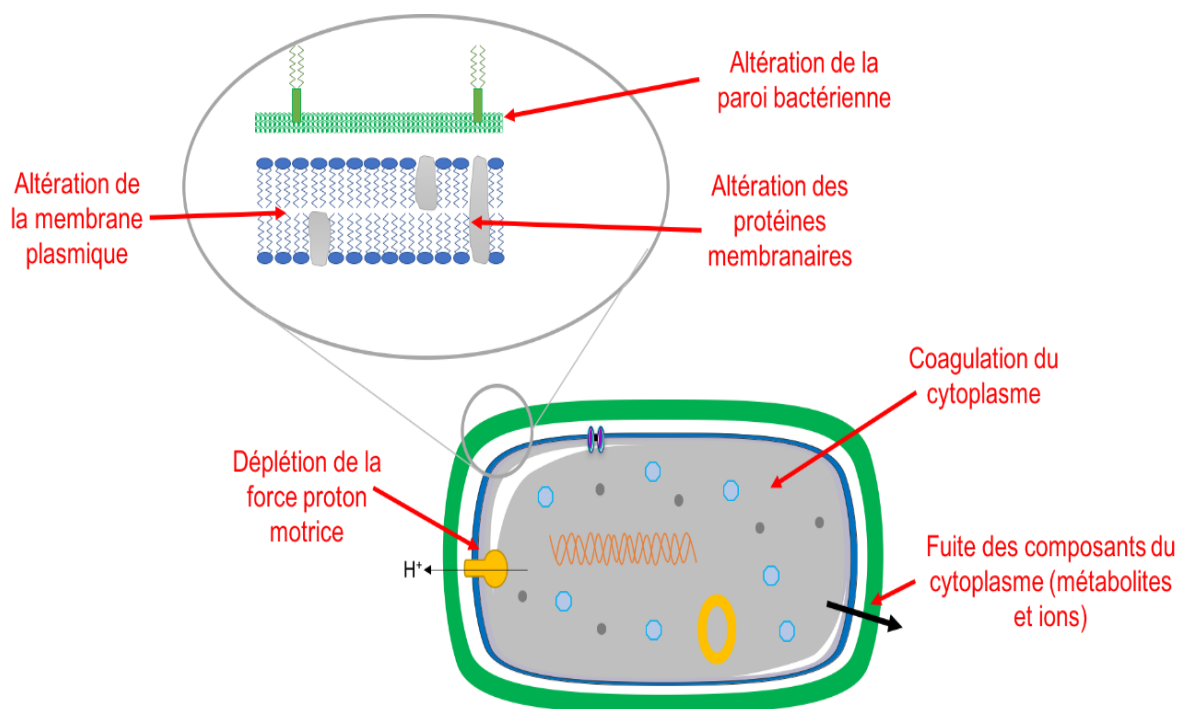
## 3 Les plantes et la lutte contre la résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance des bactéries aux antibiotiques et leurs effets secondaires nécessitent l'orientation des recherches vers la découverte de nouvelles voies alternatives qui constituent une source d'inspiration de nouveaux composés antibactériens. Ces composés peuvent être recherchés dans les plantes médicinales et aromatiques notamment dans les huiles essentielles, car celles-ci constituent une source potentielle de composés inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques. Ces substances agissent suivant nombreux mécanismes (Bouyahya *et al.*, 2017) :

- rupture de membranes bactériennes;
- formation de complexes avec des macromolécules comme les protéines et les polysaccharides en inhibant leurs fonctions ;
- inhibition de l'adhésion des protéines bactériennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les bactéries, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses familles phytochimiques :

- inhibiteurs des pompes à efflux (flavonoïdes, alcaloïdes) ;
- inhibiteurs des PBP 2a (quinones, terpénoïdes) induisant la perméabilité des membranes bactériennes (terpénoïdes) ;
- inhibiteurs des bêtalactamases (alkyls gallates).



*Figure 8: Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les bactéries (Bouyahya et al., 2017).*

## **Chapitre 4 : Le stress oxydatif et les antioxydants**

### **1 Généralité**

Les substances antioxydantes jouent un rôle majeur dans le métabolisme humain. En effet, les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une action néfaste sur le système cellulaire, en l'endommageant et en accélérant le processus de vieillissement (Schlienger, 2018). Généralement, l'organisme humain maintient l'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants en produisant simultanément les deux types de types composés dans le processus métabolique. Un déséquilibre entre la production de ces deux de substances conduites à un phénomène appelé stress oxydatif (Leverve, 2009). Les antioxydants constituent la stratégie préventive la plus prometteuse contre l'apparition du stress oxydatif. En plus, il existe d'autres antioxydants que ceux produits par l'organisme pour sa défense, qualifiés comme antioxydants synthétiques (Barreira *et al.*, 2019). Toutefois récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité et les effets secondaires des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, tels que, le butylhydroxytoluène (BHT), le tert-butylhydroquinone (TBHQ) et l'hydroxyanisol butyle (BHA) (Yang *et al.*, 2018; Barreira *et al.*, 2019). La nécessité de réduire l'utilisation de ce type d'antioxydants exige d'orienter le marché vers les antioxydants d'origine naturelle. Les plantes représentent une source très riche et inépuisable de composés antioxydants naturels (Ervina *et al.*, 2019; Sontakke *et al.*, 2019).

### **2 Stress oxydatif**

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd B., 2003). Cette production augmente en fonction avec l'élévation de la consommation d'oxygène. Dans l'organisme une production physiologique de radicaux libres se fait de manière continue. Une surproduction de ces radicaux est possible dans des conditions pathologiques ou peut être provoquées par des facteurs exogènes. Ce sont les antioxydants qui peuvent empêcher les dégâts cellulaires causés par les radicaux libres de l'oxygène (Valko *et al.*, 2007).

### **3 Les radicaux libres**

Un radical libre est une molécule instable possédant un électron célibataire sur sa couche électronique externe (Borg, 2008). Cette molécule est instable et réagit rapidement avec d'autres molécules, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité. En effet,

une chaîne de réactions débute lorsqu'un radical libre attaque le composé stable le plus proche en lui arrachant son électron, et le composé attaqué devient un radical libre (Żukowski *et al.*, 2018).

### **3.1 Espèces réactives de l'oxygène (ERO)**

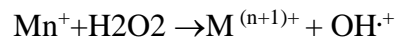
Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. Les principales ERO sont :

➤ ***Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )***

Il est formé par l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. La chaîne respiratoire mitochondriale est l'origine principale de ce radical. Malgré sa réactivité moyenne, il entre comme agent oxydant dans la plupart des réactions (Antwerpen, 2006).

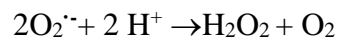
➤ ***Le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ )***

Il est principalement obtenu lors des réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène (Borg, 2008).



➤ ***Le radical perhydroxyle ( $HO_2^{\cdot}$ )***

Il est le résultat d'une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par le superoxyde dismutase (SOD).



Malgré sa faible réactivité, il possède une capacité de diffusion importante (Borg, 2008).

➤ ***Autres radicaux***

Le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ) (Borg, 2008).

## **4 Les antioxydants**

Un antioxydant est défini comme étant toute substance capable d'inhiber directement la production, d'empêcher la propagation ou de détruire les radicaux libres (Martelli, 2018). En d'autres termes, un antioxydant est une molécule ou un ensemble de molécules, en faible concentration comparativement à la concentration des substances oxydables telles les espèces réactives de l'oxygène (ERO), prévient ou retarde l'oxydation des substrats (les protéines, les lipides, les carbohydrates et l'ADN) (Leverve, 2009).

Les antioxydants peuvent agir en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation ou en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Les antioxydants agissent selon deux mécanismes :

- Ils neutralisent les radicaux libres et limitent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.
- Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O) et ils réduisent la vitesse de génération des radicaux libres (Defraigne *et al.*, 2008).

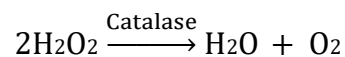
#### **4.1 Les antioxydants endogènes**

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : la catalase, le superoxyde dismutase (SOD), et le glutathion peroxydase (Gpx).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

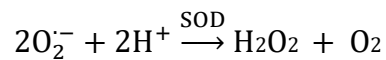
##### **4.1.1 La catalase**

La catalase se retrouve essentiellement dans les peroxysomes. Elle permet de transformer deux molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui sont des composés stables pour limiter l'accumulation du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction de dismutation (Borg, 2008).



##### **4.1.2 Le superoxyde dismutase (SOD)**

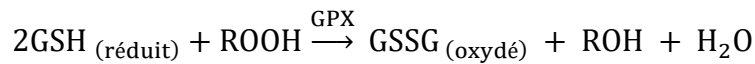
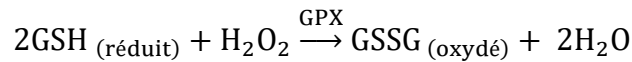
Le rôle du superoxyde dismutase, est d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, pour produire de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).



##### **4.1.3 Le glutathion peroxydase**

Le glutathion peroxydase est l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection, car elle est susceptible de neutraliser le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (ROOH) résultant de l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018). Cette enzyme se localise dans les mitochondries et dans le cytoplasme cellulaire,

elle nécessite principalement l'existence de deux cofacteurs : le glutathion réduit et le sélénium (Valko *et al.*, 2007).



#### **4.1.4 Les chélateurs de métaux**

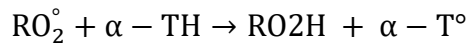
Plusieurs protéines circulant dans le sérum peuvent prendre en charge d'ions métalliques libres qui sont potentiellement toxiques, comme la lactoferrine et la transferrine pour le fer et la céruléoplasmine pour le cuivre. Ces protéines agissent comme des chélateurs ions métalliques et les maintiennent sous une forme inactive (Mirończuk-Chodakowska *et al.*, 2018).

### **4.2 Les antioxydants exogènes**

De nombreuses substances issues de notre alimentation : les vitamines, les nutriments, les composés naturels, sont considérés comme des antioxydants, parmi les plus courants nous citons :

#### **4.2.1 Vitamine E ( $\alpha$ Tocophérol)**

La vitamine E est un antioxydant liposoluble, elle se trouve entre les lipoprotéines et les chaînes d'acides gras des phospholipides membranaires. Le rôle principal de la vitamine E est d'inhiber la peroxydation lipidique (Stinco *et al.*, 2016). Pendant la réaction antioxydante, le  $\alpha$ -tocophérol est converti en radical  $\alpha$ -tocophérol en perdant un hydrogène arraché par une molécule radicalaire (Valko *et al.*, 2007).



#### **4.2.2 Vitamine C (acide ascorbique)**

L'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble, son pouvoir antioxydant est attribué à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton (Stinco *et al.*, 2016). Il réagit avec les radical hydroxyle, le radical superoxyde et les radicaux peroxydes (Valko *et al.*, 2007).

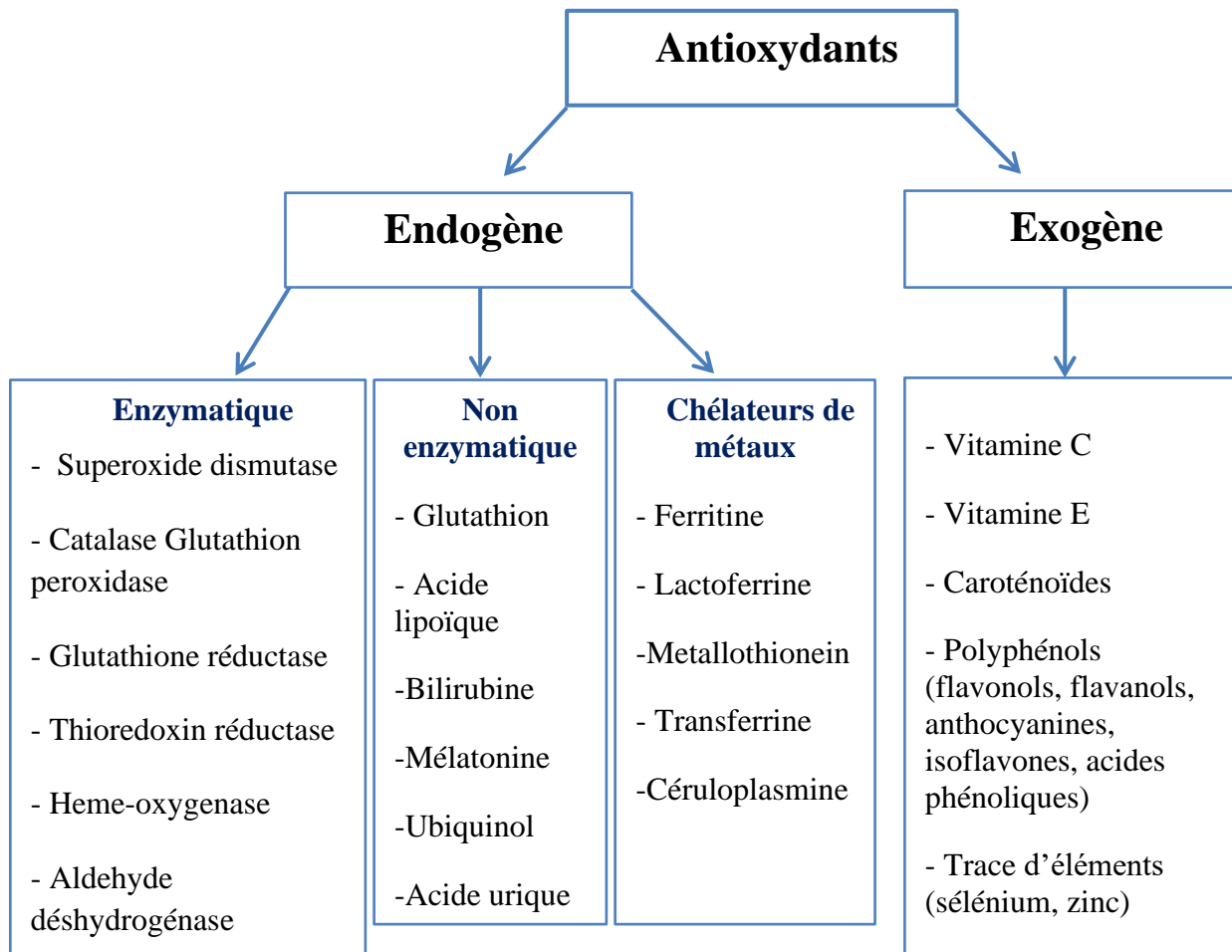


Figure 9: Les antioxydant endogènes et exogènes (Da Costa *et al.*, 2012).

### 4.3 Antioxydants d'origine végétale

Les plantes constituent une source importante de molécules antioxydantes, ces dernières ont le rôle d'assurer la protection de la plante contre le stress oxydatif (Moure *et al.*, 2001). Plusieurs recherches s'intéressent très particulièrement à l'étude des propriétés antioxydantes des plantes. En effet, l'utilisation des extraits de plantes est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour préserver les aliments. Ainsi, il a été démontré que plusieurs antioxydants d'origine végétale avaient des propriétés médicinales, comme : anti-cancérigène, anti-inflammatoire (Martelli *et al.*, 2018).

Les composés phénoliques et les caroténoïdes constituent de vastes familles de ces antioxydants parmi lesquels se trouvent l'acide caféique, la quercétine et le  $\beta$ -carotène. Les polyphénols sont des antioxydants, très utilisés dans la médecine traditionnelle et moderne pour leur activité antioxydante (Martins *et al.*, 2016). Les composés phénoliques agissent comme des agents réducteurs, donneur d'hydrogène en piégeant les radicaux libres et en chélatant les ions, par leur propriété redox la plus élevée (Martelli *et al.*, 2018). Les caroténoïdes ce sont des

pigments issus des plantes et microorganismes, ils permettent spécialement de neutraliser l'oxygène singulet (Valko *et al.*, 2007), ce qui leur permet d'exercer une protection contre des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Albert *et al.*, 2003).

## **5 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro**

Diverses méthodes, sont disponibles pour évaluer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques, on peut les classer en deux catégories selon deux mécanismes : soit par le transfert d'un électron soit par le transfert d'atome d'hydrogène (Huang *et al.*, 2005).

Les méthodes de la première catégorie sont utilisées pour mesurer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipoprotéique ou lipidique. La quantification de cette activité est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sueishi *et al.*, 2019). Cependant, les méthodes de la deuxième catégorie sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habilité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle •OH des anions superoxyde (O<sup>•</sup><sub>2</sub>), du peroxyde (ROO•) et de l'oxyde nitrique (NO) (Sanchez-Moreno, 2002).

Parmi les méthodes de l'activité antioxydante, nous citons :

- Capacité antioxydante totale de réduction du Bipyrene ferrique (FBRC) (Naji *et al.*, 2020)
- la méthode de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Hui-Chun Wu *et al.*, 2003);
- le test de blanchissement du β-carotène (Miraliakbari *et al.*, 2008)
- le test d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (Ou *et al.*, 2001).
- l'essai d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (Adedapo *et al.*, 2008).
- la méthode du pouvoir réducteur de fer (FRAP) (Oyaizu, 1986);
- le test de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl-phénylènediamine) (Schlesier *et al.*, 2002).
- la méthode de phosphomolybdène ou la capacité antioxydante totale (Prieto & Aguilar, 1999)
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (Maffei Facino *et al.*, 1993).
- le test TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (Lissi *et al.*, 1995).
- le test photochimiluminescence (PCL) (Maffei Facino *et al.*, 1993).

## **Chapitre 5 : Les Diurétiques**

### **1 Rappel sur l'anatomie et la physiologie rénale**

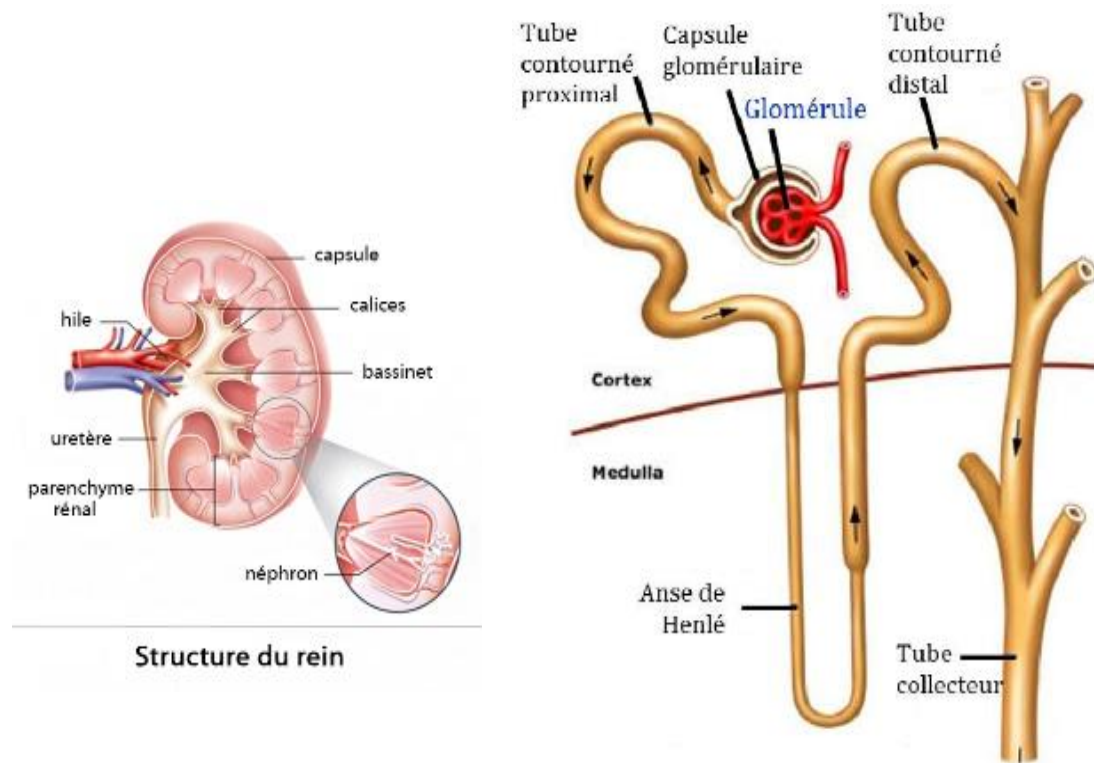
L'analyse anatomique du rein indique qu'il est constitué de nombreux organites élémentaires. Chaque rein contient environ un million de néphrons, dont chacun est constitué d'un glomérule, siège de l'ultrafiltration du plasma sanguin (formation de l'urine primitive) et d'un tube urinifère (Lüllmann *et al.*, 2010).

Les reins sont des organes complexes essentiels dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Ils sont responsables de la formation de l'urine et de l'excrétion des déchets, on parle de la fonction exocrine, mais ils agissent aussi comme des glandes endocrines (Lüllmann *et al.*, 2010).

#### **1.1 Le néphron**

Le néphron est un ensemble d'unités fonctionnelles et structurales du rein qui contribuent à la production de l'urine. Il est constitué de deux parties principales ; le corpuscule rénal dans lequel s'effectue la filtration du plasma et le tube rénal où se passe le liquide. Ce dernier, subdivisé en plusieurs segments (Figure 10) (Masson, 2009):

- le tubule contourné proximal, qui fait suite à la capsule glomérulaire, il est situé dans le cortex et il a une forme sinueuse ;
- l'anse de Henlé : il prend une forme de U et descend dans la médulle. Il est constitué d'un segment ascendant qui remonte jusqu' au cortex et segment descendant ;
- le tubule contourné distal. Plusieurs néphrons sont reliés à un tube collecteur. À leur tour, ces derniers fusionnent pour former un conduit papillaire (Figure 10).



*Figure 10: Structure de base du rein et néphron*

### 1.1.1 Fonction du néphron

Le néphron, l'unité fonctionnelle du rein, assure trois fonctions principales : la filtration glomérulaire, la réabsorption et la sécrétion tubulaires (Silbernagl *et al.*, 2001).

#### ➤ *Filtration glomérulaire*

La filtration glomérulaire du plasma aboutit à la formation de l'urine primitive. La membrane de filtration du glomérule laisse librement le passage du plasma vers la chambre glomérulaire. Ainsi, le filtrat glomérulaire produit se retrouve dans la chambre glomérulaire, qui s'abouche au tubule contourné proximal (Lüllmann *et al.*, 2010).

#### ➤ *Réabsorption*

La réabsorption assure le passage de substances de la lumière tubulaire vers l'espace interstitiel ensuite vers les capillaires péri-tubulaires. Elle concerne les substances utiles à l'organisme qui ne doivent pas être éliminées, comme, le sodium, l'eau, le glucose ou les acides aminés. À partir de 180 L filtrés, environ 178,1 L sont réabsorbés, le reste est éliminé sous forme d'urine (Marieb, 2000).

La réabsorption du sodium débute aussitôt que le filtrat pénètre dans le tubule contourné proximal. La réabsorption iso-osmotique du sodium au niveau du tubule contourné proximal peut atteindre 70%, et elle entraîne une réabsorption passive de l'eau. Au niveau du segment large ascendant de l'anse de Henlé, le sodium réabsorbé par symport  $Na^+2Cl^- K^+$  peut atteindre 25% (Lüllmann *et al.*, 2010). La réabsorption du  $Na^+$  se poursuit au niveau du tube distal par un cotransport  $Na^+/Cl^-$ . Au niveau du tube collecteur, la réabsorption de sodium s'effectue passivement par des canaux  $Na^+$  qui peuvent être activés par l'hormone antidiurétique et l'aldostérone (Haïdara, 2008).

➤ **Sécrétion tubulaire**

La sécrétion est le phénomène inverse de la réabsorption. Les substances sécrétées vont des cellules tubulaires vers la lumière tubulaire ou des capillaires vers de l'espace interstitiel. Les principales substances éliminées par ce processus sont, d'hydrogène ( $H^+$ ), le potassium ( $K^+$ ), créatinine, l'urée et l'acide urique. La sécrétion est un phénomène essentiel dans l'élimination de certains médicament ou substances toxiques, qui ne se trouvent pas déjà dans le filtrat, ou dans la régulation du pH sanguin (Johanna, 2013).

## **2 Les diurétiques**

Les diurétiques sont des substances, capable d'augmenter l'excrétion urinaire du sodium ( $Na^+$ ) par la diminution de sa réabsorption, l'augmentation de la charge de sodium filtré ou par une association des deux effets. Les diurétiques peuvent modifier également l'excrétion urinaire d'autres électrolytes, notamment du calcium, du potassium, des chlorures, du magnésium et des proton (Nakano *et al.*, 2020). L'augmentation de l'excrétion urinaire du  $Na^+$  est toujours associée à une augmentation du volume urinaire (Lüllmann *et al.*, 2010).

### **2.1 La diurèse**

Diurèse est défini comme étant le processus physiologique qui permet l'excrétion du de l'eau et de sel, l'élimination des produits terminaux du métabolisme et les substances étrangères, pour maintenir la composition chimique du milieu intérieur constante, on parle donc de l'homéostasie interne (P. Hallouët *et al.*, 2009).

### **2.2 Classification des diurétiques**

La classification des diurétiques s'effectue selon leur structure chimique, leur potentiel diurétique, leurs sites d'actions à l'intérieur du néphron (Figure 11).

➤ **Les diurétiques osmotiques**

Les diurétiques osmotiques n'interagissent pas directement avec des mécanismes de transport mais agissent comme des substances osmotiques au niveau tubulaire. Quand le diurétique osmotique administré, il est filtré mais très peu réabsorbé à cause de sa faible capacité à pénétrer les membranes lumineales. Il fixe les molécules d'eau et les retient dans la lumière tubulaire pour empêcher la diminution de de la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Le mannitol et le sorbitol sont des diurétiques les plus connus de cette classe (Alonso-Castro *et al.*, 2019).

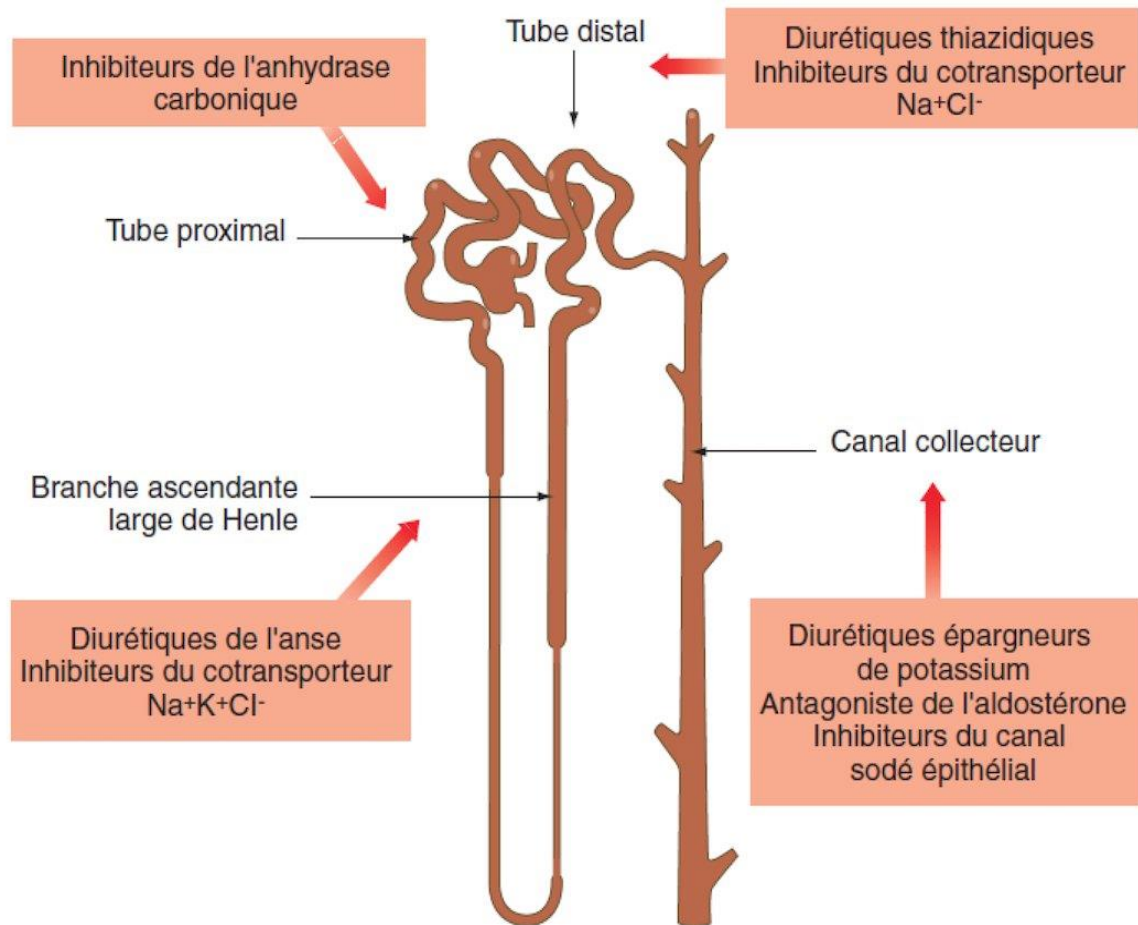


Figure 11: Sites d'action des diurétiques

➤ **Les diurétiques de l'anse**

Cette classe de diurétiques agissent au niveau de la partie ascendante de l'anse de Henlé en inhibant la réabsorption de l'eau et des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  (Funk-Brentano *et al.*, 2011). Cette famille est caractérisée par une haute efficacité un effet rapide. Le furosémide est le médicament plus connu de cette classe (Wile, 2012).

➤ ***Diurétiques thiazidiques***

Ce sont des diurétiques qui agissent essentiellement au niveau de la partie initial du tube contourné distal par l'inhibition du cotransport  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ , ce qui entraîne à une rétention d'eau dans l'urine (Funck-Brentano *et al.*, 2011). Ils conduisent à une hypokaliémie et stimulent la réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'excrétion urinaire de  $\text{K}^+$  (Jardim *et al.*, 2018).

➤ ***Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique***

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique agissent généralement au niveau du tube contourné proximale. Ils réduisent la production d'acide carbonique et par conséquent celle des protons. Ce qui entraîne la diminution des échanges  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , la baisse de l'ammonurie et une excrétion importante des bicarbonates. L'acétazolamide représente le diurétique le plus connu de cette famille (Jardim *et al.*, 2018).

➤ ***Diurétiques d'épargne potassique***

Les Diurétiques d'épargne potassique agissent sur la membrane de tube contourné distal et du tube collecteur. Ils épargnent le potassium en bloquant les échanges sodium-potassium et augmentent l'élimination du sodium et à un moindre degré du chlorure et de l'acide carbonique. On distingue deux familles : Les antagonistes de l'aldostérone représentés par l'amiloride ou le ou Modamide et les non antagonistes d'aldostérone (essentiellement le Aldactone ou la spironolactone) (Wile, 2012).

## **2.3 Indications thérapeutiques des diurétiques**

➤ ***L'insuffisance rénale***

L'insuffisance rénale est définie comme une diminution ou un arrêt de la filtration glomérulaire au point que la fonction rénale ne peut plus maintenir l'homéostasie de l'organisme. Les diurétiques de l'anse de Henlé représentent un traitement chez un patient qui souffrent une insuffisance rénale compliquée (Funck-Brentano *et al.*, 2011).

➤ ***L'insuffisance cardiaque***

Les diurétiques thiazidiques et de l'anse (furosémide) améliorent les variables hémodynamiques et des performances cardiaques. Ils réduisent la précharge sans modifier le débit cardiaque ainsi ils agissent sur la rétention sodée et la volémie, rendant la paroi vasculaire plus sensible à des vasodilatateurs (Silke, 1994).

➤ ***L'hypertension artérielle***

Un adulte est considéré hypertendu si sa pression artérielle est supérieure ou égale à 140/90 mm Hg (Hanon *et al.*, 2004). Les diurétiques constituent des piliers de traitement d'une

hypertension artérielle. Les thiazidiques sont les diurétiques les plus connus contre l'hypertension artérielle, ils favorisent l'élimination urinaire d'eau et du sodium. Entraînant ainsi la diminution du volume sanguin et le débit cardiaque et chutant la pression artérielle (Briet *et al.*, 2009).

#### **2.4 Effets indésirables des diurétiques**

Bien que les diurétiques soient nécessaires pour le maintien de la balance hydro-sodée, mais leur utilisation excessive conduise à une atteinte rénale. Les effets indésirables des diurétiques sont liés souvent à leur mode d'action et à la dose administrée. Ces effets concernent essentiellement, l'hypokaliémie, l'hypercalciurie, l'hypercalcémie, l'hypotension, l'élévation des concentrations plasmatiques d'urée et de créatinine, et l'hyperuricémie (Briet *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2019; Jardim *et al.*, 2018).

### **3 Les plantes et l'effet diurétique**

L'échec des traitements pharmaceutiques classiques, notamment dans le cas de maladies chroniques et l'élévation d'incidence des effets secondaires qui leurs sont associés inquiétaient les chercheurs, ces dernières années, à explorer la nature pour découvrir et développer de nouvelles armes thérapeutiques efficaces, moins agressives pour l'organisme humain. De ce fait, les plantes médicinales peuvent fournir des intérêts considérables dans le développement de stratégies thérapeutiques alternatives aux agents chimiques (Hassan *et al.*, 2020). Plusieurs étude antérieures ont confirmé l'effet diurétique de certaines plantes utilisées en médecine traditionnelle (Al-Saikhan *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2020; Sisay, 2017).



## **Partie II : Matériel et Méthodes**

## **1 Matériel végétal**

Les parties aériennes de *T. polium ssp. polium* et *T. polium ssp. aureum* ont été récoltées durant la période de floraison, en octobre 2015, dans la région de Gourrama, Lahri (Midelt-Maroc). L'identification botanique des deux plantes a été confirmée par le professeur Amina Bari (Botaniste de la faculté de sciences Dhar Mehraz, Département de biologie, université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès-Maroc). Puis, les plantes récoltées ont été séchées à l'ombre et à l'air libre, pendant deux à trois semaines afin d'éviter d'une part la dégradation des molécules actives et d'autre part l'altération par des bactéries ou des champignons. Tandis que, les écorces de la *Cinnamomum cassia* ont été achetés dans le marché local à Fès.

## **2 Méthodes d'extractions des composés bioactifs**

### **2.1 Extraction des huiles essentielles**

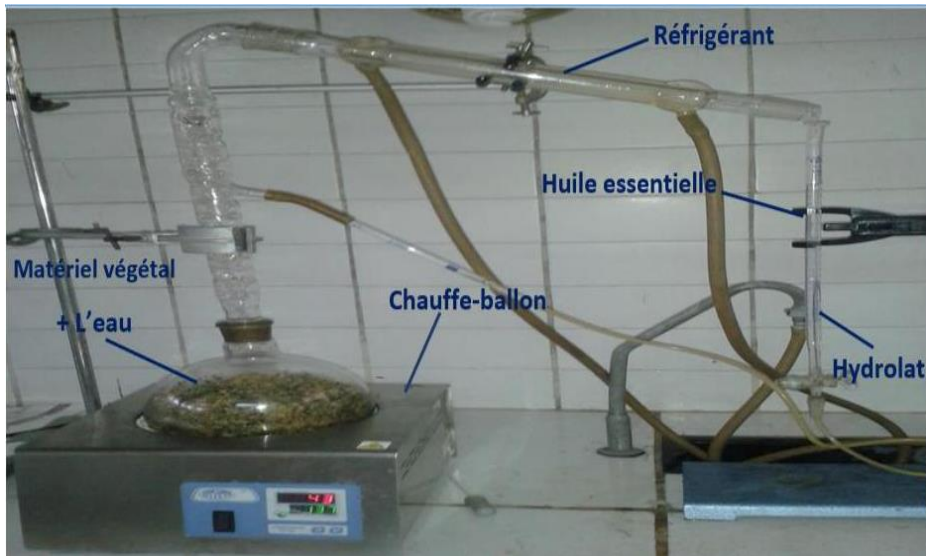
Les huiles essentielles de la partie aérienne de *Teucrium polium* et des écorces de la cannelle ont été extraites par la technique d'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger adapté (Jalal *et al.*, 2015). Cette technique consiste à porter à ébullition, pendant 3 heures, dans un ballon de 2 litres, 800 ml d'eau distillée et 200 g de la plante étudiées. Les cellules végétales, sous l'action de la chaleur, éclatent et libèrent les huiles essentielles. Ces dernières sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis récupérées dans un récipient. Les huiles essentielles obtenues ont été stockées dans des petits flacons hermétiques, dans un réfrigérateur à 4-5 °C, pour l'analyse chimique et les tests biologiques.

Le rendement en huile essentielle, exprimé en pourcentage, a été estimé par le calcul du rapport entre le volume de l'huile essentielle et la masse de la matière végétale utilisée. Il est calculé selon la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{VHE}{MV} * 100$$

R : Rendement en huile essentielle (%); VHE : Le volume de l'huile essentielle (ml);

MV: La masse du matériel végétal (g).



*Figure 12: Montage expérimental de l'appareil d'hydrodistillation.*

## **2.2 Extraction par Soxhlet**

L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal (10 g) à l'aide d'un appareil Soxhlet (Figure 13), pendant 6 h, en utilisant des solvants (100 ml) à polarité croissante : acétate d'éthyle, éthanol, méthanol, et eau (Biallo *et al.*, 2004). Cette technique consiste à placer, dans une cartouche de Soxhlet l'échantillon végétal et introduire le solvant dans un ballon. Un réfrigérant qui s'adapte au Soxhlet permet de condenser la vapeur du solvant qui monte du ballon chauffé ; le condensat tombe dans la cartouche et extrait ainsi les composés actifs de l'échantillon. Quand le Soxhlet se remplit jusqu'au niveau de la partie supérieure du siphon, le solvant riche en composés actifs se déverse dans le ballon : c'est le siphonnage et le mécanisme reprend. Après épuisement d'échantillon végétal, les extraits finaux sont obtenus après concentration et élimination du solvant par évaporation rotative à 55°C (Figure 14) puis ils sont conservés à 4°C dans des flacons en verre stériles et hermétiquement fermés.



*Figure 13: Montage expérimental de l'appareil de Soxhlet*

### **2.3 Extraction par macération**

Des quantités de 10 g de la poudre de la partie aérienne de *Teucrium Polium* et des écorces de la cannelle ont été macérées à température ambiante pendant 48 h sous agitation avec 100 ml de solvants : l'acétate d'éthyle, l'éthanol, le méthanol, et l'eau. Le mélange a été filtré, par la suite, les extraits finaux sont obtenus après concentration et élimination du solvant par évaporation rotative à 55°C (Figure 14), puis ils sont conservés à 4°C dans des flacons en verre stériles et hermétiquement fermés.

#### ➤ **Calcul du rendement d'extraction**

Le rendement d'extraction est calculé par la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse de l'extrait résiduel}}{\text{Masse de la matière végétale sèche}} * 100$$



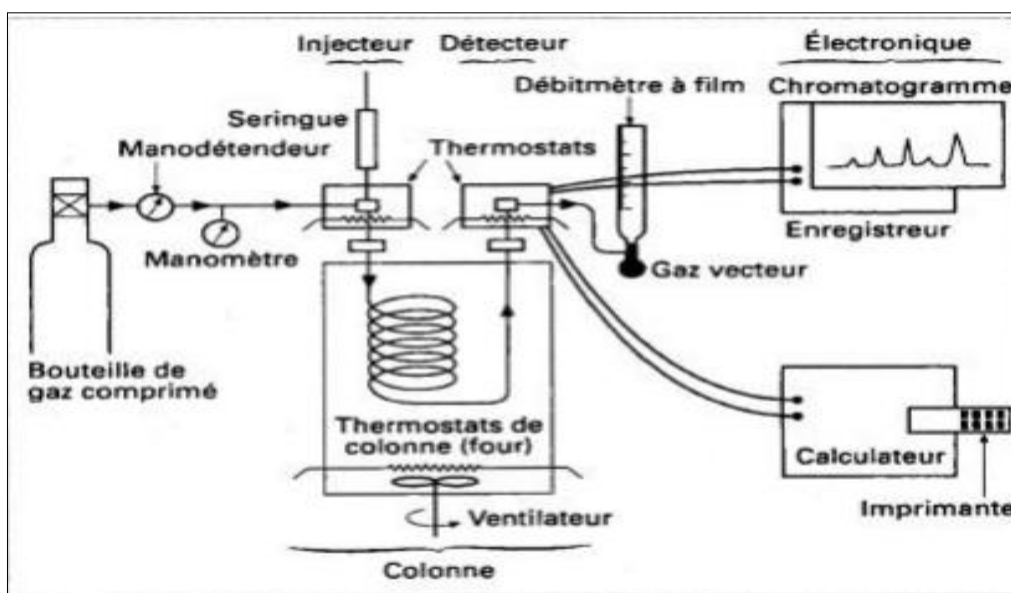
*Figure 14 : Montage expérimental de la rotavapeur*

## **3 Analyse chimique des huiles essentielles**

### **3.1 Chromatographie en phase gazeuse**

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est la méthode la plus utilisée dans la séparation et l'identification des molécules volatiles des huiles essentielles (Adams, 2007). Elle est basée sur la migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire. L'huile essentielle est transformée sous forme gazeuse au niveau de l'injecteur par chauffage.

L'échantillon gazeux est alors pris en charge par un gaz vecteur inerte, qui l'entraîne pénétrer dans une colonne de type capillaire en silice fondue enfermée dans un four à température programmable. Après avoir traversé la colonne chromatographique, chaque molécules du mélange analysé sorte à un temps de rétention qui diffère de celui des autres molécules (Hoberg *et al.*, 2000). La CG permet donc de séparer un mélange gazeux complexe par une succession continue d'équilibres entre la phase mobile gazeuse et la phase stationnaire.



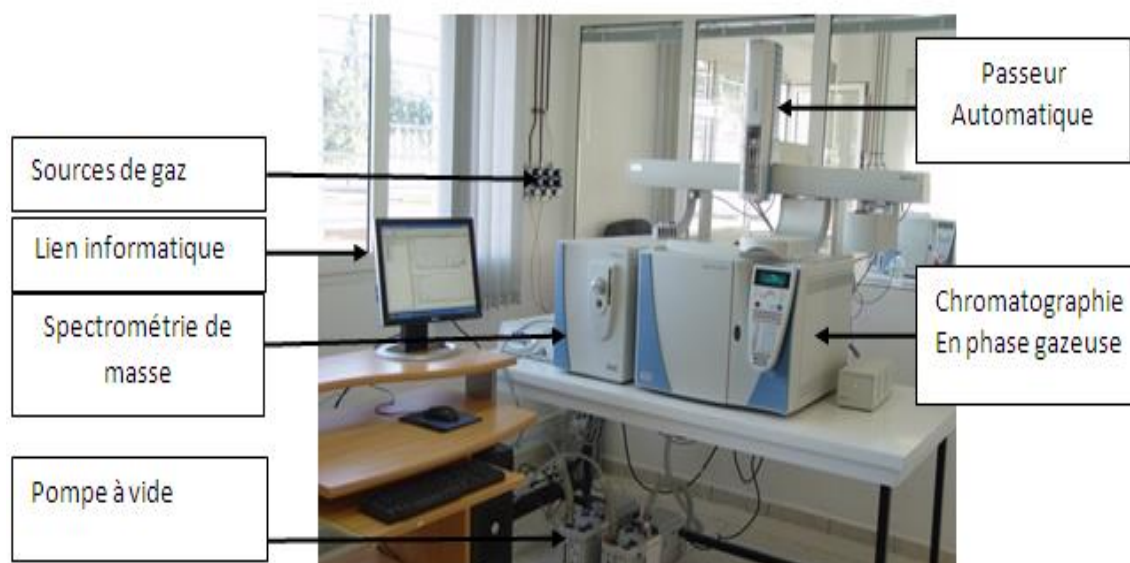
*Figure 15 : Principe de la chromatographie en phase gazeuse (Adams, 2007)*

### **3.2 Analyse des huiles essentielles par CG-SM**

Les huiles essentielles des trois plantes étudiées ont été analysées par chromatographie gazeuse (Thermo Fischer) couplée à spectromètre de masse de modèle ULTRA S /N 20062969, Polaris QS/N 210729, équipé d'une colonne non polaire HP-5MS (60 m × 0,32 mm, épaisseur du film 0,25 mm). 1 µl de l'HE diluée dans l'Hexane (10/90 v/v) a été injecté dans la colonne. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 ml/min. Les conditions de fonctionnement de la température du four CG-SM ont été maintenues comme suit : 40 °C durant 2 minutes, puis 2 °C/min jusqu'à 250 °C et 10 minutes à 250 °C. La température de l'injecteur est de 250 °C et celle du détecteur est de 260 °C. Un split de 10 : 100 a été appliqué. Les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV. La température de la source d'ions est de 200 °C, les données des spectres de masse ont été acquises dans le mode de balayage de gamme de 40 à 650 m/z.

L'identification des composés a été réalisée en déterminant leurs indices de rétention (IR) par rapport à ceux d'une série homologue de n-alcanes (C8 à C20) et en comparant leurs

spectres de masse enregistrés avec ceux stockés dans la bibliothèque NIST ou avec les spectres de masse de la littérature (Adams, 2007).



*Figure 16 : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.*

## **4 Dosage des composés phénoliques dans les extraits de plantes**

### **4.1 Dosage des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la technique de Folin-ciocalteu (Slinkard *et al.*, 1977). 100  $\mu$ l de l'échantillon ont été ajoutées à 500  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteu (10 %), après agitation vigoureuse, on laisse le mélange agir pendant 6 min avant d'ajouter 400  $\mu$ l de carbonate de sodium à 7 %. Le tout est incubé pendant 2 heures à l'abri de la lumière et à la température ambiante. L'absorbance a été lue par spectrophotomètre UV visible à 760 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage ( $y= ax$ ) est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec d'extrait (mg Eq AG/g Ms).

### **4.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux**

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plantes a été déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ), décrite par Zhishen *et al.* (1999). 250  $\mu$ l de l'extrait dilué ont été ajoutés à 75  $\mu$ l d' $AlCl_3$  (10 %) et 75  $\mu$ l d'acétate de sodium à 5 %. Le mélange a été vigoureusement agité. L'absorbance a été lue à 510 nm après 30 minutes d'incubation, contre un blanc. Une courbe d'étalonnage ( $y= ax$ ) est préparée, dans les mêmes conditions opératoires que les extraits, en utilisant la rutine comme standard, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de rutine par gramme de poids sec d'extrait (mg Eq R/g extrait).

### **4.3 Dosage des flavones et flavonols**

Le dosage des flavones et flavonols a été réalisé par la méthode de Zhishen *et al.* (1999). 500 µl de l'extrait ou de la quercitrine ont été ajoutés à 500 µl d'une solution méthanolique d'AlCl<sub>3</sub> (20 %). L'absorbance a été lue à partir du spectrophotomètre UV à 420 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage ( $y = ax$ ) est préparée, dans les mêmes conditions opératoires que les extraits, en utilisant la quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme de poids sec d'extrait (mg Eq Q/g extrait).

## **5 Activités biologiques**

### **5.1 Activités antibactériennes des HEs seules et en combinaison avec d'autres composés**

#### **5.1.1 Les souches bactériennes testées**

L'activité antibactérienne des composés testés a été évaluée vis-à-vis des souches résistantes à divers classe d'antibiotiques il s'agit de :

- quatre souches bactériennes responsables des infections nosocomiales ; isolées des patients hospitalisés au service de réanimation de CHU-Fès ; *Staphylococcus aureus* SARM 27 C1, *Escherichia coli* BLCE 255, *Klebsiella pneumoniae* BLCE 299 et *Pseudomonas aeruginosa* ;
- trois souches mutirésistantes selon le référentiel international, American Type Culture Collection (ATCC), nous ont été aimablement fournies par l'institut Pasteur de Casablanca. Il s'agit de : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### ➤ ***Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques sont des Cocci à Gram positif qui se groupent en amas. L'espèce *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), occupe une place très importante dans les infections collectives et nosocomiales (Vincenot *et al.*, 2008).

#### ➤ ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* (bacille à Gram négatif), commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées

par des mécanismes très variés, ainsi que nombreuses infections communautaires ou nosocomiales (Vincenot *et al.*, 2008).

➤ ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* bacille à Gram négatif de l'environnement se comporte comme des bactéries opportunistes et est souvent à l'origine des infections nosocomiales. Elle se caractérise par sa résistance à de nombreux antibiotiques (Fritze *et al.*, 2011).

➤ ***Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* est une bactérie commensale de l'Homme et des animaux ; elle est responsable des infections communautaires (urinaires et respiratoires) et des infections opportunistes chez les malades hospitalisés (infections urinaires, broncho-pulmonaires, septicémies avec choc,...). *K. pneumoniae* représentait 3 % des micro-organismes isolés d'infection nosocomiale (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013).

### **5.1.2 Les composés étudiés**

Nous avons étudié, dans cette partie, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Cinnamomum cassia*, *Teucrium polium* sous-espèce *polium* et *Teucrium polium* sous-espèce *aureum*. Certains antibiotiques standards (Streptomycine, Ampicilline et Chloramphénicol) et molécules volatiles (trans-cinnamaldéhyde, thymol, carvacrol, eugénol et géraniol) ont été choisis pour évaluer leur potentiel synergétique avec les HEs de *C. cassia* ou *T. polium ssp. polium*.

➤ ***Molécules volatiles :***

- Trans-cinnamaldéhyde : le principal composé de l'HE de cannelle (Lee *et al.*, 2020) ;
- Thymol et carvacrol : les composés majoritaires des HEs de thym et d'origan (Vitanza *et al.*, 2019; Aouam *et al.*, 2019);
- Eugénol : le constituant majoritaire d'HE de clou de girofle (Taroq *et al.*, 2018);
- Géraniol : le composé majoritaire de l'HE de géranium rosat (Boukhatem *et al.*, 2013).

➤ ***Antibiotiques standards :***

- Streptomycine : est un antibiotique inhibiteur de la synthèse des protéines. Elle se lie à l'ARN ribosomique 16S de la sous-unité ribosomique 30S du ribosome bactérien. Cette liaison peut conduire à des lectures erronées de codons et l'inhibition de la synthèse de protéines ce qui entraîne la mort de la cellule bactérienne (Luzzatto *et al.*, 1968).

- Ampicilline : c'est un antibiotique à spectre large de la classe des bêta-lactamines, il agit sur les bactéries à Gram positifs et sur certains Gram négatifs. Il inhibe la synthèse de la paroi bactérienne via l'inhibition de l'enzyme trans-peptidase, ce qui conduit à la lyse cellulaire (Br, 1972).
- Chloramphénicol : c'est un antibiotique bactériostatique qui limite la synthèse des protéines en inhibant l'activité peptidyl-transférase du ribosome bactérien. Il inhibe la synthèse de peptides via l'inhibition de la formation de la liaison peptidique. Les bactéries résistent au chloramphénicol par la réduction de sa perméabilité membranaire, la mutation sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien et la présence de l'enzyme chloramphénicol acétyl-transférase (Jardetzky, 1963).

### **5.1.3 Les milieux de culture utilisés**

Quatre types de milieux de culture ont été utilisés pour évaluer le pouvoir antibactérien :

- le milieu nutritif solide Luria Bertani (LB) pour la culture et l'isolement des souches bactériennes ;
- le milieu nutritif LB liquide pour la culture et la préparation de l'inoculum bactérien ;
- gélose de Muller-Hinton : pour le test de la diffusion sur disques ;
- milieu liquide de Muller-Hinton pour le test de la microdilution

En fait, la gélose de Muller-Hinton est le seul milieu de culture solide recommandé par les directives internationales (NCCLS), pour l'étude de l'activité antibactérienne de diffusion en gélose.

### **5.1.4 Activité antibactérienne des HEs par la méthode de diffusion de disques**

Le potentiel antibactérien des composés étudiés a été déterminé par la méthode de diffusion de disques selon l'expérience de Gary *et al.* (1980).

➤ **Préparation de l'inoculum bactérien** : Chaque culture de souche à étudier estensemencée en stries sur des boites de Petri contenant une gélose LB, afin d'obtenir des colonies jeunes et isolées. Après une incubation à 37 °C pendant 18 heures, trois à quatre colonies bien isolées sont prélevées avec une anse de platine stérile, puis émulsionnées dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile. La turbidité de la suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland (soit 10<sup>8</sup> UFC/ml) en mesurant la densité optique.

➤ **Préparation de la gélose :** le milieu de culture Mueller Hinton Agar (MH) a été préparé par la dissolution de 40 g de la poudre dans 1 L de l'eau distillée ; après la stérilisation à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min, le milieu a été coulé dans des boîtes de Petri en plastiques stériles.

➤ **Ensemencement et incubation :** 1 ml de l'inoculum bactérien ( $10^8$  UFC/ml) a été déposé sur la surface du milieu de culture (MH) de chaque boîte de Pétri. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent d'inoculum a été éliminé par aspiration. Les disques de papier-filtre (6 mm de diamètre) chargés de 15 µl de l'HE (ou du composé testé) ont été disposés dans les boîtes de Petri inoculées. Un disque contenant du sérum physiologique est utilisé comme témoin négatif. Ensuite, les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18 heures.

➤ **Lecture et interprétation :** après incubation, le diamètre d'inhibition autour de disque a été mesuré en millimètre.

#### **5.1.5 Activité antibactérienne des HEs par la technique de microdilution**

Cette méthode a pour objectif de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentration de composés à tester. La CMI des composés a été déterminée à l'aide des plaques Élixa de 96 puits, selon la méthode du Comité National pour les Normes de Laboratoire Clinique (NCCLS, 1999).

➤ **Préparation de l'inoculum bactérien :** à partir d'une culture de 18 h sur la gélose LB, on prépare une suspension bactérienne dans d'eau physiologique stérile de concentration  $10^8$  UFC/mL. 50 µL sont ensuite prélevés et placés dans un tube contenant 4950 µL de l'eau physiologique stérile ; la suspension est à  $1 \cdot 10^6$  UFC/mL.

➤ **Préparation de la gamme de concentration :** à partir d'une solution mère des composés à tester, une gamme de concentration est préparée dans des tubes à essai, par des dilutions successives  $\frac{1}{2}$  dans une suspension d'agar (0,1 %), afin de disperser les composés sans ajouter de solvant ou de détergent.

➤ **Ensemencement et incubation :** 50 µL de bouillon MH est placé dans les micropuits, ensuite les différentes concentrations de composés testés sont placées dans chaque micropuit à un volume de 50 µL, auquel on ajoute 50 µL de la suspension bactérienne. Enfin, les plaques sont incubées pendant 18 h à 37 °C (El Atki *et al.*, 2019).

➤ **Témoin positif et négatif** : afin de valider la stérilité du composé testé, un puits contenant 50 µl de composé et 100 µl de bouillon MH est préparé. Ce puits correspond au témoin négatif. De la même manière, pour valider la croissance bactérienne dans l'inoculum utilisé, un témoin positif contenant 50 µl d'inoculum et 100 µl de bouillon MH est préparé.

➤ **Lecture et interprétation** : La prolifération bactérienne a été visualisée en ajoutant à chaque puits 20 µL de la solution aqueuse de chlorure de 2,3, 5 triphényltétrazolium (TTC) (1 %), avec une incubation supplémentaire pendant 1 h. La TTC est incolore, il devient rouge en présence de bactéries en croissance. CMI correspond au puits présentant la plus faible concentration d'huile essentielle pour lequel le mélange ne produisait pas de couleur rouge (El Atki *et al.*, 2019).

## **5.2 Potentiel synergétique des HEs combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles**

La combinaison des HEs avec les antibiotiques ou les molécules volatiles (MVs) a été réalisée par la technique d'échiquier (Moody, 2003). Cette technique consiste à mettre en combinaison deux produits afin d'évaluer leur potentiel synergique dans l'activité antibactérienne. En effet, l'HE et l'antibiotique ou les MVs sont déposés en dilutions en séries croisées sur une plaque Élixa de 96 puits selon le schéma présenté dans la figure 17.

➤ **Préparation de l'inoculum bactérien** : Cette étape est strictement identique à celle décrite pour la méthode de diffusion de disques.

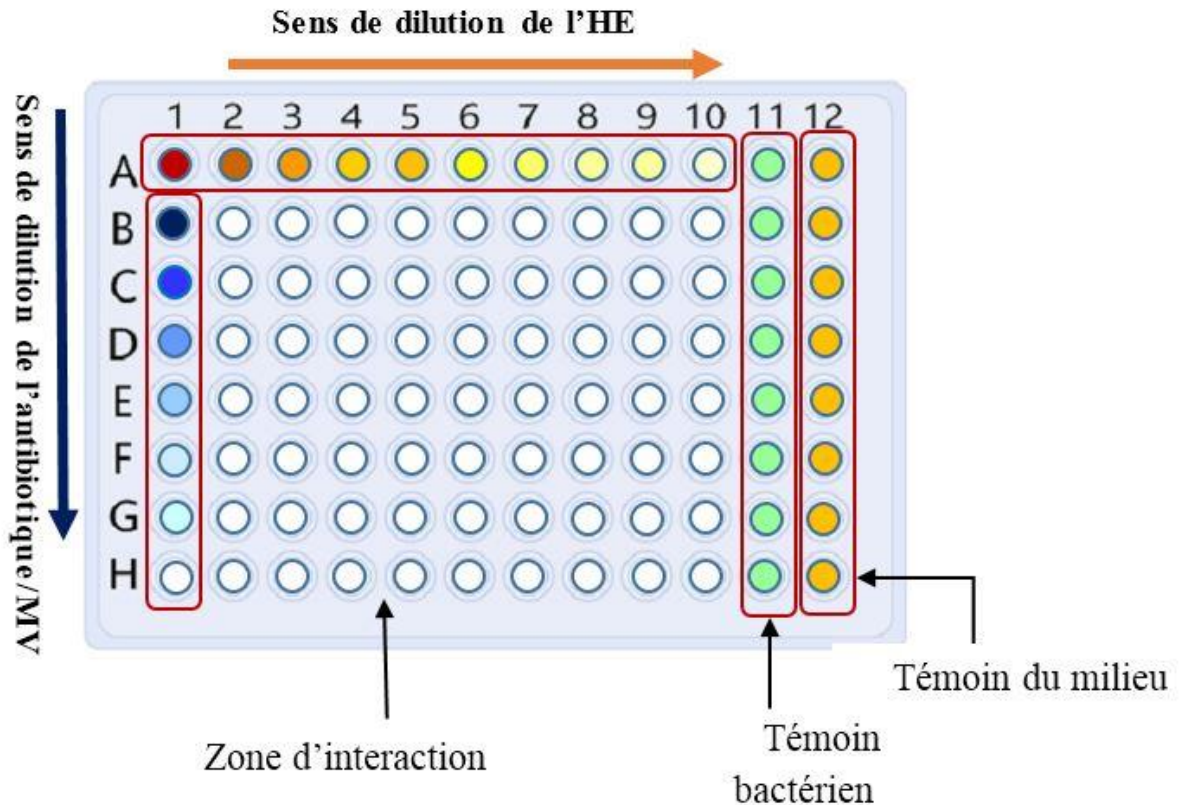


Figure 17 : Schéma de la plaque utilisée lors de la combinaison de deux composés

➤ **Ensemencement et incubation** : 100  $\mu\text{L}$  de bouillon MH est placé dans les micro-puits. 25  $\mu\text{L}$  de différentes concentrations de l'HE sont ensuite placés horizontalement dans chaque micro-puits, de même, 25  $\mu\text{L}$  des différentes concentrations d'antibiotique ou de MVs sont placés verticalement dans chaque micro-puits. Ensuite, 50  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne sont ajoutés dans chaque puits contenant les deux agents antibactériens (Tableau 1). Enfin, les plaques sont incubées pendant 18 h à 37 ° C.

➤ **Témoin positif et négatif** : afin de valider la stérilité du composé testé, des puits contenant 50  $\mu\text{L}$  de composé et 100  $\mu\text{L}$  de bouillon MH sont préparés. Ces puits correspondent au témoin négatif. De la même manière, pour valider la croissance bactérienne dans l'inoculum utilisé, un témoin positif contenant 50  $\mu\text{L}$  d'inoculum et 100  $\mu\text{L}$  de bouillon MH est préparé (Tableau 1).

Tableau 1: Mise en place des antibactériens pour la mesure de la synergie par microdilution

HE ↙ Antib/MV		C = 2CMI	C = CMI	C = CMI/2	C = CMI/4	C = CMI/8
		25 µL A1	25 µL A2	25 µL A3	25 µL A4	25 µL A5
C = 2CMI	25 µL B1	25 µL A1 + 25 µL B1 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A2 + 25 µL B1 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A3 + 25 µL B1 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A4 + 25 µL B1 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A5 + 25 µL B1 + 100µL MH 50µL inoculum
	25 µL B2	25 µL A1 + 25 µL B2 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A2 + 25 µL B2 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A3 + 25 µL B2 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A4 + 25 µL B2 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A5 + 25 µL B2 + 100µL MH 50µL inoculum
C = CMI/2	25 µL B3	25 µL A1 + 25 µL B3 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A2 + 25 µL B3 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A3 + 25 µL B3 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A4 + 25 µL B3 V 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A5 + 25 µL B3 V 100µL MH 50µL inoculum
	25 µL B4	25 µL A1+ 25µL B4 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A2 + 25 µL B4 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A3 + 25 µL B4 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A4 + 25 µL B4 + 100µL MH 50µL inoculum	25 µL A5 + 25 µL B4 + 100µL MH 50µL inoculum
C = CMI/8	25 µL B5	25 µL A1 + 25 µL B5 +100µL MH+ 50µL inoculum	25 µL A2 + 25 µL B5 + 100µL MH+ 50µL inoculum	25 µL A3 + 25 µL B5+ 100µL MH+ 50µL inoculum	25 µL A4 + 25 µL B5+ 100µL MH+ 50µL inoculum	25 µL A5 + 25 µL B5+ 100µL MH 50µL inoculum
	TEMOINS	100µL MH	100µL MH 50 µL A	100µL MH 50 µL B	100µL MH 50µL inoculum	100µL MH 50µL inoculum

➤ **Lecture et interprétation :** Après incubation, la prolifération bactérienne a été visualisée en ajoutant à chaque puits 20 µL de la solution TTC (1 %), avec une incubation supplémentaire pendant 1 h. Le TTC devient rouge en présence d'une croissance bactérienne. CMI correspond au puits présentant la plus faible concentration d'antibactérien en

combinaison pour lequel le mélange ne produisait pas de couleur rouge.

La synergie est ensuite mesurée par la formule suivante :

$$\text{FIC index (FICI)} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

$$\text{FIC}_A = \frac{\text{CMI de (A) en combinaison}}{\text{MIC (A) seul}}$$

$$\text{FIC}_B = \frac{\text{CMI de (B) en combinaison}}{\text{CMI de (B) seul}}$$

(A) : l'huile essentielle ; (B) : l'antibiotique ou la molécule volatile (MV).

La nature de l'association entre les deux composés est déduite à partir des valeurs de FICI : Un effet synergique lorsque  $\text{FICI} \leq 0,5$  ; un effet additif lorsque  $0,5 < \text{FICI} \leq 1$  ; un effet indifférent (pas d'interaction) lorsque  $1 < \text{FICI} \leq 4$  ; et un effet antagoniste lorsque  $\text{FICI} > 4$ .

○

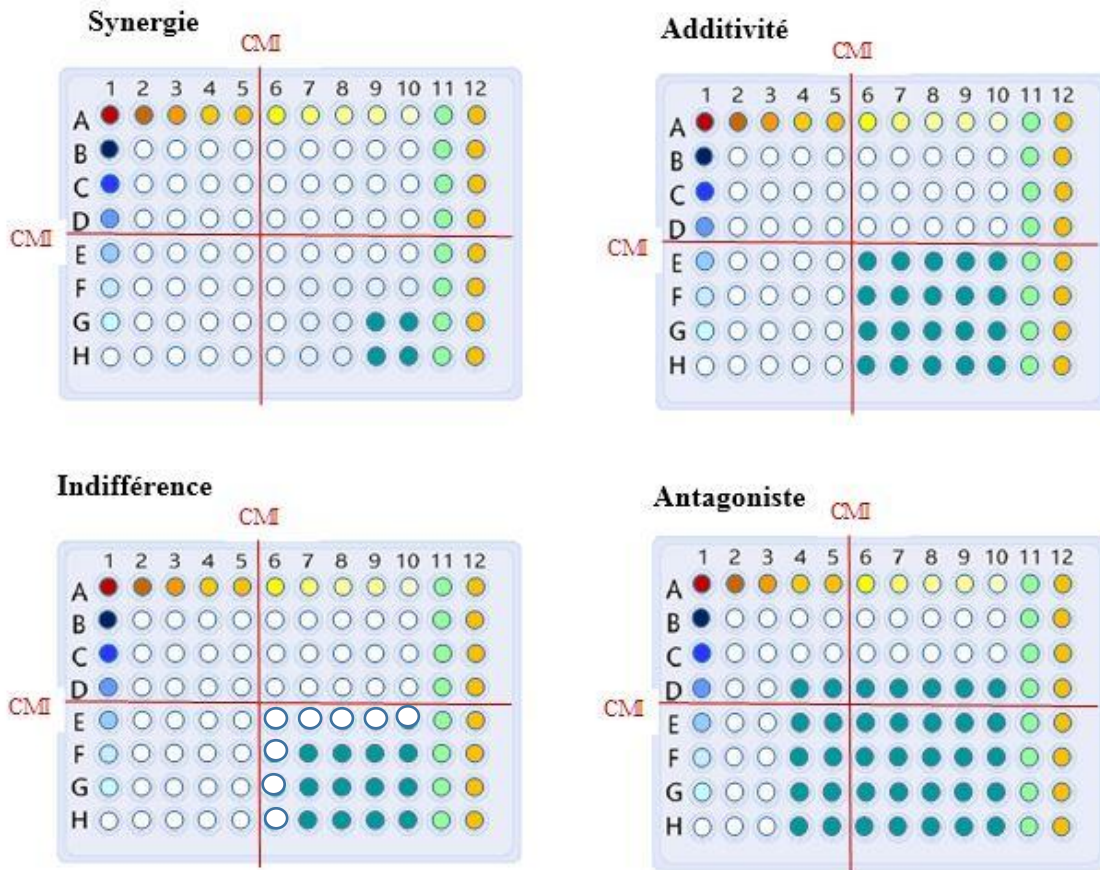


Figure 18: Schéma des différentes interactions possibles (Yassine El Atki)

### 5.3 Activités antioxydantes

#### 5.3.1 Piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup>

ABTS<sup>•+</sup> est un radical libre de couleur verte, généralement utilisé pour évaluer le pouvoir antioxydant des produits naturels. Le radical ABTS<sup>•+</sup> provient de l'oxydation d'ABTS par le persulfate de potassium en utilisant la méthode décrite par Adedapo *et al.* (2008). Le radical a été préparé en mélangeant des quantités égales de l'ABTS (7 mM) et de persulfate de potassium (2,1 mM). Le mélange a été laissé réagir pendant 12 h dans l'obscurité et à la température ambiante. 1,5 ml de la solution résultante ont été ensuite mélangés avec le méthanol pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm. Ensuite, 1 ml d'extrait ou d'étalon préparé dans le méthanol à différentes concentrations a été ajouté à 1 ml de la solution méthanolique ABTS. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 734 nm après 7 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le trolox comme l'antioxydant de référence a été préparé dans les mêmes conditions. Le pourcentage d'inhibition (I %) de l'ABTS<sup>•+</sup> a été calculé selon la formule :

$$I(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100 \quad (1)$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle négatif.

**A<sub>s</sub>** : absorbance de l'extrait ou de l'antioxydant de référence.

#### 5.3.2 Piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>

Le DPPH (1,1 -diphényle -2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence d'un agent antioxydant, le radical DPPH<sup>•</sup> est réduit et change de couleur en virant au jaune.

La capacité de nos échantillons à réduire le radical DPPH a été mesurée par la méthode décrite par Wu *et al.* (2003). 100 µl de différentes concentrations de chaque échantillon est ajouté à 1,40 ml une solution éthanolique contenant 0,1 mmol de DPPH fraîchement préparée. Les mélanges ont été agités au vortex et incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été lue au spectrophotomètre (Jasco V-530) à 517 nm contre un blanc en remplaçant l'extrait par l'éthanol. Le BHT comme l'antioxydant de référence a été préparé dans les mêmes conditions. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical libre DPPH a été calculé selon la formule (1).

L'activité antioxydante par la méthode de DPPH est exprimée par la valeur IC<sub>50</sub> (concentration inhibitrice), qui représente la concentration de l'échantillon capable de réduire

50 % du radical DPPH. L'IC<sub>50</sub> a été estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I %) en fonction des concentrations.

### **5.3.3 Pouvoir réducteur du fer (FRAP)**

Le pouvoir réducteur du fer des extraits a été déterminé selon la méthode de Oyaizu (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fe<sup>3+</sup> présent dans le complexe K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> en Fe<sup>2+</sup>. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. 200 µl de différente concentration de chaque extrait sont mélangés avec 500 µl de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 500 µl de ferricyanure de potassium (K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>) à 1 %. Après l'incubation des mélanges à 50 °C pendant 30 min, 500 µl de l'acide trichloracétique (10 %) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 tours pendant 10 min. 500 µl du surnageant de chaque concentration est mélangé avec 500 µl d'eau distillée et 100 µl FeCl<sub>3</sub> (0,1 %). L'absorbance est mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif (antioxydant standard) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les extraits.

Le pouvoir réducteur est exprimé par la valeur EC<sub>50</sub>, qui représente la valeur de l'extrait capable d'augmenter l'absorbance à 0,1. L'EC<sub>50</sub> a été estimée par extrapolation en traçant la courbe des absorbances en fonction des concentrations (El Atki *et al.*, 2019).

### **5.3.4 Test de phosphomolybdène**

Le test de phosphomolybdène ou la capacité antioxydante totale (CAT) est une méthode quantitative pour la détermination l'activité antioxydante d'une substance par la formation d'un complexe de phosphomolybdène. Le dosage est basé sur la réduction de Mo (VI) en Mo (V) à pH acide (Prieto & Aguilar, 1999). 25 µl de l'échantillon dilué ont été ajoutés à 1 ml du réactif de phosphomolybdène (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM sodium phosphate et 4 mM de molybdate d'ammonium). Le mélange est incubé à 95 °C dans un bain-marie, pendant 90 min. l'absorbance est lue à 695 à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc en remplaçant l'extrait par le méthanol. Le vit C est utilisé comme contrôle positif (antioxydant standard) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les extraits. La capacité antioxydante totale est exprimée en équivalents de la vitamine C (mg Vit C E/g extrait).

## **5.4 Effet diurétique des extraits aqueux de *T. polium ssp polium* et *T. polium ssp aureum*.**

### **5.4.1 Animaux**

Cette expérience a été réalisées sur des rats *Wistar* adultes mâles normaux ayant un poids corporel de  $170 \pm 5$  g, élevés dans l'animalerie du laboratoire PPSE ou ils ont séjourné sous les conditions suivantes : une température de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 55 % d'humidité et 12h/12h cycle lumière/obscurité. Les animaux ont libre accès à l'eau du robinet et la nourriture. Le soin et la manipulation des rats étaient en conformité avec les normes directives internationalement reconnue pour l'utilisation des animaux.

### **5.4.2 Traitement aigu**

Les animaux ont été placés chacun dans une cage métabolique adaptée à l'étude de l'activité diurétique pendant une période de 48 heures pour qu'ils puissent s'adapter aux conditions des cages avant l'expérimentation, pendant cette période, on gave les animaux seulement par l'eau. Les rats ont été répartis en quatre groupes de six rats pour chacun :

- le premier, le contrôle négatif, reçoit de l'eau;
- le deuxième, le contrôle positif, reçoit du furosémide à une dose de 10 mg/Kg;
- le troisième et le quatrième groupe sont traités, respectivement par 150 mg des extraits aqueux de *T. polium ssp. polium* et *T. polium ssp. aureum* obtenus par Soxhlet.

Après administration des produits testés, chaque rat est placé immédiatement dans une cage métabolique avec un accès libre à l'eau et la nourriture. Les urines sont collectées dans des tubes gradués, leurs volumes ont été mesurés après 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, la concentration des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont aussi mesuré après 8h.

### **5.4.3 Traitement subchronique**

Les extraits aqueux de *T. polium ssp polium* et *T. polium ssp polium*, le furosémide et l'eau distillée ont été administrés à quatre groupes de rats pendant 16 jours à des doses similaires à celle de traitement aigu. Immédiatement après le gavage, les rats ont été placés individuellement dans les cages métaboliques avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. L'urine a été collectée le jour 1,4, 8, 12, et 16, puis filtrée, centrifugée et conservée jusqu'au dosage des différents paramètres.

Les prélèvements sanguins ont été effectués à la fin du traitement, par ponction rétroorbitale sur des animaux légèrement endormis au diétyl éther. Après centrifugation à 3500 Tpm pendant 15 minutes, le plasma recueilli est stocké à -20 °C jusqu'au jour du dosage des différents paramètres.

➤ **Dosage du Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>**

Les concentrations en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> ont été déterminées dans les différents échantillons urinaires et plasmatiques par spectrophotométrie à flamme. 100 µL de l'échantillon sont aspirés par le photomètre à flamme, dilués dans le l'étalon interne puis vaporisés dans une flamme butane-air excitant les atomes de Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>. Les électrons de l'orbital périphérique de l'atome sont projetés à un niveau d'énergie plus élevé et reviennent ensuite à l'état fondamental en émettant des photons dont la longueur d'onde est caractéristique de l'atome. L'énergie produite sous forme de photons est proportionnelle au nombre d'atomes contenus dans l'échantillon vaporisé et donc à la concentration exprimée en mEq/L.

➤ **Dosage de la créatinine**

La concentration de la créatinine est estimée par une méthode colorimétrique à l'aide du spectrophotomètre (BioSystems BTS-310 photometer). Dans un milieu alcalin, la créatinine présente dans l'échantillon réagit avec le picrate pour donner un complexe coloré. On mesure la vitesse de formation de ce complexe dans des périodes initiales courtes, évitant ainsi l'interférence d'autres composés. L'augmentation de l'absorbance à 500 nm, suite au développement de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en créatinine (Fabiny *et al.*, 1971; Jaffe, 1980).

La clairance de la créatinine qui permet de déterminer la filtration glomérulaire a été calculée selon la formule suivante :

$$Clairance_{créat}(ml/min) = \left[ \frac{U_{créat}}{P_{créat}} \right] \times V$$

Avec :

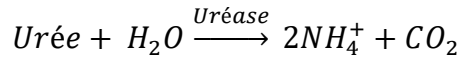
$U_{créat}$  : concentration urinaire de la créatinine,

$P_{créat}$  : concentration plasmatique de la créatinine,

$V$  : débit urinaire (mL/min).

➤ **Dosage de l'urée :**

La teneur en urée est déterminée par le couplage de deux réactions successives. La première est catalysée par l'uréase, donnant lieu à la formation de CO<sub>2</sub> et deux molécules de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Dans la deuxième réaction catalysée par le nitroprussiate, chaque molécule de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> réagit avec le salicylate et le NaClO pour former l'indophénol.



L'indophénol formé est un composé coloré quantifiable par spectrométrie, il est directement proportionnel à l'urée transformée, et par la suite, l'urémie sera déduite de l'augmentation de l'absorbance à 600 nm résultant de la production de l'indophénol (Tabacco *et al.*, 1979).

➤ **Calcul de La clairance osmolaire**

L'osmolarité plasmatique et urinaire des échantillons est mesurée par cryométrie à l'aide d'un osmomètre. La clairance osmolaire (Cosm) est déterminée à partir de l'osmolarité plasmatique (Posm), de l'osmolarité urinaire (Uosm) et du débit urinaire (V) selon la formule :

$$\text{Cosm} = \frac{\text{Uosm} \cdot \text{V}}{\text{Posm}}$$

➤ **Calcul de la clairance d'eau libre**

La clairance de l'eau libre est calculée selon la formule :

$$\text{C H}_2\text{O} = \text{V} - \text{Cosm}$$

#### **5.4.4 Analyses statistiques**

Les résultats de l'effet diurétique sont exprimés par leur moyenne ± SEM. Pour déterminer si les moyennes de deux groupes sont significativement différentes, le test t de Student est utilisé. Tandis que la comparaison de plusieurs groupes en même temps fait appel à un test ANOVA. Les différences sont considérées statistiquement significatives quand la probabilité P < 0,05.



## **Partie III : Résultats et discussion**

## Axe I : Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de *T. polium* et *C. cassia*

### 1 Résultats

#### 1.1 Composition chimique des huiles essentielles de *T. polium* et *C. cassia*

##### 1.1.1 Composition chimique des huiles essentielles des deux sous-espèces de *T. polium*

Les huiles essentielles de *T. polium* ssp. *aureum* et de *T. polium* ssp. *polium* extraites par un hydrodistillateur de type Clevenger sont de couleur jaune foncé avec un rendement de 1 % pour l'HE de *T. polium* ssp. *polium* et 0,75 % pour l'HE de *T. polium* ssp. *aureum*.

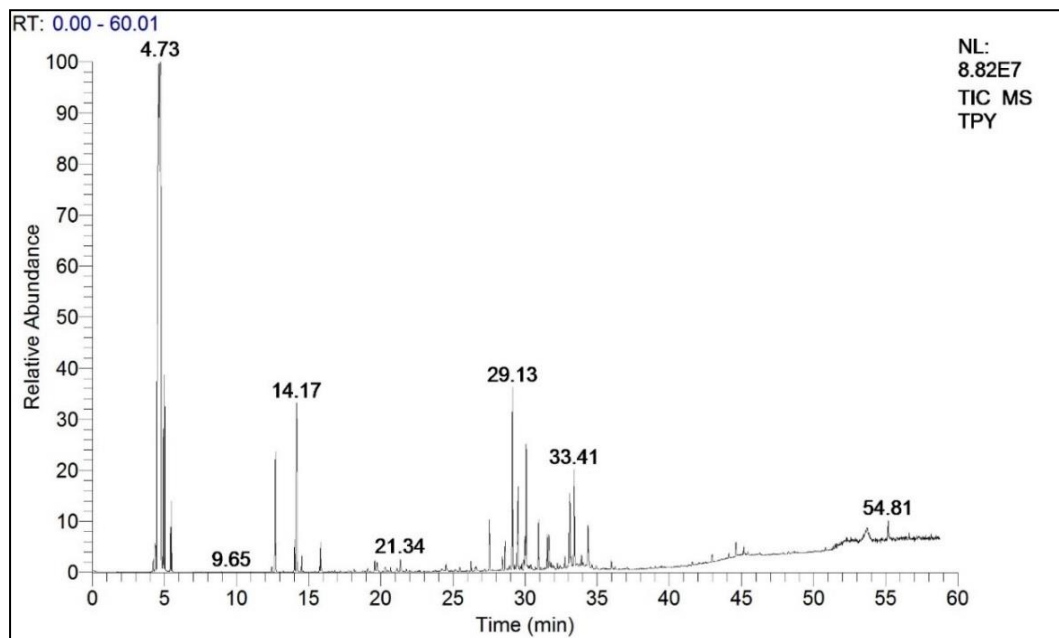
Les spectres d'analyse CPG-SM des huiles essentielles issues des deux sous-espèces de *Teucrium polium* sont illustrés dans les figures 19 et 20. La composition chimique en pourcentage par ordre d'élution sur la colonne HP-5MS est rapportée dans le tableau 2. Brièvement, les HEs étudiées sont constituées principalement d'un mélange complexe d'hydrocarbures mono-terpéniques et sesquiterpéniques et de composés oxygénés monoterpéniques et sesquiterpéniques. Les sesquiterpènes hydrocarbonés sont les plus abondants dans les deux huiles essentielles avec un pourcentage de 64,11 % pour l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* et 54,3 % pour l'HE *T. polium* ssp. *polium*.

Vingt-six constituants, représentant 93,16 % de la composition globale de l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* ont été identifiés (Tableau 2) ; six composés ont été distingués comme constituants majoritaires. Il s'agit du Caryophyllène (19,13 %),  $\gamma$ -Muuroolène (13,02 %),  $\tau$ -cadinol (11,01 %),  $\alpha$ -Gurjunène (9,2 %), Rosifoliol (8,79 %), et 3-Carène (7,04 %). Cependant, les composés mineurs sont : Alloaromadendrene (5,01 %),  $\alpha$ -pinène (3,5 %), Myrtenol (3,02 %) et le Germacrene-D-4-ol (2,36 %).

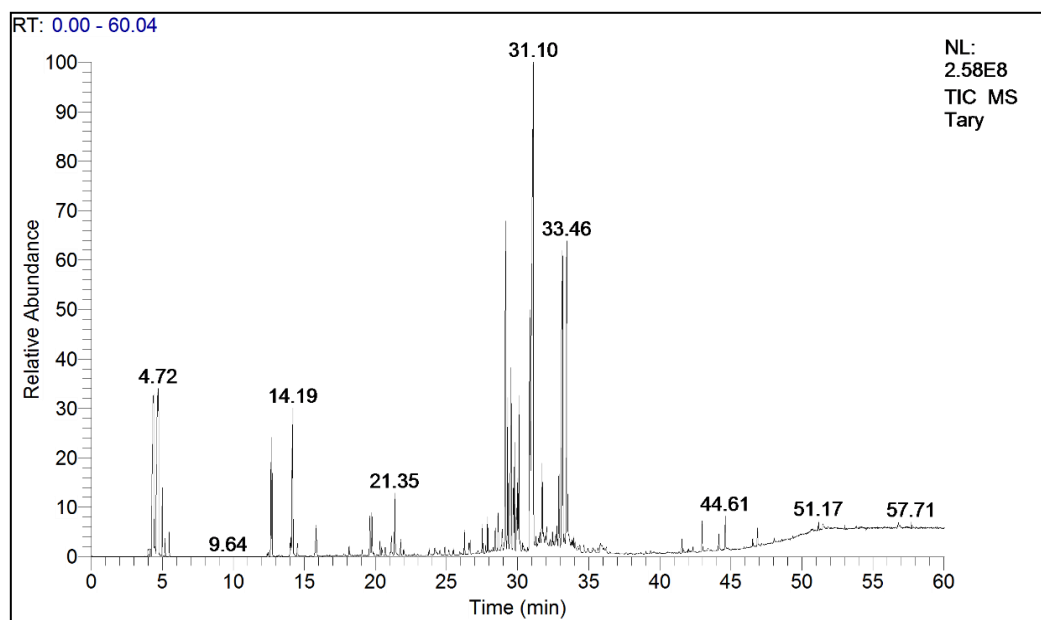
En plus, l'analyse chromatographique de l'huile essentielle de la sous-espèce *T. polium* ssp. *polium* révèle que 22 constituants qui représentent 93,16 % de sa composition générale. Le 3-carène (16,49 %), le  $\gamma$ -Muuroolène (14,03 %), le  $\alpha$ -pinène (9,94 %), le  $\alpha$ -phellandrene (6,93 %), le Caryophyllène (7,51 %), et le  $\alpha$ -phellandrene (6,93 %) sont les composés majoritaires, alors que le Muurolol (6,53 %), le  $\tau$ -Cadinol (5,1 %), le Germacrene-D-4-ol (3,93 %), l'Alloaromadendrene (3,2 %) et le Ledol (2,08 %) sont les composés mineurs de cette huile.

Par conséquent, il ressort de la comparaison de la composition chimique des HEs des deux sous-espèces de *T. polium* que certains composés sont présents uniquement dans l'HE de *T.*

*polium* ssp. *aureum*, c'est le cas de Cubebene,  $\alpha$ -terpényle acétate, Aristolène, Valencène, Cubenol et Rosifoliol, de même, le  $\alpha$ -phelandrene, l'Aromadendrene et le Ledol sont des composés qui caractérisent l'HE de *T. polium* ssp. *polium*.



**Figure 19 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. polium* ssp. *polium***



**Figure 20 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *T. polium* ssp. *aureum***

Tableau 2: Composition chimique des HEs de *T. polium* ssp. *aureum* et *T. polium* ssp. *polium*

Composés	IR	<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i> (%)	<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i> (%)
$\alpha$ -Thujene	803	0,3	0,67
$\alpha$ -pinène	809	3,5	9,94
$\gamma$ -Terpinene	824	0,5	1,01
b-Myrcene	971	0,59	0,12
$\alpha$ -phelandrene	993	-	6,93
3-Carene	1007	7,04	16,49
Trans-sabinol	1109	0,4	0,62
Myrtenol	1194	3,02	1,11
$\alpha$ -Terpinyl acetate	1230	1	-
Thymol	1244	0,4	0,57
$\beta$ -Cubebene	1283	1,3	-
Aromadendrene	1343	-	1,3
Valencene	1391	0,56	-
Caryophyllene	1445	19,13	7,51
Aristolene	1416	0,9	-
Alloaromadendrene	1437	5,01	3,2
$\alpha$ -Himachalene	1452	1,32	5,56
$\beta$ -elemene	1463	-	0,2
$\gamma$ -selinene	1473	0,3	-
$\gamma$ -Muurolene	1478	13,02	14,03
$\alpha$ -Gurjunene	1492	9,2	6,54
$\beta$ -Eudesmol	1508	1,05	-
Ledol	1525	-	2,08
Germacrene-D-4-ol	1543	2,36	3,93
Spathulenol	1551	1,2	0,73
Caryophyllene oxide	1574	0,24	0,32
Cubenol	1583	0,7	-
$\tau$ -Cadinol	1595	11,01	5,1
Muurolol	1642	-	6,53
Rosifoliol	1654	8,79	-
Benzyl benzouate	1720	0,32	-
Monoterpene hydrocarbons		11,93	38,23
Oxygenated monoterpenes		3,82	2,3
Sesquiterpene hydrocarbons		64,11	54,3
Oxygenated sesquiterpenes		12,3	9,66
<b>Total (%)</b>		<b>93,16</b>	<b>94,49</b>

### 1.1.2 Composition de l'huile essentielle de *C. cassia*

L'HE de *C. cassia* obtenue par hydrodistillation est de couleur jaune clair avec un rendement de 1,26 %. L'analyse de sa composition chimique par CPG-SM a permis d'identifier 11 constituants (Tableau 3). Le trans-cinnamaldéhyde représentant 91,01 % a été identifié le composé majoritaire. Les autres composants comme l'acétate de cis-cinnamyle (2,04 %), le linalol (1,3 %), l'oxyde de caryophyllène (1,06 %), le  $\gamma$ -terpinène (1,03 %) et le  $\delta$ -cadinène (0,9 %) sont des constituants minoritaires.

**Tableau 3: Composition chimique de l'huile essentielle de *C. cassia***

Compounds	RI	<i>C. cassia</i> (%)
$\alpha$ -Pinene	909	<0,1
$\gamma$ -Terpinene	924	1,03
Limonene	1027	0,2
1,8-Cineole	1031	<0,1
Linalool	1116	1,3
Trans-Cinnamaldehyde	1277	91,01
Cis-Cinnamyle acetete	1291	2,04
Caryophyllene oxide	1321	1,06
$\alpha$ -Copaene	1375	0,5
$\delta$ -Cadinene	1534	0,9
Benzyl benzoate	1660	0,4
<b>Totale</b>	-	<b>98,44</b>

### 1.1 Activité antioxydante des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antioxydante des HEs *in vitro* peut être effectuée par plusieurs méthodes et les résultats obtenus dépendent de la méthode utilisée. Pour notre étude, on a opté pour quatre méthodes à savoir ABTS, DPPH, FRAP et phosphomolybdène. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 21, 22 et 23 et récapitulés dans le Tableau 4.

D'après les résultats on peut constater que le pouvoir antioxydant des HEs testées augmente en fonction des concentrations. Ainsi, L'HE de *T. polium* ssp. *aureum* présente une bonne activité de piégeage des radicaux DPPH et ABTS. En effet, à la concentration de 6 mg/mL cette huile inhibe plus de 80 % du radical DPPH et réduit plus de 80 % d'ABTS à la concentration de 300 mg/mL. Tandis que l'HE de *C. cassia* montre une faible inhibition des radicaux DPPH et ABTS.

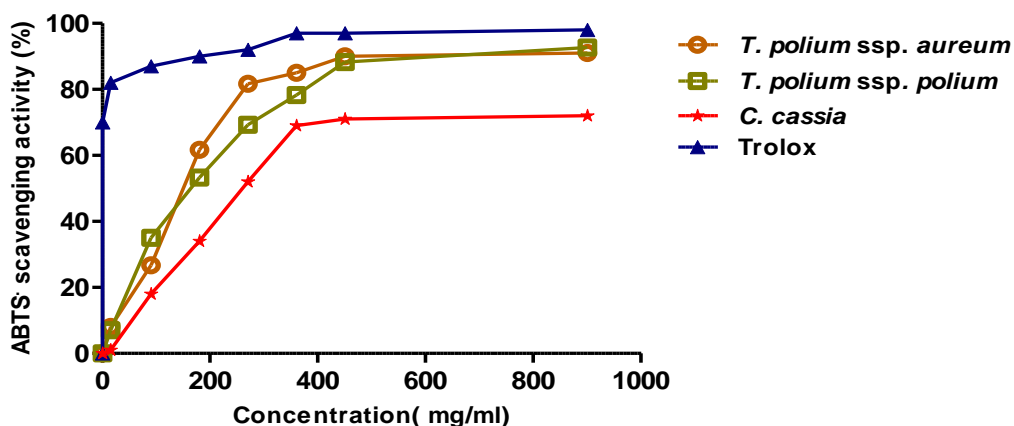


Figure 21 : Piégeage du radical libre ABTS<sup>•+</sup> des HEs de *T. polium ssp. aureum*, *T. polium ssp. polium* et *C. cassia* comparé à celui du Trolox

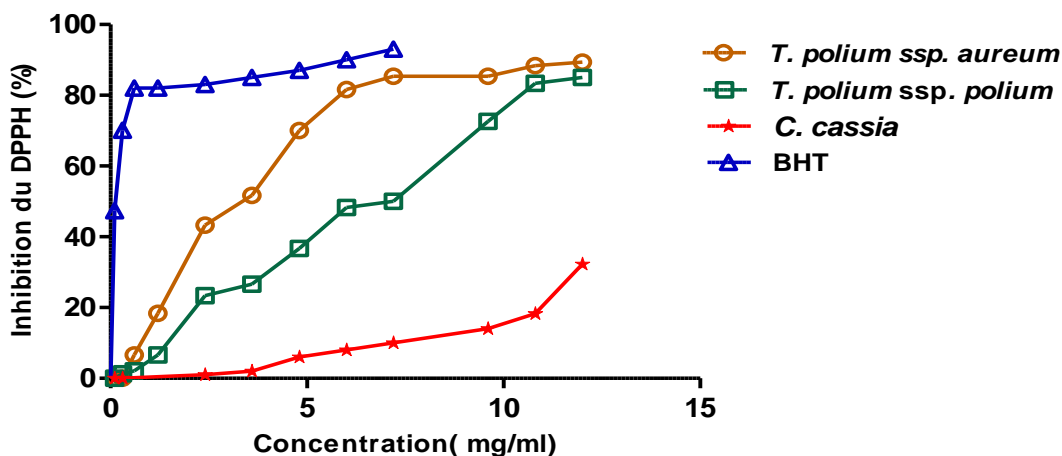


Figure 22 : Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> des HEs de *T. polium ssp. aureum*, *T. polium ssp. polium* et *C. cassia* comparé à celui du BHT

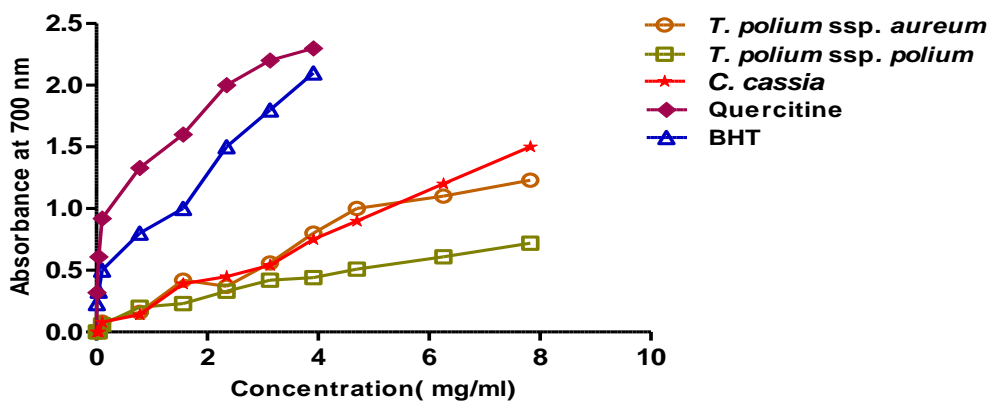


Figure 23 : Pouvoir réducteur du fer des HEs de *T. polium ssp. aureum*, *T. polium ssp. polium* et *C. cassia* comparé à celui de quercétine et BHT

En plus, les résultats de l'effet de piégeage des radicaux libres DPPH et d'ABTS ont été exprimés par IC<sub>50</sub> qui est la concentration inhibitrice capable d'inhiber 50 % des radicaux libres ; aussi, le pouvoir réducteur du fer des HEs a été comparé en se basant sur la concentration efficace EC<sub>50</sub> qui est définie comme étant la concentration des HEs capable d'augmenter l'absorbance à 0,5 (Tableau 4). En effet, les valeurs d'IC<sub>50</sub> et d'EC<sub>50</sub> sont inversement liées à la capacité antioxydante d'une substance, plus l'IC<sub>50</sub> et l'EC<sub>50</sub> son faible, plus le pouvoir antioxydant d'une substance est important. Aussi, les résultats de la capacité antioxydante totale des HEs déterminée par la méthode de phosphomolybdène et exprimée en mg Eq Vit C/g HE (Tableau 4). Les résultats ont dévoilé que l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* présente un pouvoir antioxydant plus élevé, par les méthodes ABTS, DPPH et FRAP, en comparaison avec l'HE de *T. polium* ssp. *polium*. Cependant, ce pouvoir reste modéré et significativement inférieur à celui des antioxydants de références utilisés. En contrepartie, l'HE *T. polium* ssp. *polium* a montré une capacité antioxydante importante par la méthode de phosphomolybdène (3308, 27 ± 100 mg Eq vit C/g HE) que celle obtenue par l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* (1774,42 ± 87 mg Eq vit C/g HE).

De même, les résultats ont révélé que l'HE de *C. cassia*, exhibe une activité antioxydante significativement modérée par le test de DPPH, ABTS et phosphomolybdène avec les valeurs de l'ordre de 12,01 ± 0,2 mg/mL, 250,11 ± 5,6 mg/mL et 422,09 ± 8 mg Eq vit C/g HE respectivement. Cependant, elle montre un pouvoir réducteur du fer remarquable (2,5 ± 0,11 mg/mL), mais qui reste faible par rapport à la quercétine (0,03 mg/mL) utilisée comme contrôle positif.

**Tableau 4 : Les valeurs d' IC<sub>50</sub> et EC<sub>50</sub> obtenus par les tests antioxydants des huiles essentielles de *T. polium* et *C. cassia***

Composés	DPPH (mg/mL)	FRAP (mg/mL)	ABTS (mg/mL)	CAT (mg Eq vitC/g HE)
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	3,7 ± 0,2 <sup>c</sup>	2,31 ± 0,11 <sup>b</sup>	140,2 ± 2,2 <sup>c</sup>	1774,42 ± 87 <sup>b</sup>
<i>T. polium</i> ssp <i>polium</i>	7,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	160,03 ± 3,1 <sup>b</sup>	3308,27 ± 100 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	12,01 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,11 <sup>b</sup>	250,11 ± 5,6 <sup>a</sup>	422,09 ± 8 <sup>d</sup>
BHT	0,12 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,1 ± 0,01 <sup>c</sup>	-	540,62 ± 40 <sup>c</sup>
Quercétine	-	0,03 ± 0, 00 <sup>d</sup>	-	512,70 ± 15 <sup>c</sup>
Trolox	-	-	0,01 ± 0,002 <sup>d</sup>	-

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

## 2 Discussion

### 2.1 Composition chimique des huiles essentielles

#### 2.2 Les huiles essentielles de *Teucrium polium*

Le rendement de l'HE de *T. polium* ssp. *polium* étudiée est faible par rapport à celui de la même espèce récoltée en Algérie qui est de l'ordre de 1,66 % (Fertout-Mouri *et al.*, 2017).

La comparaison de la composition chimique des HEs des deux sous-espèces de *T. polium*, révèle des différences aussi bien qualitatives que quantitatives ; en effet, l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* recèle 26 composés dont le caryophyllène (19,13 %), Muurolène (13,02 %) et  $\tau$ -cadinol (11,01 %) sont les composés majoritaires, tandis que l'HE de *T. polium* ssp. *polium* ne renferme que 22 composés dont le 3-carène (16,49 %) le  $\gamma$ -Muurolène (14,03 %) et le  $\alpha$ -pinène (9,94 %) sont les constituants majoritaires.

A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la composition chimique de l'HE de *T. polium* ssp. *aureum*. Cependant, il existe deux études uniquement qui ont été rapportées sur la composition de l'HE *T. polium* ssp. *polium*. La première étude indique que les composés majoritaires de cette huile sont le germacène (14,8 %),  $\alpha$ -pinène (16,6 %) et le  $\alpha$ -pinène (7,2 %) (Djabou *et al.*, 2012) alors que la deuxième montre que le D-germacrène (18,92 %),  $\beta$ -E-ocimène (12,71 %), bicyclogermacrène (11,04 %),  $\beta$ -pinène (9,03 %) et le carvacrol (7,02 %) sont les principaux constituants de l'HE de *T. polium* ssp. *polium* (Fertout-Mouri *et al.*, 2017). D'autres études ont déterminé la composition chimique de *T. polium* sans préciser sa sous-espèce, à titre d'exemple on cite les travaux réalisés par Belmekki *et al.* (2013) qui ont montré que les principaux constituants de l'HE *T. polium* récoltée en Algérie sont le germacrène (25,81 %), bicyclogermacène (13 %), et le  $\beta$ -pinène (11,69 %). De même, les études menées par Menichini *et al.* (2012) sur l'HE de *T. polium* qui pousse dans l'île de Karpathos ont indiqué que le carvacrol (10,1 %), le germacène (3,1 %) et le  $\tau$ -cadinène (2,5 %) sont les composés majoritaires, alors que le  $\alpha$ -cadinol (5,93 %), le  $\beta$ -épinène, le  $\beta$ -gurjurène et le  $\alpha$ -pinène sont les principaux composés de l'huile de *T. polium* provenant d'Arabie Saoudite (Al-Ghamdi, 2014). Des études similaires sur la composition chimique de l'HE de *T. polium* ssp. *capitatum* ont montré que le  $\alpha$ -pinène (28,8 %), le  $\beta$ -pinène (7,2 %) et le p-cymène (7,0 %) sont ses composés majoritaires (Cozzani *et al.*, 2005).

Ces différences observées dans le profil chimique des HEs résulteraient essentiellement de la différence des facteurs édapho- climatiques, des facteurs génétiques, la période et le stade de

récolte et les techniques d'extraction et d'analyse utilisées (Rajabi et al., 2014 ; Sellem et al., 2020).

### **2.3 Composition de l'huile essentielle de *C. cassia***

Le rendement de l'HE de la cannelle (*C. cassia*) est de l'ordre de 1,26 %, ce rendement reste faible comparé à celui trouvé par Singh *et al.* (2007), signalant un rendement de 2 %. L'analyse de la composition chimique de cette HE a permis d'identifier 11 composés, dominés par trans-cinnamaldéhyde (91,01 %). Ces résultats sont similaires à plusieurs travaux rapportés dans la littérature qui ont confirmé que le trans-cinnamaldéhyde est le composé majoritaire de l'HE de *C. cassia* (Singh *et al.*, 2007; Firmino *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2011). Toutefois, Simić *et al.* (2004) ont trouvé que le trans-cinnamaldéhyde (62,8 %) et le propylène-cinnamaldéhyde (5,5 %) sont les principaux constituants de l'HE de *C. zeylanicum*. Cependant, Marongiu *et al.* (2007) ont révélé que le trans-cinnamaldéhyde (77,1%), le trans- $\beta$ -caryophyllène (6,0%) et l' $\alpha$ -terpinéol (4,4%) sont les principaux composants de la même espèce.

### **2.4 Activité antioxydante des huiles essentielles**

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *T. polium* ssp. *aureum*, *T. polium* ssp. *polium* et *C. cassia* a été évaluée par quatre méthodes différentes et complémentaires. Les résultats montrent que l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* possède significativement le meilleur pouvoir antioxydant par rapport aux autres HEs étudiées. Cependant, ce potentiel reste significativement inférieur à celui des antioxydants de références, notamment le BHT, la Quercétine et le Trolox.

Il convient de noter que les activités antioxydantes des HEs des deux sous-espèces de *T. polium* sont décrites ici pour la première fois. Cependant, les HEs des autres espèces du même genre *Teucrium* ont été rapportées pour leur propriété antioxydante importante. Une étude menée par Saroglou *et al.* (2007) révèle que *Teucrium royleanum* qui pousse au Pakistan est capable de réduire le radical libre DPPH à de faibles concentrations. De même Ricci *et al.* (2005), ont montré que l'HE de *Teucrium marum* possède un pouvoir antioxydant très important.

Par ailleurs, l'HE de *C. cassia* indique un pouvoir réducteur de fer remarquable et un potentiel antioxydant significativement modéré évalué par les tests d'ABTS, DPPH et de phosphomolybdène. Récemment Kallel *et al.* (2019), ont étudié le pouvoir antioxydant de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) par la méthode de phosphomolybdène, DPPH et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats ont montré que cette huile est capable de réduire 21,3 % et 55,2 % des radicaux libres DPPH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivement et possède une capacité antioxydante de l'ordre de 108,75  $\pm$  32,63 mg Eq vit C/g HE. Une autre étude sur l'effet antioxydant de *C. cassia* a montré

que HE de cette plante possède la capacité de piéger les radicaux libres  $H_2O_2$  et l'oxyde nitrique (Sontakke *et al.*, 2019).

L'activité biologique d'une HE est étroitement liée à sa composition chimique, en effet, plusieurs travaux de recherche ont mis le point sur la relation activité biologique/composition chimique et même sur l'effet synergique entre les constituants des HE (Sellem *et al.*, 2020). En général, les HE riches en composés oxygénés présentent une activité antiradicalaire plus marquée que celles abondantes en terpènes hydrocarbonés (Nguyen *et al.*, 2016). En effet, l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* qui a présenté la plus grande activité antioxydante est la plus riche en monoterpènes et sesquiterpènes oxygénés par rapport aux autres HEs testées. D'une manière générale, le pouvoir antioxydant modéré des HEs testées peut être expliqué par la faible teneur de ces HEs en composés phénoliques qui sont connus pour leur forte propriété antioxydante. Ces composés, grâce à leur propriété d'oxydoréduction, agissent en tant qu'agents réducteurs et donateurs d'hydrogène (Aazza *et al.*, 2011). Plusieurs études ont confirmé la présence d'une forte corrélation entre l'effet antioxydant des plantes et leurs richesses en polyphénols (Nguyen *et al.*, 2016; Al-Abd *et al.*, 2017; Aoussar *et al.*, 2017). L'absence du pouvoir antioxydant des terpènes hydrocarbonés est due principalement à leur faible capacité donatrice d'un atome d'hydrogène ainsi à la faible solubilité des HEs dans les solvants comme l'éthanol ou le méthanol (Aazza *et al.*, 2011).

## **Axe 2 : Étude du potentiel synergique des huiles essentielles de *T. polium* et *C. cassia* combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles**

Aux moments où les phénomènes de résistance des espèces bactériennes aux antibiotiques se multiplient, il apparaît nécessaire d'exploiter d'autres voies complémentaires pour contribuer au développement de nouveaux agents antibactériens. L'efficacité antibactérienne des HEs est suffisamment documentée, et leur utilisation comme agents antibactériens est devenue une véritable alternative à l'utilisation des antibiotiques synthétiques. Dans ce cadre, nous avons proposé d'évaluer le potentiel synergétique antibactérien des huiles essentielles de *T. polium* et de *C. cassia* combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles vis-à-vis sept souches bactériennes multirésistantes.

### **1 Résultats**

#### **1.1 Pouvoir antibactérien comparatif des HEs de *T. polium*, *C. cassia* et des molécules volatiles**

##### **1.1.1 La méthode de diffusion sur gélose**

La méthode de diffusion sur gélose est une technique qualitative préliminaire de sensibilité qui montre le degré de sensibilité des souches aux composés testés avant de procéder à la mesure quantitative par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

Les résultats de diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne des HEs, des molécules volatiles testées et les antibiotiques de référence contre sept souches bactériennes multirésistantes sont consignés dans le Tableau 5. Ces résultats montrent d'une façon générale que l'huile essentielle de *C. cassia*, le cinnamaldéhyde, le thymol et le carvacrol sont les plus actifs contre les souches testées, avec des diamètres d'inhibition allant de 10 à 42,3 mm. Ces diamètres sont généralement supérieurs à ceux des antibiotiques de références utilisés. Tandis que, les deux huiles essentielles de *T. polium*, l'eugénol et le géraniol ont montré généralement une activité modérée contre les souches testées, à l'exception de *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui résiste totalement aux HEs de *T. polium* et au géraniol. Ainsi, les diamètres d'inhibition obtenus par l'eugénol vis-à-vis les deux espèces de *S. aureus* et d'*E. coli* sont similaires à ceux de l'antibiotique Streptomycine. Selon la moyenne des zones d'inhibitions de chaque produit testé à l'égard des 7 souches étudiées, on peut classer les composés testés par ordre décroissant du pouvoir antibactérien comme suit : *C. cassia* (28,7 mm), thymol (28 mm), cinnamaldéhyde

(25 mm), carvacrol (24,8 mm), eugénol (13,7 mm), *T. polium* (10,42 mm) *T. aureum* (10,14 mm) et géraniole (8,6 mm).

**Tableau 5 : Diamètre de la zone d'inhibitions du pouvoir antibactérien des composés étudiés (mm)**

Composés	<i>E. coli</i> BLC E255	<i>S. aureus</i> SARM 27 C1	<i>K. pneumoniae</i> BLCE 299	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>T.P. ssp. polium</i>	10,0 ± 0,5	23, ± 1,4	13,5 ± 0	8 ± 0,4	9,5 ± 0,5	13 ± 0,0	Ni
<i>T.P. ssp. aureum</i>	11,1 ± 0,6	21,2 ± 0,3	11 ± 0,3	8 ± 0,2	9,0 ± 0,0	14,5 ± 0,5	Ni
<i>C. cassia</i>	26 ± 1,1	30,5 ± 1	21,5 ± 0,5	25,4 ± 0,0	29,0 ± 0,7	40,0 ± 0,7	30,5 ± 0,8
Cinnamaldéhyde	25,2 ± 0,2	27 ± 1,2	20 ± 0,3	24,2 ± 0,4	25,1 ± 1,0	28 ± 0,1	22 ± 0,5
Thymol	34,5 ± 1	28 ± 0,6	22,1±0,3	17,3 ± 0,5	41,2 ± 0,0	42,3 ± 0,1	12,2 ± 0,3
Carvacrol	27,3 ± 1	24 ± 0,4	21 ± 1	15,2 ± 0,3	39,6 ± 0,3	38,6 ± 0,4	10 ± 0,0
Eugénol	15 ± 0,0	15 ± 0,1	16 ± 0,4	12 ± 0,3	14,3 ± 0,5	16,1 ± 0,5	8,0 ± 0,2
Géraniole	10 ± 0,0	16,2 ± 0	8 ± 0,2	Ni	18,1 ± 0,2	18,0 ± 1	Ni
Streptomycine	14 ± 0,1	14,0 ± 0	13 ± 0,3	14 ± 0,4	15 ± 0,5	16,4 ± 0,0	15,2 ± 0,5
Chloramphénicol	23±0,4	19,0 ± 0,4	23,2 ± 1,0	Ni	25,4 ± 0,2	25 ± 0,5	Ni
Ampicilline	Ni	12,0 ± 0,3	Ni	Ni	20,3 ± 0,5	37,3 ± 1,2	Ni

Ni : Pas d'inhibition ; *T.P. ssp. polium* : *Teucrium polium* ssp. *polium* ; *T.P. ssp. aureum* : *Teucrium polium* ssp. *aureum*; *C. cassia* : *Cinnamomum cassia*.

### 1.1.2 Concentrations minimales inhibitrices

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles étudiées, les molécules volatiles testées et les trois antibiotiques de référence, contre les différentes bactéries pathogènes sont présentés dans le Tableau 6. Ces résultats montrent clairement que les valeurs des CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition. En effet, les composés ayant induit de grandes zones d'inhibition présentent des petites CMI sur les souches correspondantes.

Il apparaît clairement que les CMI de l'HE de *C. cassia*, du cinnamaldéhyde et du thymol sont les plus faibles comparées aux CMI des autres composés. L'HE de *C. cassia* a montré l'activité la plus forte avec une CMI = 0,005 mg/mL contre *E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC 25923, une CMI = 0,01 mg/mL contre *S. aureus* SARM 27 C1 et une CMI= 0,02 mg/mL contre les souches restantes. Également, le cinnamaldéhyde a montré un large spectre antibactérien contre *S. aureus* SARM 27C1 et *S. aureus* ATCC 25923 avec des CMI de l'ordre

de 0,078 et 0,16 mg/mL respectivement. Principalement, le thymol et le carvacrol sont plus actifs contre les souches ATCC avec des CMI allant de 0,04 à 0,62 mg/mL. Cependant, l'eugénol et le géraniol ont présenté des activités antibactériennes modérées avec des CMI supérieures à 5,62 mg/mL (Tableau 6).

En ce qui concerne l'activité antibactérienne des huiles essentielles des deux sous-espèces de *Teucrium polium* on a remarqué que les deux HEs ont une activité comparable et modérée vis-à-vis *S. aureus* SARM 27C1 et *P. aeruginosa* avec des CMI de l'ordre de 2,81 et 5,62 mg/mL, respectivement. En outre, *T. polium* ssp. *polium* est plus active sur *K. pneumoniae* que *T. polium* ssp. *aureum* avec des CMI de l'ordre de 0,7 et 1,4 mg/mL, respectivement. Cependant, *T. polium* ssp. *aureum* montre un pouvoir inhibiteur supérieur à celui de *T. polium* ssp. *polium* vis-à-vis *E. coli* BLCE 255 avec des CMI de 2,81 et 5,62 mg/mL, respectivement (Tableau 6).

**Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles et les molécules volatiles étudiées (mg/ml)**

Souches bactériennes  Composés	<i>E. coli</i> BLCE 255	<i>S. aureus</i> SARM 27 C1	<i>K. pneumoniae</i> BLCE 299	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>T.P. ssp. polium</i>	5,62	2,81	0,7	5, 62	5,6	2,81	NT
<i>T.P. ssp. aureum</i>	2,81	2,81	1,4	5, 62	5,6	2,81	NT
<i>C. cassia</i>	0,02	0,01	0,02	0,02	0,005	0,005	0,02
Cinnamaldéhyde	0,31	0,16	0,63	0,31	0,31	0,078	0,16
Thymol	0,351	0,351	0,703	1,406	0,078	0,078	0,04
Carvacrol	0,703	0,703	0,703	1,406	0,156	0,315	0,625
Eugénol	5,62	5,62	5,62	11,32	25	12,5	Nt
Géraniol	25	12,5	>25	NT	25	12,5	Nt
Streptomycine	0,014	0,14	0,013	0,014	0,015	0,016	0,015
Chloramphénicol	0,023	0,019	0,023	NT	0,025	25	Ni
Ampicilline	NT	0,012	NI	NT	0,020	0,037	Ni

Ni : Pas d'inhibition ; *T.P. ssp. polium* : *Teucrium polium* ssp. *polium* ; *T.P. ssp. aureum* : *Teucrium polium* ssp. *aureum* ; *C. cassia* : *Cinnamomum cassia*.

## **1.2 Potentiel synergique des huiles essentielles avec les molécules volatiles**

Les combinaisons de l'HE de *C. cassia* ou de *T. polium* ssp. *polium* avec certaines molécules telles que, trans-cinnamaldéhyde, thymol, le carvacrol et eugénol et géraniol, ont été réalisées selon la méthode de l'échiquier vis-à-vis les sept souches bactériennes étudiées. Les résultats sont illustrés dans les tableaux 7 et 8.

Parmi les 57 combinaisons effectuées, 8 ont montré une synergie ( $FICI \leq 0,5$ ), 12 ont révélé un effet additif ( $0,5 < FICI \leq 1$ ), 25 ont présenté une action indifférente ( $1 < FICI \leq 4$ ) et 10 ont témoigné un effet antagoniste ( $FICI > 4$ ). En effet, l'huile essentielle de *C. cassia* montre une synergie avec le thymol et le carvacrol contre les deux souches de *S. aureus* et avec le thymol contre *E. coli* BLCE 255 avec une FICI de 0,5 (Tableau 7). De même, l'HE de *T. polium* présente un effet synergique ( $FICI=0,5$ ) avec le thymol contre les deux espèces de *S. aureus* et avec le carvacrol contre *S. aureus* SARM 27 C1 (Tableau 8). *T. polium* montre un effet additif quand elle est mélangée avec le thymol contre les deux espèces d'*E. coli* ou avec le trans-cinnamaldéhyde contre les deux espèces de *S. aureus*, *K. pneumoniae* BLCE 299 et *E. coli* BLCE 255. En outre, la combinaison de l'HE de *C. cassia* avec son composé majoritaire, le trans-cinnamaldéhyde montre un effet additif contre les deux espèces de *S. aureus* et une action indifférente vis-à-vis les autres souches. Tandis que, la combinaison de HE *C. cassia* ou de *T. polium* avec l'eugénol ou avec le géraniol montre toujours des effets indifférents ou antagonistes contre les souches testées.

Tableau 7 : Combinaisons de l'huile essentielle de *C. cassia* avec certaines molécules volatiles

Souches	Composés combinés	FICI	Conclusion
<i>E. coli</i> BLCE 255	<i>C. cassia</i> /Cinnamaldéhyde	2	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Thymol	0,5	Synergique
	<i>C. cassia</i> /Carvacrol	1,5	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	2,125	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Géranol	4,250	Antagoniste
<i>S. aureus</i> SARM 27 C1	<i>C. cassia</i> / Cinnamaldéhyde	0,750	Additif
	<i>C. cassia</i> /Thymol	0,5	Synergique
	<i>C. cassia</i> /Carvacrol	0,5	Synergique
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	2,125	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /géranol	4,125	Antagoniste
<i>K. pneumoniae</i> BLCE 299	<i>C. cassia</i> / Cinnamaldéhyde	2	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Thymol	1,00	Additif
	<i>C. cassia</i> /Carvacrol	1,50	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	1,250	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Géranol	NT	-
<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. cassia</i> / Cinnamaldéhyde	3,00	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Thymol	1,50	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /carvacrol	2,50	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	NT	-
	<i>C. cassia</i> /Géranol	NT	-
<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>C. cassia</i> /Cinnamaldéhyde	1,50	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Thymol	0,750	Additif
	<i>C. cassia</i> /Carvacrol	1,00	Additif
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	4,320	Antagoniste
	<i>C. cassia</i> /Géranol	4,125	Antagoniste
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. cassia</i> / Cinnamaldéhyde	0,625	Additif
	<i>C. cassia</i> /Thymol	0,5	Synergique
	<i>C. cassia</i> /carvacrol	0,625	Additif
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	4,063	Antagoniste
	<i>C. cassia</i> /Géranol	4,125	Antagoniste
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2785	<i>C. cassia</i> / Cinnamaldéhyde	2,00	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Thymol	1,50	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Carvacrol	2,50	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Eugénol	NT	-
	<i>C. cassia</i> /Géranol	NT	-

NT: non testé; *C.cassia* : *Cinnamomun cassia*.

Tableau 8 : Combinaisons de l'huile essentielle de *T. polium* avec certaines molécules volatiles

Souches	Composés combinés	FICI	Conclusion
<i>E. coli</i> BLCE 255	<i>T. polium</i> /Cinnamaldéhyde	2	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Thymol	0,750	Additif
	<i>T. polium</i> / Carvacrol	1,5	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Eugénol	2,125	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Géraniol	2,125	Indifférent
<i>S. aureus</i> SARM 27 C1	<i>T. polium</i> / Cinnamaldéhyde	0,750	Additif
	<i>T. polium</i> /Thymol	0,5	Synergique
	<i>T. polium</i> /Carvacrol	0,5	Synergique
	<i>T. polium</i> /Eugénol	2,125	Antagoniste
	<i>T. polium</i> /Géraniol	4,125	Antagoniste
<i>K. pneumoniae</i> BLCE 299	<i>T. polium</i> /Cinnamaldéhyde	2	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Thymol	1,00	Additif
	<i>T. polium</i> /Carvacrol	1,50	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Eugénol	1,250	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Géraniol	NT	-
<i>P. aeruginosa</i>	<i>T. polium</i> /Cinnamaldéhyde	3,00	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Thymol	1,50	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Carvacrol	2,50	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Eugénol	NT	-
	<i>T. polium</i> /Géraniol	NT	-
<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>T. polium</i> /Cinnamaldéhyde	1,50	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Thymol	0,750	Additif
	<i>T. polium</i> /CarvacroCl	1,00	Additif
	<i>T. polium</i> /Eugénol	4,320	Antagoniste
	<i>T. polium</i> /Géraniol	4,125	Antagoniste
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>T. polium</i> /Cinnamaldéhyde	0,625	Additif
	<i>T. polium</i> /Thymol	0,50	Synergique
	<i>T. polium</i> /Carvacrol	0,625	Additif
	<i>T. polium</i> /Eugénol	2,50	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Géraniol	3	Indifférent
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>T. polium</i> /Cinnamaldéhyde	NT	-
	<i>T. polium</i> /Thymol	NT	-
	<i>T. polium</i> /Carvacrol	NT	-
	<i>T. polium</i> /Eugénol	NT	-
	<i>T. polium</i> /Géraniol	NT	-

NT: non testé; *T. polium* : *Teucrium polium* ssp. *polium*.

### 1.3 Étude du potentiel synergique des HEs avec certains antibiotiques

L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet antibactérien de la combinaison des huiles essentielles de *C. cassia* ou de *T. polium* avec certains antibiotiques tels que Streptomycine, Ampicilline et chloramphénicol.

Les résultats obtenus révèlent que parmi les 15 combinaisons réalisées entre l'HE de *C. cassia* et les antibiotiques choisis, cinq ont montré une synergie et sept ont montré un effet additif et le reste a montré une action indifférente (Tableau 9). En effet, la combinaison de l'HE de *C. cassia* avec l'Ampicilline montre une synergie contre les deux espèces de *S. aureus*. En outre, cette huile exprime une interaction synergique lorsqu'elle est associée avec le chloramphénicol vis-à-vis les deux souches d'*E. coli* testées. Une action additive a été observée lors de la combinaison de *C. cassia* avec la Streptomycine contre les deux souches d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* et contre *S. aureus* ATCC 25923, ou lors de l'association de cette huile avec le chloramphénicol vis-à-vis, *S. aureus* SARM 27 C1 et *K. pneumoniae* BLCE 299 (Tableau 9).

**Tableau 9 : Combinaisons de l'huile essentielle de *C. cassia* avec certains antibiotiques**

Souches	Composés combinés	FICI	Conclusion
<i>E. coli</i> BLCE 255	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	1	Additif
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	0,375	Synergie
<i>S. aureus</i> SARM 27 C1	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	1,25	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	0,50	Synergie
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	0,75	Additif
<i>K. pneumoniae</i> BLCE 299	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	2	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	0,75	Additif
<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	0,75	Additif
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	NT	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	1	Additif
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	1,259	Indifférent
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	0,5	Synergie
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	0,750	Additif
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	0,375	Synergie
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	0,5	Synergie
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2785	<i>C. cassia</i> /Streptomycine	1	Additif
	<i>C. cassia</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>C. cassia</i> /Chloramphénicol	NT	-

NT : non testé; *C.cassia* : *Cinnamomun cassia*.

Le Tableau 10 met en évidence les combinaisons de l'huile essentielle de *T. polium* avec certains antibiotiques, parmi les 14 combinaisons effectuées nous avons trouvé cinq effets synergiques, six actions additives et trois effets indifférents. En effet, l'association de l'HE de *T. polium* avec le Chloramphénicol a montré une action synergique vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *K. pneumoniae* BLCE 299, cette action a été observée aussi contre *S. aureus* SARM 27 C1 lors de la combinaison de cette HE avec la Streptomycine et contre *S. aureus* ATCC 25923 lors de l'association de cette huile avec l'Ampicilline. Cependant, un effet additif contre *E. coli* BLCE 255 a été observé lorsqu'on mélange l'HE de *T. polium* avec la Streptomycine ou le chloramphénicol. Cette action additive a été enregistrée également contre *S. aureus* SARM 27 C1 lorsqu'on mélange *T. polium* avec l'Ampicilline ou chloramphénicol et chez *E. coli* ATCC 25922 en combinant l'HE de *T. polium* avec le Streptomycine ou l'Ampicilline (Tableau 10).

**Tableau 10 : Combinaisons de l'huile essentielle de *T. polium* avec certains antibiotiques**

Souches	Composés combinés	FICI	Conclusion
<i>E. coli</i> BLCE 255	<i>T. polium</i> /Streptomycine	0,75	Additif
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>T. polium</i> /Chloramphénicol	1	Additif
<i>S. aureus</i> SARM 27 C1	<i>T. polium</i> /Streptomycine	0,5	Synergie
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	1	Additif
	<i>T. polium</i> /Chloramphénicol	0,625	Additif
<i>K. pneumoniae</i> BLCE 299	<i>T. polium</i> /Streptomycine	1,25	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>T. polium</i> /Chloramphénicol	0,5	Synergie
<i>P. aeruginosa</i>	<i>T. polium</i> /Streptomycine	2,5	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>T. polium</i> / Chloramphénicol	NT	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>T. polium</i> / Streptomycine	1	Additif
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	0,75	Additif
	<i>T. polium</i> /Chloramphénicol	0,5	Synergie
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>T. polium</i> /Streptomycine	1,5	Indifférent
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	0,5	Synergie
	<i>T. polium</i> /Chloramphénicol	0,5	Synergie
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2785	<i>T. polium</i> /Streptomycine	NT	-
	<i>T. polium</i> /Ampicilline	NT	-
	<i>T. polium</i> /Chloramphénicol	NT	-

NT: non testé; *T. polium* : *Teucrium polium* ssp. *polium*

## 2 Discussion

### 2.1 Pouvoir antibactérien des huiles essentielles et les molécules volatiles

Les résultats de la présente étude montrant le large spectre antibactérien de l'HE de *C. cassia* vont de pair avec ceux de Clemente *et al.* (2016). En effet, ces auteurs ont montré que l'HE de cannelle possède un potentiel inhibiteur contre les bactéries telles que *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 avec des CMI de l'ordre de 0,2, 0,2 et 0,5 mg/mL, respectivement. Singh *et al.* (2007), ont trouvé des diamètres d'inhibitions comparables à nos résultats en étudiant l'effet de l'HE de cannelle et le trans-cinnamaldéhyde contre deux souches pathogènes, *E. coli* et *S. aureus*. En plus, ils ont montré que cette huile exprime un pouvoir antibactérien contre *P. aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 50 mm. De même, il a été rapporté que l'HE de *C. cassia* exprime un large spectre antibactérien contre *S. aureus* ATCC6538 et *E. coli* ATCC11229 avec des CMI de 0,1 et 0,4 mg/mL respectivement (Lu *et al.*, 2011).

Par ailleurs, de nombreux travaux ont mentionné que les composés majoritaires des HEs sont ceux responsables de leur potentiel antimicrobien, dans ce sens on cite le trans-cinnamaldéhyde, le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le géraniol, respectivement, les composés majoritaires des huiles essentielles de cannelle, Thym, Origan, Clou de girofle et de géranium (Peña-Gómez *et al.*, 2019; Vitanza *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

Par ailleurs, plusieurs chercheurs ont évalué l'activité antibactérienne de *T. polium* sans préciser sa sous-espèce, en effet, les HEs des deux sous-espèces de *Teucrium polium* ont une activité généralement modérée contre toutes les souches étudiées, à l'exception de *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui présente une résistance totale, ce qui peut être expliqué par la pauvreté de ces HEs en composés de nature phénoliques (Fertout-Mouri *et al.*, 2017).

Par ailleurs, d'autres travaux ont étudié le pouvoir inhibiteur des HEs de *T. polium* contre cinq souches ATCC multirésistantes (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Entérocoques faecalis* et *Bacillus cereus*). Les résultats ont affirmé que cette HE est active contre toutes ces souches avec un diamètre d'inhibition qui ne dépasse pas 16 mm et une CMI d'environ 5 µg/mL, à l'exception de *P. aeruginosa* (Belmekki *et al.*, 2014). En outre, *S. aureus* montre le plus haut taux de sensibilité (100 %), alors que *E. coli*, *P. mirabilis* et *P. aeruginosa* exhibent une résistance (33,33 %) vis-à-vis l'huile essentielle *T. polium* récolté en Algérie (Belmekki *et al.* 2013).

*P. aeruginosa* s'est montré la souche la plus résistante dans notre étude, cette résistance pouvait être due à la structure de sa paroi, particulièrement sa membrane externe imperméable

aux composés des HEs et à l'action des mécanismes d'efflux protégeant les bactéries contre l'action de ces composés (Utcharykiat *et al.*, 2016 ; Tenore *et al.*, 2011). Cependant, cette souche s'est montrée plus sensible à l'HE de *C. cassia* qui exerce un mécanisme inhibiteur de la croissance bactérienne associée à une diminution de l'activité respiratoire, une dissipation du potentiel transmembranaire et une perte de la perméabilité membranaire (Bouhdid *et al.*, 2012).

À la lumière des résultats obtenus, on peut déduire que les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) sont les plus sensibles aux composés testés par rapport aux bactéries Gram négatif, comme il est rapporté par plusieurs travaux de recherches (Septama *et al.*, 2017; Ouelhadj *et al.*, 2017). Cette résistance observée est due à la différence de la structure entre les bactéries gram positives et celles gram négatives. En effet les Gram négatif sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une couche externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette couche externe forme une barrière d'imperméabilité aux composés hydrophobes, susceptibles de pénétrer et d'inhiber la prolifération bactérienne. Toutefois, cette couche est absente chez les bactéries Gram<sup>+</sup> de fait que la couche peptidoglycane se présente à l'extérieur, cela permet à ces microorganismes d'être disponibles à entrer en contact avec les composés des HEs (Oussalah *et al.*, 2006). En plus, les Gram négatifs sont dotées des pompes à efflux expulsant l'agent antibactérien à l'extérieur la cellule avant qu'il ne puisse agir (Cattoir, 2004).

À noter aussi que les mécanismes par lesquels les composés aromatiques et phénoliques peuvent inhiber les microorganismes sont différents. Le thymol et le carvacrol ont un groupe hydroxyle, qui joue un rôle majeur dans leurs activités antibactériennes (Saad *et al.*, 2013). Ils sont capables de modifier la membrane externe de la cellule (Burt, 2004) et de se combiner avec les groupes chargés de la membrane cellulaire, en augmentant sa perméabilité (Cristani *et al.*, 2007). De plus, le carvacrol est capable d'inhiber l'ATPase, ce qui entraîne la dissipation de la force motrice du proton et peut ensuite inhiber d'autres enzymes (Gill *et al.*, 2006). Ainsi, l'eugénol, par sa structure hydrophobe, est capable de pénétrer dans lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négatives, de s'insérer dans la bicouche phospholipidique et de modifier la structure et la perméabilité de la membrane cellulaire. En outre, le groupe hydroxyle de l'eugénol qui se lie aux protéines membranaires, affecte les caractéristiques de la membrane et perturbe la fonction de la membrane cytoplasmique (Zhang *et al.*, 2017). De plus, l'altération de la structure et la fonction membranaire peut rendre les macromolécules faciles à transporter à travers la membrane. En effet l'étude de l'activité antibactérienne des HEs semble indispensable pour confronter la faculté des espèces microbiennes à développer la biorésistance vis-à-vis les antibiotiques classiques. Les HEs par

leur richesse en composés bioactives rend la résistance bactérienne difficile, voire impossible en raison de la synergie de ces composés qui peut être encore majorée par l'association avec d'autres agents antimicrobiens. En plus, les microorganismes ne sont pas capables d'opérer les mutations conduisant à des résistances simultanées contre toutes les molécules bioactives (Kwiatkowski *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2020). L'association de l'HE avec d'autres agents antimicrobiens serait donc un moyen efficace pour réduire le risque de résistances, augmenter l'efficacité de l'effet antibactérien, et surtout contribuer à l'élargissement du spectre d'activités contre plusieurs espèces bactériennes et de manière simultanée.

## **2.2 Combinaison des HEs avec certains antibiotiques ou molécules volatiles.**

La récente approche sur l'utilisation des plantes en synergie avec d'autres agents antimicrobiens constitue une nouvelle stratégie pour résoudre le problème de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Dans le présent travail nous avons étudié l'effet synergique des HEs de *C. cassia* et de *T. polium* avec certaines molécules volatiles d'une part et avec quelques antibiotiques d'une autre part, contre des bactéries multirésistantes. Les résultats ont révélé que la combinaison de l'huile essentielle de *C. cassia* avec le thymol ou le carvacrol montre un effet synergique contre les deux souches de *S. aureus* et avec le thymol contre *E. coli* BLCE 255. De même, cette huile exprime une interaction synergétique lorsqu'elle est associée à l'Ampicilline ou au chloramphénicol vis-à-vis les souches de *S. aureus* et quand elle est combinée avec le chloramphénicol vis-à-vis les deux souches d'*E. coli*.

Plusieurs travaux ont démontré l'effet antibactérien de la combinaison de l'HE de cannelle avec d'autres composés. Par exemple Lu *et al.* (2011), ont utilisé la méthode d'échiquier pour étudier l'effet de la combinaison de l'HE de *C. cassia* avec les HEs de thym ou de clou de girofle, ces combinaisons montrent une action additive ou indifférente contre les bactéries d'origine alimentaire. Ces résultats ont été confirmés par la présente étude, soulignant ainsi l'efficacité de l'huile de *C. cassia* lorsqu'elle est associée au thymol ou au carvacrol.

L'effet du mélange de *C. cassia* et d'autres HEs a été rapporté dans des études antérieures, par exemple, Clemente *et al.* (2016), ont démontré que le mélange de *C. cassia* et l'HE de moutarde avait un effet additif contre *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et bien d'autres espèces bactériennes pathogènes. Certains autres auteurs ont déterminé l'effet antibactérien de la combinaison de l'HE de *C. cassia* avec d'autres agents antibactériens, dans ce sens Utcharykiat *et al.* (2016), ont indiqué que la *C. cassia* combinée à la colistine présente une action synergique contre *P. aeruginosa* multirésistante. De même Mahadlek *et al.* (2012) en utilisant l'essai en échiquier pour déterminer l'activité de l'huile de *C. cassia* en

association avec quelques agents antimicrobiens tels l'hyclate de doxycycline, le chlorhydrate de ciprofloxacine ou le métronidazole, ont dévoilé un effet additif contre *S. aureus* ATCC 6538P. Il a été rapporté également que l'association de l'huile de *C. cassia* avec le pipéracilline montre une interaction synergique contre *E. coli* multirésistante (Yap *et al.*, 2013). En effet, plusieurs rapports de recherche ont signalé l'action synergique entre les huiles essentielles et les antibiotiques (Fadli *et al.*, 2012 ; Kwiatkowski *et al.*, 2017 ; Vitanza *et al.*, 2019), ce qui est aussi, confirmé par le présent travail en mettant en évidence l'efficacité des huiles essentielles de *C. cassia* et *T. polium* lorsqu'elles sont associées à l'Ampicilline ou au chloramphénicol.

De leur part, les études cliniques sur la combinaison des agents antibactériens ont montré leurs efficacités en augmentant l'activité antibactérienne et en diminuant la concentration des antibiotiques. Ces derniers gardent toujours leurs activités inhibitrices surtout lorsqu'ils possèdent une forte synergie avec l'agent antibactérien auquel ils sont combinés (Fadli *et al.*, 2016). Des études récentes ont montré la possibilité de l'association des HEs avec les antibiotiques pour augmenter leurs effets à de faibles doses et pour diminuer la toxicité de certains antibiotiques (Vitanza *et al.*, 2019). La combinaison de ces deux agents antimicrobiens contribue également à diminuer le problème de la multirésistance bactérienne. En effet, les pompes à efflux des bactéries sont les responsables de la résistance contre la plupart des antibiotiques si elles sont utilisées seules. Les huiles essentielles agissent en inhibant les pompes à efflux MDR. Par conséquent, l'antibiotique peut agir sur la bactérie à une concentration efficace et réduite (Utchariyakiat *et al.*, 2016).

Par ailleurs, les mécanismes responsables de l'activité antimicrobienne de la *C. cassia* comprennent son composé majoritaire cinnamaldéhyde (Vasconcelos *et al.*, 2018), qui est une molécule électronégative pouvant interférer avec le processus biologique cellulaire, en particulier les substances azotées telles que les protéines et les acides nucléiques (Wendakoon *et al.*, 1995). En effet, dans la présente étude, la corrélation entre le potentiel antibactérien du *C. cassia* et celui de trans-cinamaldéhyde, ainsi, l'effet additif ou indifférent témoigné entre ces deux composés, confirme l'hypothèse de la responsabilité de cette molécule sur l'effet antibactérien de l'HE de *C. cassia*. En outre, l'oxyde d'éthylène de la *C. cassia* inhibe la prolifération bactérienne par le biais des effets de détection d'Antiquorum, inhibe la division cellulaire, l'ATPase, formation du biofilm, la porosité et la mobilité de la membrane ainsi il modifie le profil lipidique (Vasconcelos *et al.*, 2018). Il agit également sur la membrane cellulaire en produisant des coagulums via l'autoagrégation (Clemente *et al.*, 2016). Ces propriétés pourraient conduire à la réduction de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, à

la diminution de la dose d'antibiotique nécessaire au traitement, et donc à la diminution des effets secondaires toxiques des médicaments (Vitanza *et al.*, 2019). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour expliquer le mécanisme responsable de l'effet antibactérien de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques.

## Axe III : Dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *T. polium* et de *C. cassia*

### 1 Résultats

#### 1.1 Dosage des composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante des extraits des deux sous-espèces de *T. polium* et de *C. cassia* obtenus par Soxhlet

##### 1.1.1 Rendement d'extraction

Les résultats présentés dans le Tableau 11 révèlent que le rendement des extraits varie en fonction de la nature des solvants utilisés. Ainsi, quelle que soit la plante étudiée, les extraits méthanoliques et éthanoliques montrent les rendements les plus élevés, alors que ceux de l'acétate d'éthyle montrent les rendements les plus faibles. Les extraits aqueux présentent généralement des rendements intermédiaires.

**Tableau 11 : Rendement (%) des extraits de *T. polium* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet**

Extraits	Méthanol	Ethanol	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	11,84	12,128	7,82	3,752
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	11,664	9,128	6,02	5,68
<i>C. cassia</i>	17,22	13,33	12,42	6,43

##### 1.1.2 Teneur des extraits en composés phénoliques

###### 1.1.2.1 Teneur en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode du réactif de Folin Ciocalteu (Slinkard *et al.*, 1977). La quantité en polyphénols des extraits a été déterminée à partir de la droite d'étalonnage de l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de l'acide gallique par gramme de (mg EAG/g MS) et présentés dans la Figure 24.

D'après les résultats obtenus, il ressort que sur les quatre types de solvants utilisés, le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs extracteurs des composés phénoliques. De plus, la plante *C. cassia* est la plus riche en polyphénols par rapport aux autres plantes étudiées, avec une quantité en polyphénols de l'ordre de  $207 \pm 3,01$  mg EAG/g Ms dans l'extrait méthanolique et de  $193 \pm 2,91$  mg EAG/g Ms dans l'extrait éthanolique. Concernant, les deux sous-espèces de *T. polium*, les teneurs en polyphénols totaux sont généralement plus élevées dans les extraits de la sous-espèce *T. polium* ssp. *polium* que l'autre. Cependant, les extraits d'acétate d'éthyle de *T. polium* ssp. *aureum* et de *T. polium* ssp. *polium* présentent les teneurs phénoliques les plus

faibles avec des valeurs de l'ordre de  $4,38 \pm 0,12$  et  $24,49 \pm 0,63$  mg Eq AG/g Ms, respectivement.

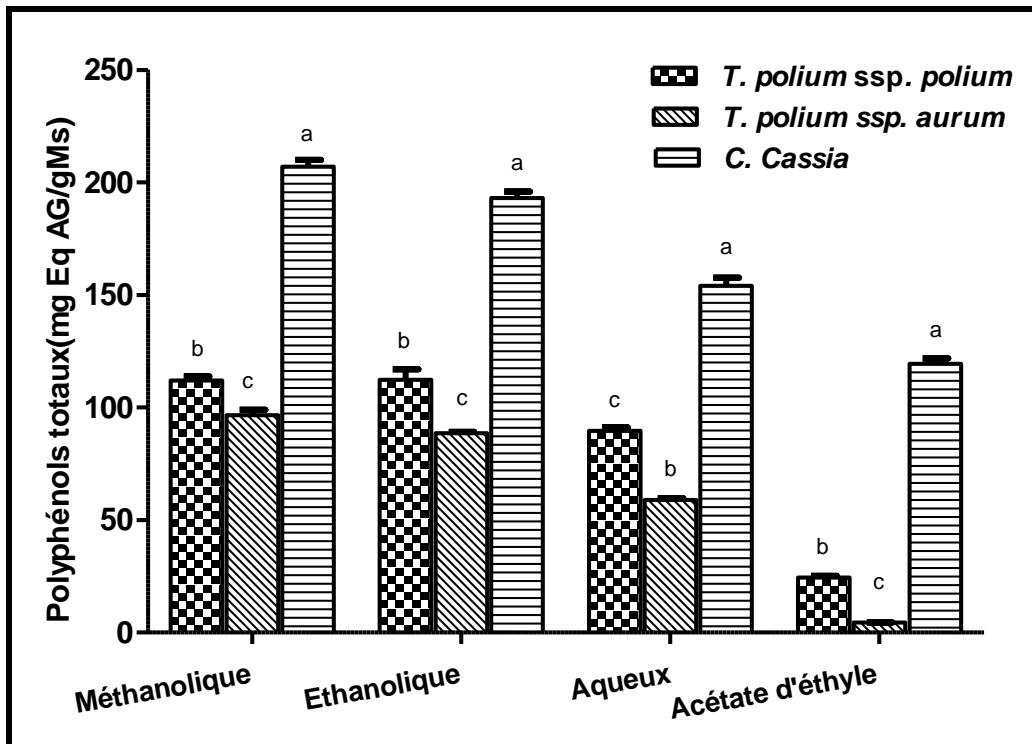


Figure 24 : Teneur en polyphénols totaux des extraits de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet (mgEq AG/gMs).

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

### 1.1.2.2 Teneurs en flavonoïdes totaux, flavones et flavonols.

Le dosage des flavonoïdes totaux, les flavones et les flavonols dans les différents extraits a été réalisé par des méthodes spectrophotométriques. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de la rutine par gramme de la matière sèche (mg Eq R/g Ms) pour les flavonoïdes totaux (Figure 25) et en en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de matière sèche (mg Eq Q/g Ms) pour les flavones et flavonols (Figure 26).

À la lumière des résultats obtenus on peut constater que l'extrait méthanolique de *C. cassia* contient les taux les plus élevés en flavonoïdes totaux ( $204 \pm 3,6$  mg Eq R/g Ms) et en flavones et flavonols ( $210 \pm 2,96$  mg Eq Q/g Ms). Par ailleurs, les extraits méthanoliques des deux sous-espèces de *T. polium* présentent des quantités similaires en flavonoïdes, alors que, les extraits aqueux et d'acétate d'éthyle, *T. polium ssp. polium* renferment des teneurs plus importantes en flavonoïdes totaux, flavones et flavonols que *T. polium ssp. aureum*. D'une manière générale,

tous les extraits de *C. cassia* présentent des teneurs en composés flavonoïques significativement supérieures à celles des extraits des deux sous-espèces de *T. polium*.

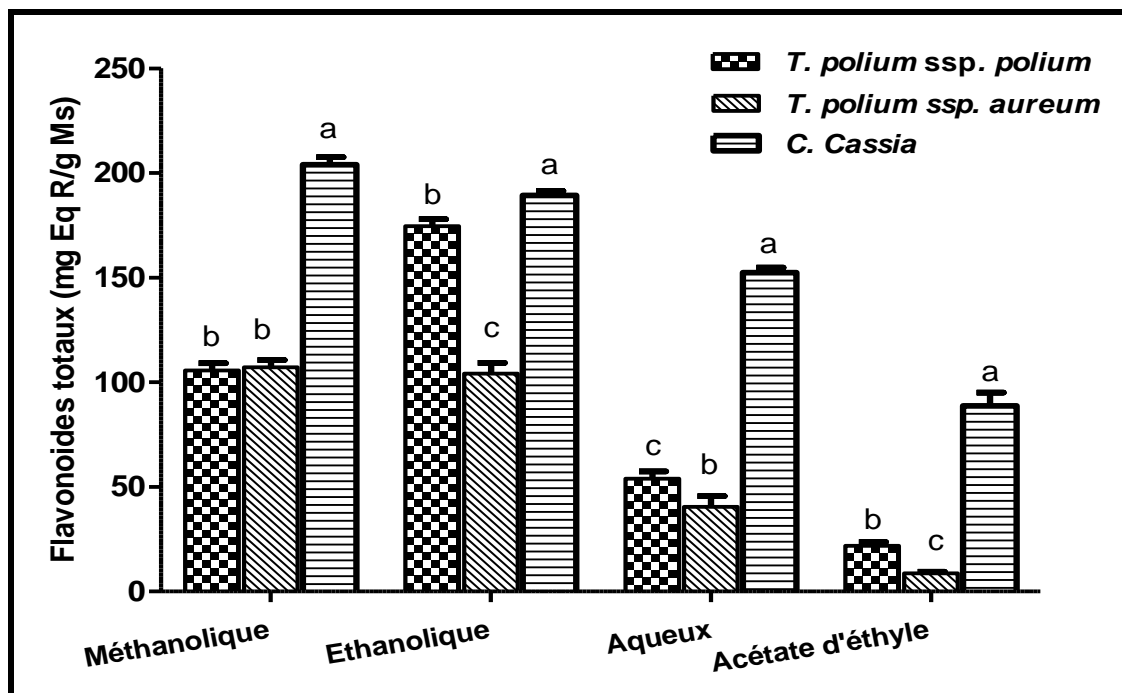


Figure 25 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de *T. polium ssp polium*, *T. polium ssp aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet.

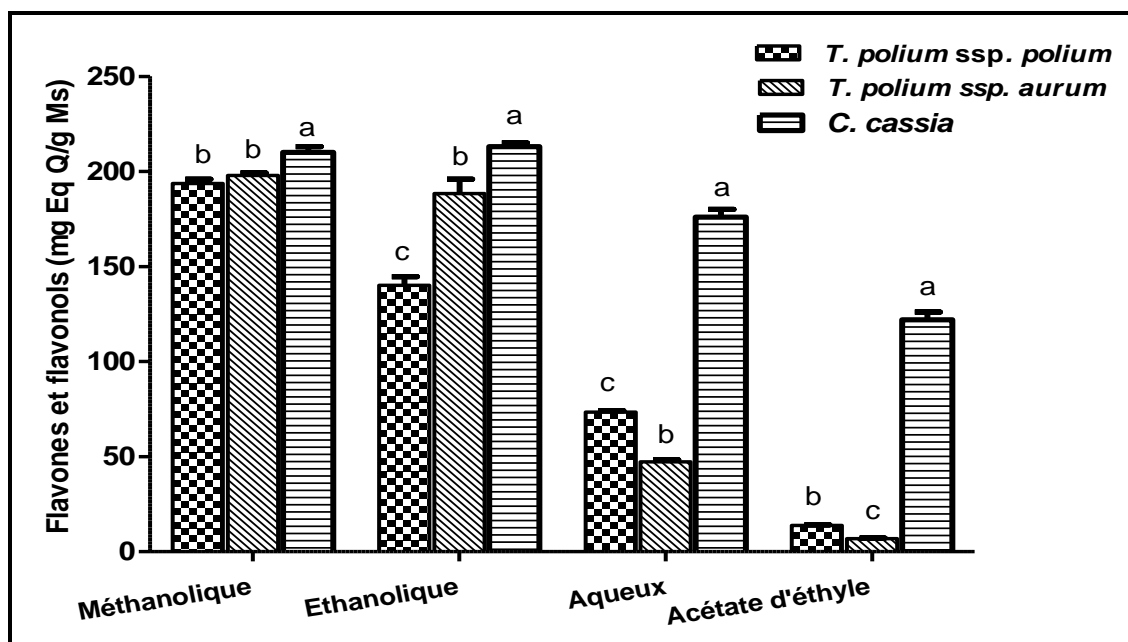


Figure 26 : Teneur en flavones et flavonols des extraits de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD. Les lettres différentes signifient une différence significative ( $p < 0,05$ ) pour le même solvant.

### 1.1.3 Activité antioxydante des extraits de *T. polium* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet

L'activité antioxydante des différents extraits de *T. polium* ssp. *aureum*, *T. polium* ssp. *polium* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet ont été évalué par quatre méthodes : ABTS, DPPH, FRAP et phosphomolybdène.

#### 1.1.3.1 Inhibition du radical libre ABTS<sup>•+</sup>

L'activité d'inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> a été exprimée en se basant sur la valeur d'IC<sub>50</sub> qui est définie comme la concentration d'extrait capable de neutraliser 50 % du radical ABTS. L'efficacité d'inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> est inversement proportionnelle à l'IC<sub>50</sub>. Ainsi, au niveau du Tableau 12, on peut remarquer que l'extrait méthanolique de *C. cassia* enregistre la meilleure capacité inhibitrice (IC<sub>50</sub> = 0,014 ± 0,002 mg/mL), suivi par l'extrait éthanolique de la même plante (IC<sub>50</sub> = 0,012 ± 0,001 mg/mL). En comparant les deux espèces de *T. polium* on constate que l'extrait méthanolique et éthanolique de *T. polium* ssp. *aureum* possèdent un pouvoir antioxydant important que celui de *T. polium* ssp. *polium*, et inversement pour les extraits aqueux et d'acétate d'éthyle. Toutefois, quel que soit le type de solvant utilisé, la *C. cassia* possède le pouvoir antioxydant le plus élevé.

**Tableau 12: Les IC<sub>50</sub> (mg/mL) d'inhibition du radical ABTS des extraits de *T. polium* ssp *polium*, *T. polium* ssp *aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet**

Type d'extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	0,3 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,029 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,022 <sup>b</sup>	2,70 ± 0,5 <sup>a</sup>
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	0,33 ± 0,013 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,02 ± 1,06 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	0,014 ± 0,002 <sup>c</sup>	0,012 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,012 <sup>c</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative (p < 0,05). Tous les extraits sont significativement différents au Trolox (IC<sub>50</sub> = 0,01 ± 0,002 mg/mL).

#### 1.1.3.2 Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>

L'activité de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> a été exprimée par la valeur d'IC<sub>50</sub> qui est définie comme étant la concentration en extrait qui neutralise 50 % du radical DPPH<sup>•</sup>. Les IC<sub>50</sub> des différents extraits ont été déterminés et illustrés dans le Tableau 13.

Les résultats présentés montrent que les meilleures activités sont enregistrées par les extraits de *C. cassia*. En effet, l'extrait aqueux présente une activité antioxydante (0,07 mg/mL) supérieure à celle de l'antioxydant de référence BHT (0,11 mg/mL). En comparant l'activité des extraits des deux sous-espèces de *T. polium*, on remarque que *T. polium* ssp. *polium* est

dotée d'une activité antioxydante significativement plus levée que *T. polium* ssp. *aureum* dont l'extrait méthanolique possède la meilleure activité ( $0,388 \pm 0,06$  mg/mL). Les extraits d'acétate d'éthyle de *T. polium* ssp. *polium* et de *T. polium* ssp. *aureum* montrent le plus faible effet antioxydant avec des valeurs de  $3,50 \pm 0,18$  et  $5,00 \pm 0,92$  mg/mL respectivement.

**Tableau 13 : Les  $IC_{50}$  (mg/mL) du piégeage du radical DPPH' des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet.**

Type d'extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	$0,38 \pm 0,06^b$	$0,39 \pm 0,04^b$	$0,46 \pm 0,01^a$	$3,50 \pm 0,18^b$
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	$0,47 \pm 0,00^a$	$0,51 \pm 0,05^a$	$0,49 \pm 0,01^b$	$5,00 \pm 0,92^a$
<i>C. cassia</i>	$0,15 \pm 0,03^c$	$0,17 \pm 0,00^c$	$0,07 \pm 0,00^c$	$0,5 \pm 0,13^c$

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD. Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative ( $p < 0,05$ ). Tous les extraits sont significativement différents au BHT ( $IC_{50} = 0,11 \pm 0,001$ ).

### 1.1.3.3 Pouvoir réducteur du fer

Le pouvoir réducteur du fer des extraits a été exprimé par la valeur d' $EC_{50}$  qui est définie comme étant la concentration de l'extrait nécessaire pour donner 0,5 de l'absorbance. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 14. Il en ressort que le meilleur pouvoir réducteur des plantes étudiées est enregistré par *C. cassia*. En effet, la fraction méthanolique de cette plante possède le plus grand pouvoir réducteur ( $0,02 \pm 0,002$  mg/mL). Quant aux deux sous-espèces de *T. polium*, on constate que les extraits de *T. polium* ssp. *aureum* ont un pouvoir réducteur plus élevé que ceux de *T. polium* ssp. *polium*, à l'exception de l'extrait aqueux.

**Tableau 14 : les  $EC_{50}$  (mg/mL) du pouvoir réducteur de fer des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet**

Type d'extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	$0,32 \pm 0,012^a$	$0,39 \pm 0,01^a$	$0,46 \pm 0,011^b$	$3,293 \pm 0,06^a$
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	$0,19 \pm 0,006^b$	$0,38 \pm 0,02^a$	$0,59 \pm 0,031^a$	$3,947 \pm 0,15^a$
<i>C. cassia</i>	$0,02 \pm 0,002^c$	$0,05 \pm 0,004^b$	$0,21 \pm 0,01^c$	$1,5 \pm 0,02^b$

Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative ( $p < 0,05$ ). Tous les extraits sont significativement différents à la quercétine ( $EC_{50} = 0,033 \pm 0,0004$  mg/mL).

### 1.1.3.4 Capacité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale des différents extraits a été déterminée par la méthode de phosphomolybdène et exprimée en milligramme équivalent de la vitamine C par gramme de la matière sèche (mg Eq vit C/g Ms). D'après la Figure 27, on remarque que tous les extraits présentent une capacité antioxydante remarquable. Toutefois, cette capacité diffère selon le

solvant d'extraction et la plante testée. En effet, l'extrait méthanolique de *C. cassia* révèle la capacité antioxydante la plus élevée avec une valeur de l'ordre de  $218,33 \pm 2,08$  mg Eq Vit C/g Ms, suivi par les extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* ( $215,09 \pm 9,03$  mg Eq Vit C/g Ms) et de *T. polium* ssp. *aureum* ( $212,10 \pm 8,66$  mg Eq Vit C/g Ms). Tous les extraits de *C. cassia* (à l'exception de l'extrait aqueux) révèlent une capacité antioxydante plus grande que ceux des autres plantes testées. En comparant les deux sous-espèces de *T. polium* on peut déduire que *T. polium* ssp. *aureum* possède un pouvoir antioxydant plus important que *T. polium* ssp. *polium*.

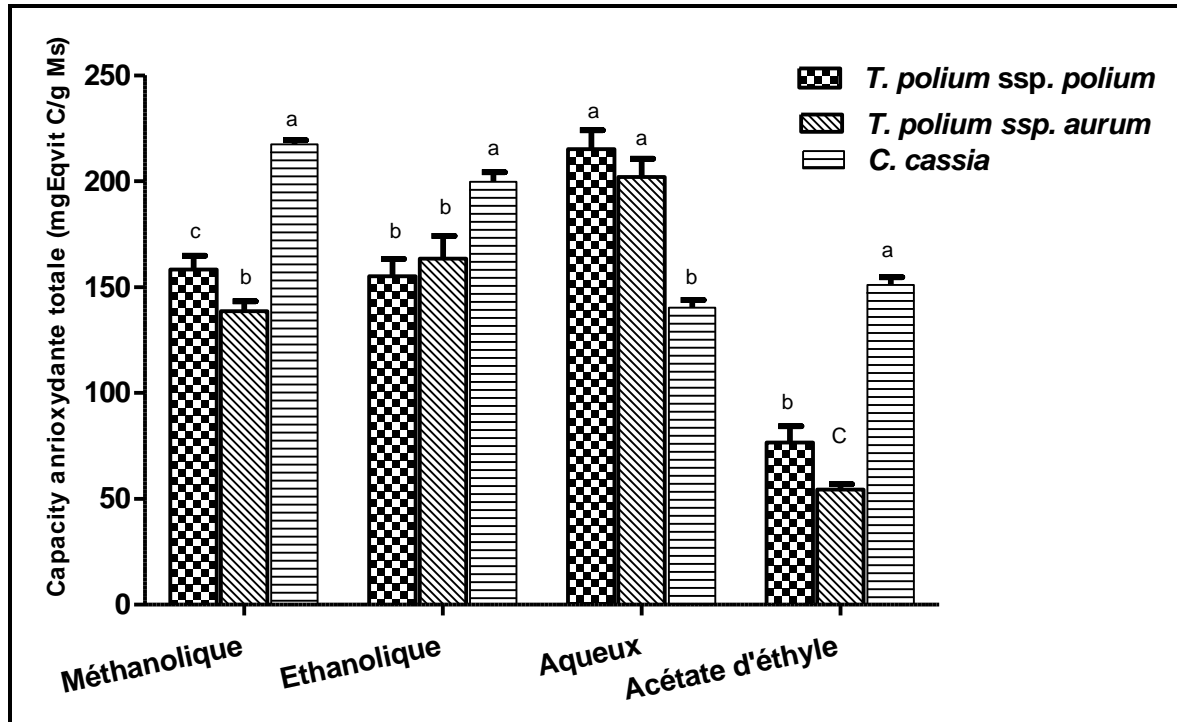


Figure 27 : Capacité antioxydante totale (mg Eq Vit C/g Ms) des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par Soxhlet

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD. Les différentes lettres signifient une différence significative pour le même solvant ( $p < 0,05$ ).

#### 1.1.4 Corrélations entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques

Dans le but de chercher la relation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des extraits testés, on a calculé le coefficient de corrélations Pearson. Comme il est illustré dans le Tableau 15, la teneur en polyphénols totaux est significativement corrélée avec les résultats de tous les tests de l'activité antioxydante avec un coefficient de corrélation entre -0,668 et -0,74. En effet, les taux des flavonoïdes totaux sont significativement corrélés avec le pouvoir antioxydant évalué par les tests de FRAP ( $r = -0,685$ ) et d'ABTS ( $r = -0,636$ ). En outre, les fortes significatives corrélations ont été enregistrées entre la teneur en flavones et flavonols

et l'activité antioxydante mesurée par les tests d'ABTS, DPPH et FRAP, avec des coefficients de corrélation respectivement de l'ordre de -0,768 ; -0,718 et -0,804. Toutefois, la teneur en composés flavoniques indique une corrélation faible avec la capacité antioxydante totale (CAT).

**Tableau 15 : Coefficients de corrélation de Pearson (r) entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques**

	ABTS	DPPH	FRAP	CAT
Polyphénols totaux	-0,74**	-0,736**	-0,736**	0,668*
Flavonoïdes totaux	-0,636*	-0,513	-0,685*	0,397
Flavones et Flavonols	-0,768**	-0,718**	-0,804**	0,498

\* P< 0,05 ; \*\* : P< 0,01

## **1.2 Teneur en composés phénoliques et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *T. polium* et *C. cassia* obtenus par macération.**

### **1.2.1 Rendement d'extraction**

Le rendement des extraits préparés par macération des trois plantes a été calculé par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Les résultats illustrés dans le Tableau 16 indiquent que l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction pour *T. polium* ssp. *polium*. Contrairement au *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* qui donnent un meilleur rendement avec le solvant méthanolique. Toutefois, l'extraction aqueuse donne des rendements moyens et semblables pour les trois plantes. Cependant, l'extraction par l'acétate d'éthyle présente les rendements les plus faibles.

**Tableau 16 : Rendement (%) des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par la technique de macération**

Extraits	Méthanol	Ethanol	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>Polium</i>	4,832	6,14	5,16	1,144
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	6,19	4,124	5,184	1,124
<i>C. cassia</i>	6,19	6,16	5,13	2,18

## 1.2.2 Teneur des composés phénoliques des extraits obtenus par macération

### 1.2.2.1 Teneur en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de l'acide gallique par gramme de la matière sèche (mg Eq AG/g MS) et présentés dans la Figure 28. Il en ressort que les extraits méthanoliques et éthanoliques de *T. polium ssp. polium* contiennent les quantités les plus élevées de polyphénols avec des valeurs de l'ordre de  $109.45 \pm 1,77$  et de  $100 \pm 3,57$  mg Eq AG/g Ms, respectivement. Néanmoins, les extraits d'acétate d'éthyle de *T. polium ssp. polium* et *T. polium ssp. aureum* présentent les teneurs phénoliques les plus faibles avec des valeurs de l'ordre de  $29,75 \pm 0,99$  et de  $28,12 \pm 0,66$  mg Eq AG/g Ms, respectivement. Concernant les extraits de *C. cassia*, la teneur en polyphénols est plus élevée dans l'extrait éthanolique, contrairement, à l'extrait aqueux et d'acétate d'éthyle. Pour les quatre types de solvants, le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs extracteurs des polyphénols totaux.

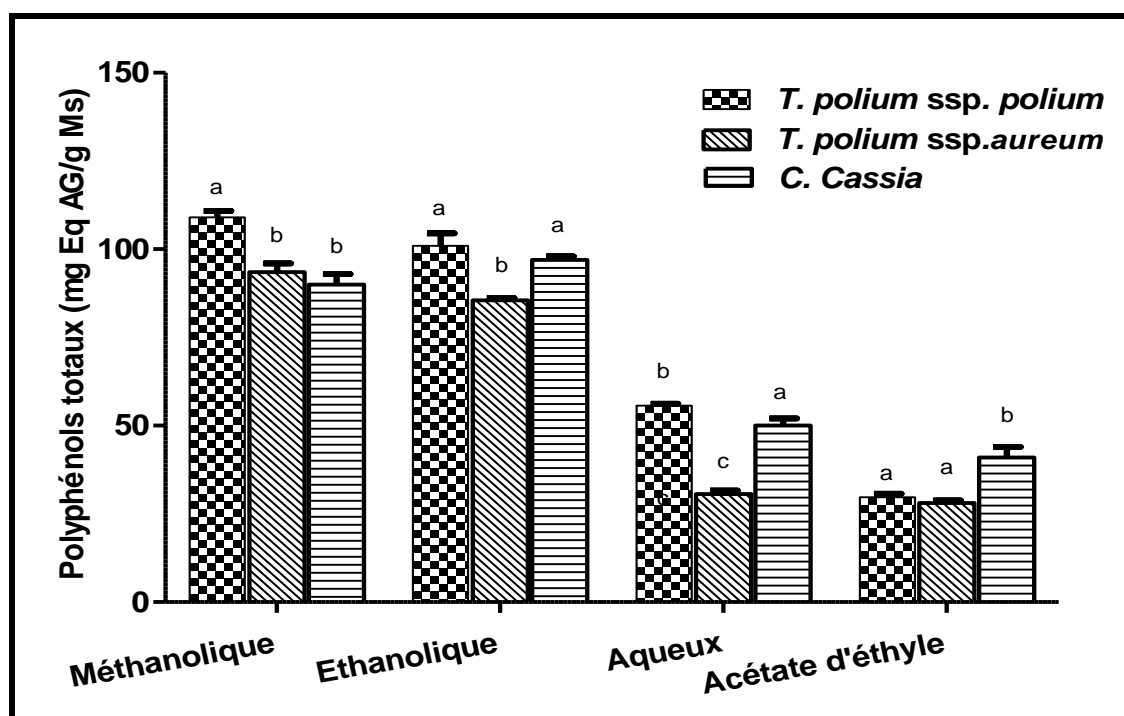


Figure 28 : Teneur en polyphénols des extraits de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et *C. cassia* obtenus par macération.

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

### 1.2.2.2 Teneur en flavonoïdes totaux, flavones et flavonols

La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme équivalent de la rutine par gramme de la matière sèche (mg Eq R/g Ms) et présentée dans la Figure 29. Tandis que, la teneur en flavones et flavonols est exprimée en milligramme équivalent de la quercitine par gramme de la matière sèche (mg Eq Q/g Ms) et illustrée dans la Figure 30.

Les résultats dévoilent que les extraits de *C. cassia* recèlent les teneurs les plus élevées en flavonoïdes par rapport aux extraits des deux sous-espèces de *T. polium*. En effet, l'extrait méthanolique de *C. cassia* contient le taux le plus élevé en composés flavonoïques. De même, les extraits de *T. polium ssp. polium* contiennent des quantités plus élevées en flavonoïdes totaux que ceux de *T. polium ssp. aureum* et vice versa pour les teneurs en flavones et flavonols. En outre, le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs solvants d'extraction des flavonoïdes.

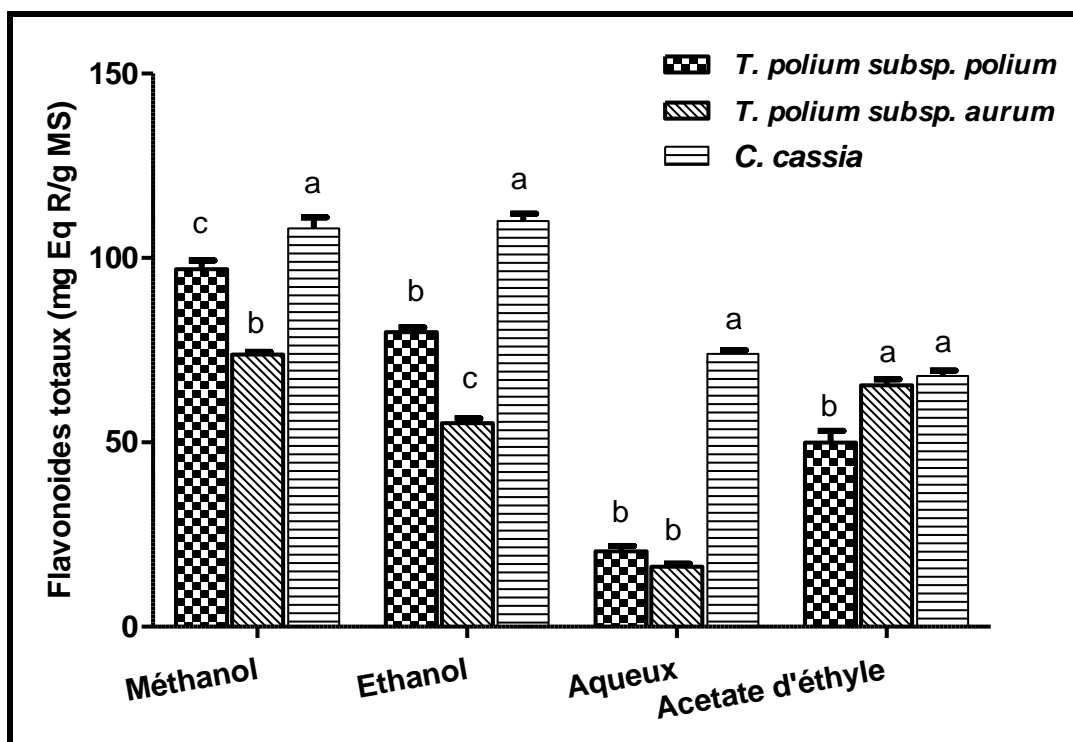


Figure 29 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et *C. cassia* obtenus par macération (mgEq R/gMs).

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

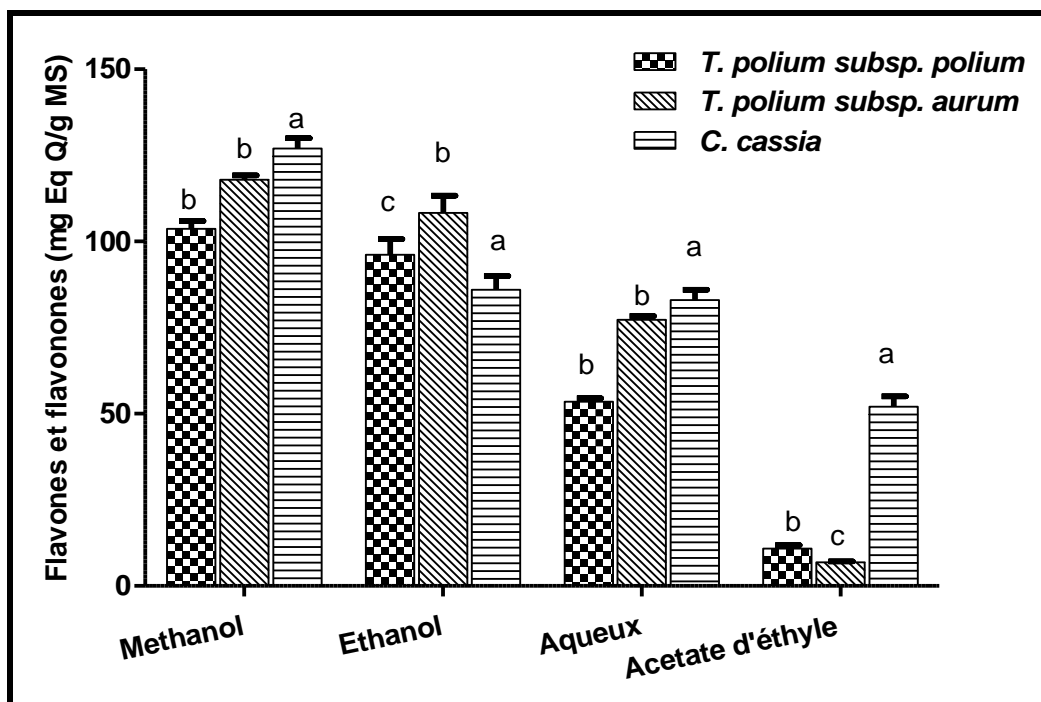


Figure 30 : Teneur en flavones et flavonols des extraits de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et *C. cassia* obtenus par macération (mg Eq Q/gMs).

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

### 1.2.3 Activité antioxydante des extraits des deux sous-espèces de *T. polium* et de *C. cassia* obtenus par macération

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques, éthanoliques, aqueux et d'acétate d'éthyle de *T. polium ssp. aureum*, *T. polium ssp. polium* et de *C. cassia* obtenus par macération, a été évaluée par quatre méthodes : ABTS, DPPH, FRAP et phosphomolybdène.

#### 1.2.3.1 Inhibition du radical libre ABTS<sup>•+</sup>

Les résultats du potentiel d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> exprimés par l'IC<sub>50</sub> sont récapitulés dans le Tableau 17. Il ressort que l'extrait méthanolique de *C. cassia* enregistre la meilleure capacité inhibitrice d'ABTS<sup>•+</sup> avec une valeur de IC<sub>50</sub> de l'ordre de  $0,25 \pm ,0001$  mg/mL, suivi par l'extrait éthanolique du *C. cassia* dont la valeur d'IC<sub>50</sub> est égale  $0,032 \pm 0,0$  mg/mL. Quel que soit le type de solvant utilisé, la *C. cassia* possède le pouvoir antioxydant le plus élevé. En comparant les deux sous-espèces de *T. polium*, on constate que les extraits méthanoliques, aqueux et éthanoliques de *T. polium ssp. aureum* possèdent un pouvoir antioxydant significativement élevé que ceux de *T. polium ssp. polium*. Cependant, les extraits d'acétate d'éthyle des deux sous-espèces de *T. polium*, expriment des effets inhibiteurs similaires.

**Tableau 17 : Les IC<sub>50</sub> (mg/mL) d'inhibition du radical ABTS des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par macération**

Type d'extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	0,43 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,022 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,032 <sup>b</sup>	3,5 ± 0,46 <sup>a</sup>
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	0,47 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,041 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,72 ± 1,06 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	0,25 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,32 ± 0,042 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,018 <sup>c</sup>	3,25 ± 0,7 <sup>a</sup>

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative (p <0,05). Tous les extraits sont significativement différents au Trolox (IC<sub>50</sub> = 0,01 ± 0,002 mg/mL).

### 1.2.3.2 Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>

Les valeurs des IC<sub>50</sub> exprimant le pouvoir du piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> des extraits obtenus par macérations des trois plantes étudiées sont illustrées dans le Tableau 18. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits de *C. cassia* possèdent une activité anti-radicalaire remarquable par rapport aux extraits des autres plantes. En effet, la meilleure activité a été enregistrée avec la fraction éthanolique de *C. cassia* (IC<sub>50</sub> = 0,33 ± 0,07). En comparant les deux sous-espèces de *T. polium*, on peut déduire que *T. polium* ssp. *polium* est dotée d'une activité antioxydante plus élevée que *T. polium* ssp. *aureum*, et ce, pour tous les types d'extraits testés. Aussi, la meilleure activité de *T. polium* ssp. *polium* a été attribuée à l'extrait méthanolique (0,40 ± 0,03 mg/mL). Néanmoins, les extraits d'acétate d'éthyle des trois plantes montrent un effet antioxydant faible.

**Tableau 18 : Les IC<sub>50</sub> (mg/mL) du piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par macération**

Type d'extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	0,40 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,031 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,012 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,15 <sup>b</sup>
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	0,49 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,035 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,021 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,87 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	0,38 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,42 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,07 ± 0,11 <sup>c</sup>

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative (p <0,05). Tous les extraits sont significativement différents au BHT (IC<sub>50</sub> = 0,11 ± 0,0001).

### 1.2.3.3 Pouvoir réducteur du fer

Les résultats du pouvoir réducteur du fer des extraits testés, exprimés par la valeur d'EC<sub>50</sub> indiquent que tous les extraits de *C. cassia* présentent le meilleur pouvoir réducteur en les comparant aux extraits des autres plantes. En effet, l'extrait méthanolique de *C. cassia* possède le plus grand pouvoir réducteur avec une valeur de l'ordre de EC<sub>50</sub> = 0,13 ± 0,01 mg/mL. En comparant les deux sous-espèces de *T. polium*, on constate que les extraits de *T. polium* ssp.

*polium* ont un pouvoir antioxydant plus élevé que ceux de *T. polium* ssp. *aureum*, excepté l'extrait méthanolique (Tableau 19).

**Tableau 19 : les  $EC_{50}$  (mg/mL) du pouvoir réducteur du fer des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* obtenus par la macération.**

Type d'extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux	Acétate d'éthyle
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	0,28 ± 0,014 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,89 ± 0,081 <sup>b</sup>
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	0,15 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,041 <sup>a</sup>	4,23 ± 0,11 <sup>a</sup>
<i>C. cassia</i>	0,13 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,25 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,09 <sup>c</sup>	2,88 ± 0,21 <sup>c</sup>

Chaque valeur représente la moyenne de trois valeurs ± SD. Les différentes lettres dans une même colonne signifient une différence significative ( $p < 0,05$ ). Tous les extraits sont significativement différents à la quercétine ( $EC_{50} = 0,033 \pm 0,0004$  mg/mL).

#### **1.2.3.4 Capacité antioxydante totale.**

La capacité antioxydante totale des différents extraits est exprimée en milligramme équivalent de la vitamine C par g de la matière sèche (mg Eq vit C/g Ms). D'après la Figure 31, on remarque que tous les extraits sont dotés d'une capacité antioxydante. Toutefois, cette capacité diffère selon le solvant d'extraction utilisé et la plante testée. En effet, l'extrait aqueux de *T. polium* ssp. *polium* exprime significativement la capacité antioxydante la plus élevée avec une valeur de l'ordre de  $153,16 \pm 8,10$  mg Eq Vit C /g Ms, suivi par les extraits aqueux de *C. cassia* ( $132,11 \pm 4,11$  mg Eq Vit C/g Ms). De même, la fraction éthanolique et d'acétate d'éthyle de *T. polium* ssp. *aureum* révèlent une capacité antioxydante significativement importante par rapport à celle de *T. polium* ssp. *polium*. Néanmoins, les extraits d'acétate d'éthyle des trois plantes montrent la capacité antioxydante la plus faible par rapport aux autres extraits.

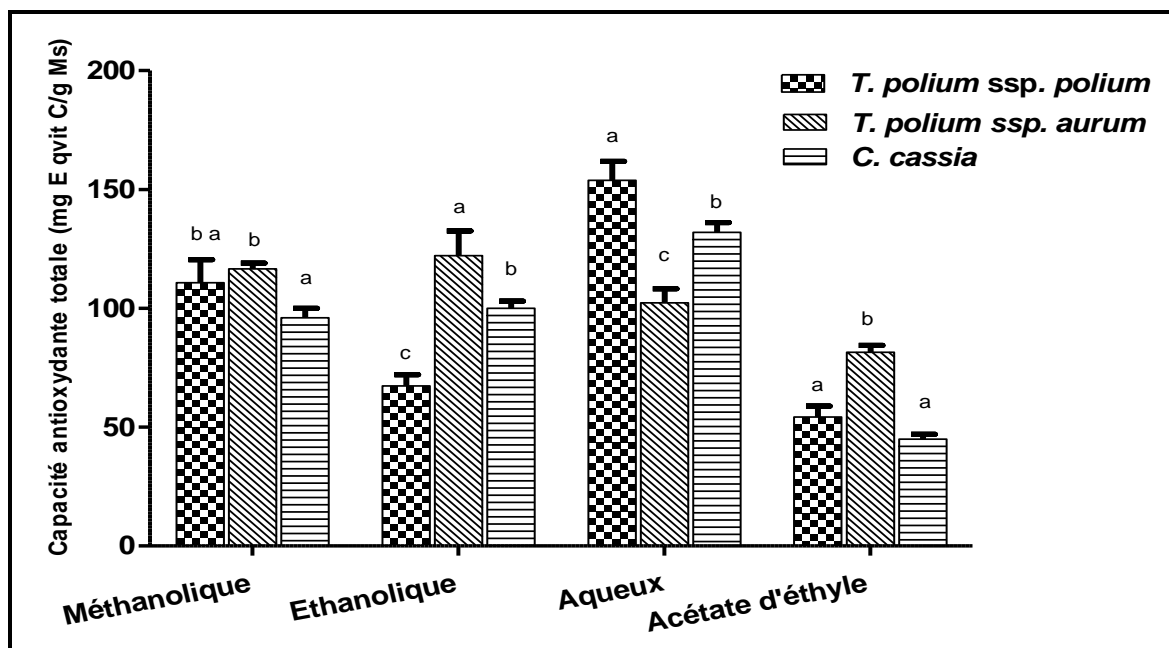


Figure 31 : Capacité antioxydante totale des extraits de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et *C. cassia* obtenus par macération (mg Eq Vit C/g Ms).

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

### 1.3 Corrélation entre l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques

La corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques des extraits obtenus par macération des trois plantes étudiées a été déterminée en calculant le coefficient de corrélations Pearson ( $r$ ). Comme il est illustré dans le Tableau 20, la teneur en polyphénol est significativement corrélée avec les  $IC_{50}$  de l'ABTS et de DPPH et avec les  $EC_{50}$  du FRAP, avec des coefficients de corrélations de -0,728, -0,678 et -0,718, respectivement. En outre, la teneur en flavones et flavonols est significativement corrélée avec l'activité antioxydante, et ce, pour tous les tests utilisés. Cependant, la teneur en flavonoïdes totaux montre une corrélation faible et non significative avec tous les tests de l'activité antioxydante.

Tableau 20 : Coefficients de corrélation de Pearson ( $r$ ) entre les différents tests de l'activité antioxydante et les composés phénoliques

	ABTS	DPPH	FRAP	CAT
Polyphénols totaux	-0,728**	-0,678*	-0,718**	0,214
Flavonoïdes totaux	-0,258	-0,219	-0,218	0,154
Flavones et Flavonols	-0,880***	-0,858***	-0,892***	0,615*

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

## 2 Discussion

### 2.1 Teneur en composés phénoliques

Le dosage de la teneur en polyphénols totaux des deux sous-espèces de *T. polium* révèle que, quelle que soit la technique utilisée pour l'extraction, macération ou Soxhlet, les extraits méthanoliques et éthanoliques sont ceux qui présentent des quantités élevées en polyphénols. Ces résultats concordent avec ceux d'autres chercheurs, notamment Stankovic et al. (2012), qui ont constaté que l'extrait méthanolique des feuilles de *T. polium* ssp *polium* de Serbie présente la teneur la plus élevée en polyphénols totaux avec une valeur de l'ordre de 157,84 mgEq AG/g Ms. Ainsi Hammoudi et al. (2012), ont indiqué que les extraits alcooliques de *T. polium* ssp *Capitatum* algérienne renferment une grande teneur en polyphénols totaux, soit en moyenne de  $206,54 \pm 58,17$  mg Eq.AG/g Ms. Toutefois, la teneur la plus élevée en polyphénols totaux de *Teucrium polium* ssp *geyrrii* a été enregistrée par l'extrait d'acétate d'éthyle obtenu par macération (Hammoudi et al., 2012).

Par ailleurs, les études qu'on a menées sur *C. cassia* ont également montré que les extraits méthanoliques et éthanoliques sont ceux qui détiennent la teneur la plus importante en polyphénols totaux, ce qui est en corrélation avec les travaux de Klejdus et al. (2016) qui ont révélé également que l'extrait éthanolique de *C. cassia* est le plus riche en polyphénols. De plus, les recherches sur *C. cassia* ont dévoilé que l'acide phénolique est le composé majoritaire de l'extrait hydro-alcoolique (Klejdus et al., 2016), alors que l'acide cinnamique est le composé majoritaire de l'extrait éthanolique (Dvorackova et al., 2015).

En comparant les extraits des trois plantes, on peut déduire que, ceux de *C. cassia* obtenus par la technique de Soxhlet détiennent les teneurs les plus importantes en polyphénols totaux que les extraits des deux sous-espèces de *T. polium* obtenus par la même technique. Néanmoins, les extraits de *T. polium* ssp *polium* obtenus par macération présentent les quantités les plus importantes en polyphénols par rapport aux extraits des autres plantes obtenus par la même technique d'extraction.

Concernant les teneurs en flavonoïdes totaux, flavones et flavonols, quel que soit le solvant et la technique d'extraction utilisés, les extraits de la *C. cassia* sont dotés des teneurs plus élevées que ceux des deux *T. polium*. En effet, les flavonoïques sont les principaux composés responsables des effets thérapeutiques de la cannelle (Li et al., 2019; Lopes et al., 2018). En plus, les teneurs flavonoïques des extraits des deux espèces de *T. polium* sont comparables quelle que soit la technique d'extraction utilisée. En effet, la richesse des extraits de *T. polium* en composés flavonoïques a été confirmé par plusieurs travaux de recherche (Rahim et al.,

2013; Pesaraklu *et al.*, 2011; Ljubuncic *et al.*, 2006). Selon une étude sur les extraits de différents organes de *T. polium* ssp. *polium*, les feuilles semblent les plus riches en flavonoïdes totaux avec des valeurs entre 6,48 et 139,87 mg RE/g (Stankovic *et al.*, 2012).

De ce qui précède, on peut conclure que parmi les quatre solvants d'extraction utilisés, ce sont les solvants polaires qui donnent des taux les plus élevés en composés phénoliques, quelle que soit la plante étudiée et la technique d'extraction utilisée. Ces résultats ont été confirmés par l'étude menée par Sim *et al.* (2019) en prouvant que les solvants polaires permettent une meilleure extraction des composés phénoliques. Par ailleurs, la solubilité des polyphénols dépend principalement de la longueur de la chaîne carbonique du squelette de base du nombre de groupements hydroxyles, de la masse moléculaire, du solvant, de la technique d'extraction (Dvorackova *et al.*, 2015), du degré de polymérisation des polyphénols et de leur interaction (Chahmi *et al.*, 2015; Pesaraklu *et al.*, 2011). En outre, la teneur des plantes en polyphénols dépend des facteurs génétiques conduisant à des différences entre les espèces de familles différentes et même des espèces du même genre, ainsi que des conditions édaphiques et environnementales telles que le climat, le stress hydrique, la salinité et l'intensité lumineuse (Hamid *et al.*, 2010).

Il ressort de cette étude que les composés phénoliques constituent une classe de molécules qui est omniprésente dans les plantes. Les propriétés thérapeutiques de ces composés sont principalement basées sur leur potentiel antioxydant : ils peuvent piéger les radicaux libres, inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux libres et sont également des chélateurs de certains ions métalliques (Sim *et al.*, 2019). En plus, l'utilisation des flavonoïdes connaît un intérêt explosif, ils sont employés comme suppléments alimentaires potentiels, ce qui a contribué à la découverte de leur l'activité antioxydante. Les travaux récents visent à isoler de nouvelles substances à partir des plantes et à trouver d'autres voies d'applications dans différents domaines. Cependant, la pharmacie moderne utilise encore une grande proportion de médicaments d'origine végétale. En effet, des études ont prouvé que les plantes contiennent de nouvelles molécules actives ou matières premières pour l'hémi synthèse chimique (Seyoum *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2019).

## **2.2 Activité antioxydante**

Jusqu'au présent, il n'y a pas une méthode universelle pour évaluer qualitativement et quantitativement l'activité antioxydante d'une substance (Prior *et al.*, 2005). C'est la raison pour laquelle notre choix s'est porté sur l'utilisation de quatre méthodes différentes : piégeage

du radical libre ABTS, inhibition du radical DPPH, pouvoir réducteur du fer (FRAP) et phosphomolybdène.

Les résultats de la présente étude indiquent que tous les extraits des plantes étudiées présentent un pouvoir antioxydant. Toutefois, ce pouvoir diffère selon le solvant, la technique d'extraction, la plante étudiée et la méthode de l'évaluation. Généralement, ce sont les extraits de *C. cassia* qui ont montré la meilleure activité antioxydante par rapport à ceux de *T. polium*. En plus, les extraits obtenus par macération indiquent des activités inférieures à ceux obtenus par le Soxhlet. L'acétate d'éthyle montre un potentiel antioxydant modéré pour les trois plantes étudiées. A notre connaissance, jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antioxydante des extraits *T. polium ssp aureum*.

La méthode ABTS de piégeage des radicaux libres est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer l'activité antioxydante des échantillons de plantes. Le cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup> est généré par l'oxydation de l'ABTS avec du persulfate de potassium et sa réduction en présence d'antioxydants donneurs d'hydrogène est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm. Le trolox, un analogue hydrosoluble de la vitamine E, est utilisé comme témoin positif. L'effet de la concentration d'antioxydants et la durée de l'inhibition de l'absorption du cation radical sont pris en compte lors de la détermination de l'activité antioxydante d'un extrait. En effet, les extraits des deux *T. polium* et de *C. cassia* sont dotés d'une activité antioxydante importante et ont pu inhiber le radical ABTS<sup>•+</sup> même à des faibles concentrations. Plusieurs travaux de recherche ont confirmé que les extraits de plante exhibent un potentiel inhibiteur du radical libre ABTS<sup>•+</sup> (Przygodzka *et al.*, 2014; Sagbo *et al.*, 2017; Balkan *et al.*, 2017).

D'une autre part, le piégeage du radical DPPH est une technique qui permet de mesurer la capacité d'un agent antioxydant de donner un atome d'hydrogène pour neutraliser le radical libre DPPH<sup>•</sup>. Cette technique est simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du DPPH<sup>•</sup>. Des études antérieures ont démontré que les extraits de *T. polium* possèdent une forte activité anti-radicalaire contre le radical libre DPPH<sup>•</sup> ; entre autres, on cite Khaled-Khodja *et al.* (2014), qui ont révélé que l'extrait méthanolique de *T. polium* présente une activité significative de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> avec une IC<sub>50</sub> de 0,195 mg/mL qui est inférieure à celle obtenue dans la présente étude. De même De Marino *et al.* (2012), ont montré que la fraction méthanolique de *T. polium* possède un potentiel antioxydant important dans le balayage du radical libre DPPH<sup>•</sup> avec une IC<sub>50</sub> de 0,121 mg/mL. Une autre étude a mentionné que l'IC<sub>50</sub> des extraits de *Teucrium polium* varie entre 14,50 à 238,25 µg/mL et que les extraits des solvants polaires révèlent l'activité la plus élevée (Stankovic *et al.*, 2012). Ces différences observées peuvent être attribuées aux différents types d'extraction utilisés.

En plus, nous avons trouvé que les IC<sub>50</sub> de l'activité anti-radicalaire (ABTS et DPPH) des extraits testés sont corrélées significativement avec la teneur en polyphénols totaux d'une part et avec le taux de flavones et flavonols d'une autre part. Par conséquent, l'activité anti-radicalaire des plantes étudiées pourrait être attribuée à leur richesse en composés phénoliques présents principalement dans les extraits polaires. Ces polyphénols sont capables d'inhiber l'oxydation des LDL et préserver l'aspect morphologique des cellules endothéliales. En plus, ils baissent la fuite extracellulaire du lactate déshydrogénase, réduisent l'accumulation d'hydroperoxydes et maintiennent l'activité réductrice des mitochondries (Bertin *et al.*, 2016).

L'évaluation de la capacité antioxydante totale des extraits de trois plantes étudiées a été effectuée également par la méthode du phosphomolybdène, qui est basée sur la réduction du Mo (VI) en Mo (V) par les composés antioxydants et la formation ultérieure d'un complexe de phosphate vert Mo (V) à pH acide (Prieto *et al.*, 1999). Les résultats révèlent que les extraits aqueux de *T. polium ssp. polium* montrent la capacité antioxydante la plus élevée. Cela est confirmé par l'étude réalisée par (Ljubuncic *et al.*, 2006), indiquant que l'extrait aqueux de *T. polium* possède une activité antioxydante remarquable.

Par ailleurs, le pouvoir de réducteur du fer des extraits étudiés a été évalué par le test de FRAP. L'activité réductrice est généralement associée à la présence des antioxydants qui exercent leur effet en bloquant les chaînes de radicaux libres via le don d'atomes d'hydrogène (Al-Abd *et al.*, 2017). Ainsi, le test du pouvoir réducteur du fer est souvent utilisé pour évaluer la capacité des extraits de plantes à transformer les ions ferriques (Fe<sup>3+</sup>) en ions ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Dans cette étude, les extraits méthanoliques de *C. cassia* et *T. polium ssp aureum* obtenus par Soxhlet indiquent le plus fort pouvoir réducteur ferrique que tous les autres extraits avec des IC<sub>50</sub> de 0,13 ± 0,01 et 0,15 ± 0,003 mg/mL, respectivement. Cela concorde avec les résultats rapportés par Khaled-Khodja *et al.* (2014), selon lesquels, le pouvoir réducteur du fer de l'extrait méthanolique de *T. polium* augmente en fonction des concentrations avec une valeur de 414,65 ± 11,63 mg Eq vit/g Ms. Dans ce sens, plusieurs travaux antérieurs ont démontré que les écorces de la *C. cassia* possèdent un pouvoir réducteur du fer remarquable (Przygodzka *et al.*, 2014; Momtaz *et al.*, 2018; Ervina *et al.*, 2019).

De plus, durant nos investigations, on a pu constater une forte corrélation entre le pouvoir réducteur du fer et les teneurs en composés phénoliques, principalement les flavones et flavonols. Ce qui indique l'implication de ces composés dans la chélation des ions du fer. Cela est bien confirmé récemment par Naji *et al.* (2020), qui ont démontré que les flavonoïdes jouent un rôle majeur dans la chélation des métaux de transition impliqués dans la réaction de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer avec le peroxyde

d'hydrogène). En effet, le processus d'autoxydation dépend de divers paramètres tels que la concentration des polyphénols et des ions métalliques, la température et le pH. D'après Ding *et al.* (2020), l'organisme d'un être humain adulte contient environ 4 g de fer dont 30 % sous forme d'hémoglobine (transport d'oxygène dans le sang), 10 % sous forme de myoglobine (transport d'oxygène dans les muscles) et une faible quantité dans certaines enzymes contenant du fer telles que les monooxygénases à cytochromes P450. En effet, l'acide chlorhydrique sécrété par l'estomac assure la solubilisation du fer présent dans l'alimentation sous la forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ), puis, les polyphénols contenant dans cette alimentation réduisent une quantité du  $\text{Fe}^{+3}$  en  $\text{Fe}^{+2}$  et facilitent son absorption. Par conséquent, plusieurs maladies sont associées aux anomalies du métabolisme de fer. En fait, en dessous de la concentration optimale, apparait le risque d'anémie et au-dessus il y a le risque de stress oxydatif.

À la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et *C. cassia* possèdent un pouvoir antioxydant remarquable du à leur richesse en polyphénols. Par conséquent, les extraits de ces plantes peuvent être une source importante de composés naturels qui remplacent les antioxydants synthétiques, à condition que le solvant et la technique d'extraction soient convenables.

## Axe IV : Exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* et *T. polium* ssp. *aureum*

### 1 Résultats

#### 1.1 Traitement aigu : effet sur le débit urinaire

Le Tableau 21 illustre l'effet de l'administration aiguë (24 h) par voie orale d'une dose unique (150 mg/kg du poids corporel) des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* et *T. polium* ssp. *aureum* sur la diurèse chez des rats normaux. Il ressort des résultats obtenus que les deux extraits entraînent une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) du volume urinaire après deux heures du traitement par rapport au groupe de contrôle. Cette augmentation s'accroît et poursuit jusqu'à la fin des vingt-quatre heures. À la fin de l'expérience, le volume urinaire est significativement plus élevé dans le groupe traité par l'extrait de *T. polium* ssp. *polium* que celui traité par de *T. polium* ssp. *aureum* ( $P < 0,05$ ), avec une diurèse qui atteint respectivement  $12,22 \pm 1,1$  et  $10,02 \pm 0,22$  mL, contre  $1,09 \pm 0,18$  et  $0,73 \pm 0,11$  mL/h au début du traitement. Toutefois, la diurèse du groupe traité par le furosémide dépasse significativement ceux des groupes traités par les extraits des deux plantes, pendant toute la période du traitement.

**Tableau 21 : Effet aigu, des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* et *T. polium* ssp. *aureum* et furosémide administrés par voie orale sur le volume urinaire (mL/h) chez les rats pendant 24 h**

Groupes	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Contrôle	$0,53 \pm 0,01$	$1,22 \pm 0,15$	$1,82 \pm 0,08$	$2,01 \pm 0,13$	$6,33 \pm 1,02$
Furosémide	$6,45 \pm 0,42^{*##}$	$9,76 \pm 0,33^{*##}$	$13,82 \pm 0,36^{*#}$	$15,46 \pm 0,2^{*##}$	$20,55 \pm 0,9^{*##}$
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	$1,09 \pm 0,18^*$	$4,88 \pm 0,17^*$	$7,57 \pm 0,13^*$	$10,74 \pm 0,5^*$	$12,22 \pm 1,1^{*#}$
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	$0,73 \pm 0,11^*$	$4,22 \pm 0,56^*$	$6,15 \pm 0,2^*$	$9,88 \pm 0,33^*$	$10,02 \pm 0,22^{*+}$

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ; \*  $P < 0,05$  en comparaison au groupe contrôle ; +  $P < 0,05$  par rapport *T. polium* ssp. *polium*; # $P < 0,05$  en comparaison. *T. polium* ssp. *aureum*.

## 1.2 Traitement subchronique

### 1.2.1 Effet sur le volume urinaire

Les résultats illustrés dans la Figure 32, indique que l'administration orale des extraits aqueux des deux sous-espèces de *T. polium* entraîne une augmentation significative après quatre jours du traitement et qui se poursuit jusqu'à la fin du traitement. Par ailleurs, le pouvoir diurétique de *T. polium* ssp. *polium* est plus puissant que celui de *T. polium* ssp. *aureum* ( $P < 0,05$ ). En effet, après seize jours de traitement, la diurèse augmente de  $6,02 \pm 0,1$  ml/24h à  $14,1 \pm 0,4$  ml/24h chez le groupe traité par l'extrait *T. polium* ssp. *polium*. Alors qu'elle passe de  $5,50 \pm 0,07$  ml/24h à  $11,03 \pm 0,19$  ml/24h chez le groupe traité par l'extrait *T. polium* ssp. *aureum*. Toutefois, l'effet diurétique de furosémide est significativement ( $P < 0,05$ ) supérieur à celui des extraits de *T. polium* durant toute la durée du traitement.

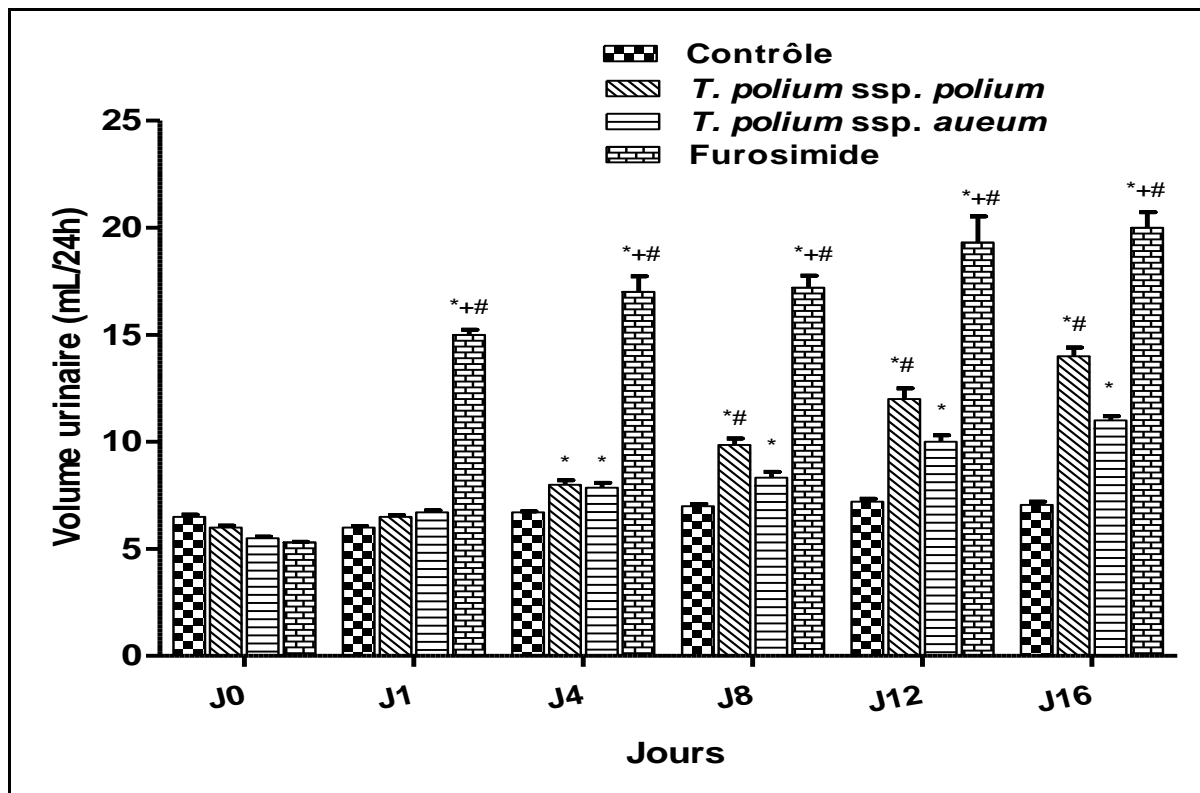


Figure 32: Effet subchronique d'administration orale des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et du furosémide sur le volume urinaire (mL/24 h).

\*  $P < 0,05$  vs contrôle. +  $P < 0,05$  vs *T. polium* ssp. *polium*. # $P < 0,05$  vs *T. polium* ssp. *aureum*.

**1.2.2 Effet des extraits aqueux de *T. polium* sur l'excrétion des électrolytes**

L'administration quotidienne, pendant seize jours des extraits de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et du furosémide entraîne une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) de l'excrétion des ions sodium, potassium et chlorure par rapport au contrôle (Tableau 22). En effet, l'excrétion de ces ions induite par *T. polium* ssp. *polium* est significativement ( $P < 0,05$ ) supérieure à celle provoquée par *T. polium* ssp. *aureum*. Cependant, elle reste inférieure à celle produite par le furosémide. En plus, le rapport élevé entre la concentration des ions de sodium et celle de potassium chez le groupe traité par l'extrait de *T. polium* ssp. *aureum* montre que cette plante augmente davantage l'excrétion des ions sodium que du potassium.

**Tableau 22 : Effet des extraits aqueux de *T. polium* sur l'excrétion d'électrolytes urinaires (sodium, potassium et chlorure) à la fin d'un traitement de 16 jours**

Groupe	Électrolytes urinaires			Indice salidiurétique			Rapport
	Sodium	Potassium	Chlorure	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
Contrôle	90,02 ± 1,9	78,2 ± 1,03	130,21 ± 1,7	1	1	1	1,5
Furosémide	172,12 ± 2,03	130, 21 ± 1,62	161,23 ± 1,87	1,91	1,66	1,23	1,32
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	150,16 ± 2,5	111,0 ± 1,92	140,26 ± 1,73	1,66	1,41	1,07	1,35
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	131,0 ± 2,5	92,11 ± 1,58	136,13 ± 2,5	1,45	1,17	1,04	1,42

\*  $P < 0,05$  vs contrôle. +  $P < 0,05$  vs *T. polium* ssp. *polium*. # $P < 0,05$  vs *T. polium* ssp. *aureum*.

**1.2.3 Effet sur les taux plasmatiques des électrolytes**

L'administration orale des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* et *T. polium* ssp. *aureum* pendant seize jours a diminué le taux plasmatique de potassium et de chlorure, sans entraîner des modifications significatives sur la concentration du sodium par rapport au groupe contrôle. Toutefois, le furosémide a diminué significativement le potassium sérique par rapport au groupe contrôle et au groupe traité par l'extrait des feuilles des plantes testées (Tableau 23).

**Tableau 23 : Effet de l'administration orale d'extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et du furosémide sur les électrolytes plasmatiques des rats**

Groupes	Sodium	Potassium	Chlorure
Contrôle	163,03 ± 1,2	4,5 ± 0,04	100,61 ± 1,5
Furosémide	160,02 ± 1,04	3,8 ± 0,02	85,93 ± 1,2
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	161,04 ± 1,21	4,1 ± 0,10	92,46 ± 2,1
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	161, 85 ± 1,11	4,20 ± 0,08	94,50 ± 3,4

\* P <0,05 vs contrôle. + P <0,05 vs extrait *T. polium* ssp. *polium*. #P <0,05 vs extrait *T. polium* ssp. *aureum*.

### 2.3 Effet sur les taux plasmatiques de l'urée, la créatinine et l'acide urique

Le traitement par les extraits aqueux des deux sous-espèces de *T. polium* et du furosémide pendant seize jours n'a pas entraîné des modifications significatives sur les taux sériques de l'urée, la créatinine, l'acide urique et sur le rapport urée/créatinine comparés à ceux du contrôle (Tableau 24).

**Tableau 24 : Effet d'administration orale d'extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium*, *T. polium* ssp. *aureum* et de furosémide sur la fonction rénale.**

Groupe	Urée (mg/dL)	Créatinine (mg/dL)	Rapport Urée/Créatinine	Acide urique (mg/dL)
Contrôle	0,34 ± 0,03	0,76 ± 0,04	0,44 ± 0,01	11,5 ± 0,05
Furosémide	0,35 ± 0,02	0,72 ± 0,01	0,47 ± 0,04	11,7 ± 0,04
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>	0,35 ± 0,05	0,74 ± 0,02	0,45 ± 0,03	12, 01 ± 0,5
<i>T. polium</i> ssp. <i>aureum</i>	0,36 ± 0,03	0,77 ± 0,07	0,44 ± 0,02	11, 7 ± 0,04

Les données sont exprimées en tant que moyenne ± SEM. \* P <0,05 vs contrôle. + P <0,05 vs extrait *T. polium* ssp. *polium*. #P <0,05 vs extrait *T. polium* ssp. *aureum*.

#### 1.2.4 Effet sur la filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire mesurée par la clairance de la créatinine est généralement stable pendant les seize jours de l'expérience chez le groupe contrôle (Figure 33). Néanmoins, l'administration orale de l'extrait aqueux de *T. polium* ssp. *polium* a entraîné une augmentation significative de la filtration glomérulaire, passant de 1,21 ± 0,1 mL/min à 2,75 ± 0,06 mL/min. Cette augmentation est très exprimée aussi chez le groupe traité par *T. polium* ssp. *aureum* avec un taux de filtration glomérulaire qui passe de 1,045 ± 0,06 mL/min à 2,03 ± 0,24 mL/min. La valeur maximale de la clairance a été enregistrée chez le groupe qui a reçu le furosémide (4,62 ± 0,04 mL/min) au seizième jour du traitement (Figure 33).

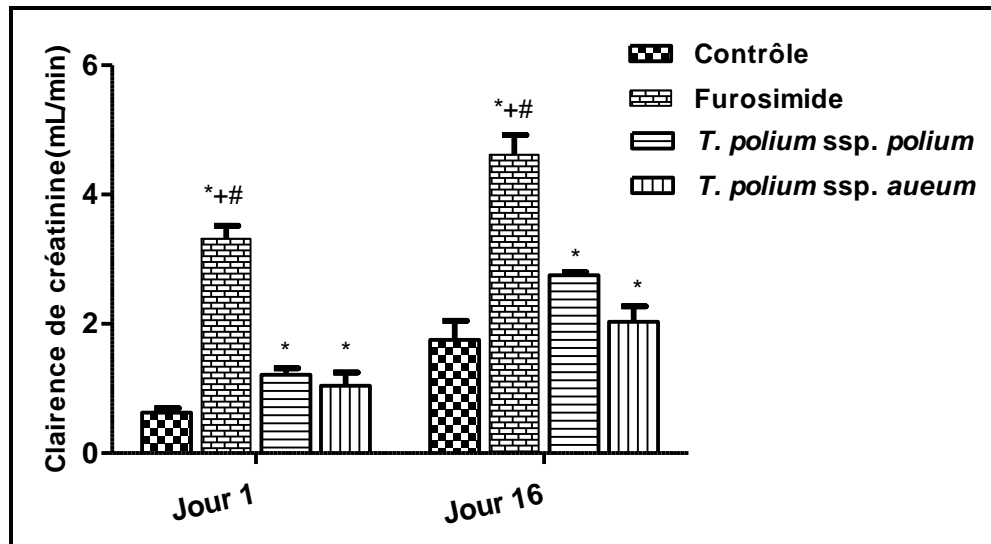


Figure 33 : Effet d'administration orale, d'extraits aqueux de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et du furosémide sur la clairance de la créatinine (mL/min).

\* P <0,05 vs contrôle. + P <0,05 vs extrait *T. polium ssp. polium*. #P <0,05 vs extrait *T. polium ssp. aureum*.

### 1.2.5 Effet sur l'osmolarité et la clairance de l'eau libre

Le traitement par les deux extraits de *T. polium* n'a entraîné aucun effet significatif sur l'osmolarité plasmatique après seize jours de traitement. Cependant, ces extraits et le furosémide ont augmenté significativement l'osmolarité urinaire et la clairance osmolaire par rapport au groupe contrôle (P <0,05). Ainsi, ils ont entraîné une réduction significative de la clairance de l'eau libre. Généralement, l'effet de l'extrait de *T. polium ssp. polium* était supérieur à celui de l'extrait de *T. polium ssp. aureum*, mais, il reste inférieur à celui du furosémide (Tableau 25).

Tableau 25 : Effet d'administration orale d'extraits aqueux de *T. polium ssp. polium*, *T. polium ssp. aureum* et du furosémide sur l'osmolarité plasmatique, l'osmolarité urinaire, la clairance urinaire et la clairance de l'eau libre

Groupes	Osmolarité plasmatique (mOsm/L)	Osmolarité urinaire (mOsm/L)	Clairance osmolaire (μL/min)	Clairance d'eau libre (μL/min)	TC <sub>H2O</sub> (μL/min)
Contrôle	335,40 ± 5,4	336,37 ± 4,7	5,22 ± 1,04	-5,20 ± 0,9	5,2 ± 0,9
Furosémide	290,85 ± 1,3*#	600,63 ± 3,6*#	29,03 ± 1,5*#	-28,7 ± 2,0 *#	28,7 ± 2,0*#
<i>T. polium ssp. polium</i>	330,62 ± 3,4	520,76 ± 3,8*#	15,31 ± 1,3*#	-15,40 ± 0,5*#	15,4 ± 0,5*#
<i>T. polium ssp. aureum</i>	327,98 ± 4,9	444,51 ± 1,9*+	10,34 ± 1,1*+	-10,34 ± 0,4*+	10,34 ± 0,4*+

\* P <0,05 vs contrôle. + P <0,05 vs extrait *T. polium ssp. polium*. #P <0,05 vs extrait *T. polium ssp. aureum*.

## **2 Discussion**

La diurèse se traduit par une augmentation du volume urinaire et de l'excrétion des électrolytes dans l'urine. La présente étude a montré que les extraits aqueux des deux sous-espèces *T. polium* ssp. *polium* et *T. polium* ssp. *aureum* exercent un effet diurétique significatif en augmentant l'excrétion de l'eau, du sodium, du potassium et du chlorure. En effet, l'extrait de *T. polium* ssp. *polium* est plus puissant que l'extrait de *T. polium* ssp. *aureum* ( $P < 0,05$ ). Cependant, ces extraits n'ont pas entraîné des modifications dans la concentration des électrolytes plasmatiques. Ce qui indique que *T. polium* pourrait agir comme un diurétique de l'anse, augmentant ainsi, la natriurèse et la kaliurèse sans provoquer d'hypokaliémie. En plus, l'augmentation du rapport entre la concentration des ions de sodium et de potassium excrétés dans le groupe traité par l'extrait *T. polium* ssp. *aureum* indique que cette plante augmente davantage l'excrétion du sodium que le potassium, qui est une caractéristique d'un bon diurétique (Adin *et al.*, 2018). Par ailleurs, il est rapporté que le furosémide, le médicament de référence, provoque une action rapide, environ 30 min après administration orale, en augmentant la production d'urine et l'excrétion urinaire de sodium et en inhibant le symport  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  dans la branche large ascendante de l'anse de Henl (Adin *et al.*, 2018).

Les deux extraits testés ont augmenté la clairance de la créatinine mais n'ont pas modifié de façon significative le taux de l'urée. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec l'extrait de *Retama raetam* (Maghrani *et al.*, 2005), *Bridelia ferruginea*, (Néné-Bi *et al.*, 2013), *Scutia buxifolia* (Da Silva *et al.*, 2015) chez les rats traités. En plus, le rapport sérique urée/créatinine, marqueur de la dégradation des protéines (Da Silva *et al.*, 2015), est inférieur à 50 chez les rats traités avec les deux extraits de *T. polium*. Par conséquent, ces extraits n'augmentent pas le taux d'urée dans l'organisme des rats traités, cela suggère que cette plante n'altère pas la fonction rénale et n'entraîne pas la diminution du poids chez les rats traités, seize heures après son administration.

Les deux extraits des deux sous-espèces de *T. polium* ont augmenté la clairance osmolaire et ont diminué l'excrétion d'eau libre ; cela pourrait être expliqué par la réduction de la synthèse de l'hormone antidiurétique (ADH), l'angiotensine, et de l'aldostérone (Fatouh *et al.*, 2013; He *et al.*, 2019). Il est également possible que ces extraits exercent leur effet diurétique en augmentant la production de prostaglandines. Il est rapporté que les diurétiques de l'anse et en particulier le furosémide, augmentent la synthèse rénale et l'excrétion urinaire des prostaglandines. En effet, les prostaglandines de type E inhibent l'action de l'ADH au niveau

des canaux du tube collecteur, ce qui augmente le flux urinaire et l'excrétion d'électrolytes (Adin *et al.*, 2018). Cependant, le mécanisme d'action responsable des effets diurétiques des extraits de plantes n'est pas encore connu. Par conséquent, comme le furosémide, les extraits testés augmentent l'excrétion du sodium, du potassium et du chlorure dans les urines, leurs mécanismes d'actions pourraient être similaires.

Par ailleurs, plusieurs travaux de recherches ont prouvé l'effet diurétique des polyphénols (Yuliana *et al.*, 2009 ; Zeng *et al.*, 2019). Certains composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, peuvent augmenter de la natriurèse et de la kaliurèse (Zeng *et al.*, 2019). Il a été rapporté que les flavonoïdes augmentent la diurèse et l'excrétion de sodium en se liant au récepteur de l'adénosine A1 (Yuliana *et al.*, 2009). Dans ce sens, des analyses phytochimiques antérieures ont révélé que les extraits de *T. polium* sont riches en flavonoïdes (Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, 2009; Stankovic *et al.*, 2012). Par conséquent, l'activité diurétique de la plante pourrait être attribuée à sa richesse en flavonoïdes. Néanmoins, d'autres chercheurs ont montré que l'activité diurétique des plantes peut être induite par d'autres métabolites secondaires notamment les saponines, qui possèdent la capacité à moduler la perméabilité membranaire et stimuler l'excrétion rénale du sodium (Salazar-Gómez *et al.*, 2018; Abdala *et al.*, 2012).

Sur la base des résultats ci-dessus, nous pouvons conclure que le traitement avec l'extrait aqueux des deux sous-espèces *T. polium* (150mg/kg de poids corporel) a induit une diurèse remarquable lorsque les rats ont été traités d'une manière aiguë et subchronique. Dans notre étude, aucune létalité n'a été observée, au moins pour la dose utilisée. Cependant, des études toxicologiques avancées restent à réaliser chez la souris et le rat. Aussi, il est nécessaire d'étudier les effets indésirables éventuels de cette plante, tels que l'altération de certains paramètres neuraux, métaboliques et hormonaux, qui sont indéterminés dans cette étude, avant de recommander son utilisation clinique. Les sites précis et les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'action de l'extrait de *T. polium* restent à élucider dans des études ultérieures.



**Conclusion générale**

## **Conclusion générale**

L'objectif scientifique de la présente étude consiste à la recherche des molécules naturelles bioactives qui pourraient servir à trouver des alternatives aux produits synthétiques qui ont prouvé leurs effets secondaires néfastes sur la santé humaine. En effet, ce travail repose sur l'étude phytochimique et biologique de trois plantes (*Teucrium polium* ssp. *polium*, *Teucrium polium* ssp. *aureum*, *Cinnamomum cassia*) choisies sur la base de leurs usages dans la pharmacopée traditionnelle marocaine. Dans un premier temps, nous avons étudié la composition chimique, l'activité antioxydante des huiles essentielles de ces plantes et leur potentiel synergique antibactérien avec certains antibiotiques ou molécules volatiles. Dans un second temps, nous avons procédé au dosage des composés phénoliques et à l'évaluation du pouvoir antioxydant, des extraits non volatils de ces plantes, ainsi, l'exploration de l'effet diurétique des extraits aqueux des deux sous-espèces de *T. polium*.

Les HEs des plantes étudiées ont été extraites par hydrodistillation. Leur profil phytochimique montre que les composés majoritaires de l'HE de *T. polium* ssp. *aureum* sont : le caryophyllène (19,13 %), le Muurolène (13,02 %) et le  $\tau$ -cadinol, (11,01 %), ainsi, ceux de *T. polium* ssp. *polium* sont : le 3-carène (16,49 %), le Muurolène (14,03 %) et le  $\alpha$ -pinène (9,94 %). Cependant, le trans-cinnamaldéhyde est le composé majoritaire de l'HE de *C. cassia*.

L'activité antibactérienne *in-vitro* des HEs des trois plantes a été évaluée contre sept souches bactériennes multirésistantes, en utilisant la méthode de diffusion sur disque et la méthode de microdilution en milieu liquide. Les résultats montrent que les HEs testées, notamment, celles de *C. cassia* possèdent une activité antimicrobienne contre toutes les souches testées.

Le potentiel synergique des huiles essentielles de *T. polium* ssp. *polium* et de *C. cassia* combinées avec certains antibiotiques ou molécules volatiles évalué par la méthode d'échiquier a montré que la combinaison de ces HEs avec la streptomycine, l'ampicilline, le chloramphénicol, le thymol ou le carvacrol présente un effet synergique important vis-à-vis les bactéries multirésistantes, principalement, celles responsables des infections nosocomiales. Par conséquent, l'antibiorésistance de bactéries associées aux maladies infectieuses et les effets indésirables des antibiotiques nous amènent à suggérer l'utilisation des huiles essentielles en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens comme des alternatives aux antibiotiques synthétiques.

L'activité antioxydante *in-vitro* des HEs et les extraits non volatils évaluée par quatre méthodes ; ABTS<sup>•+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, FRAP et phosphomolybdène révèlent que les différents extraits testés ont une activité antioxydante intéressante, dépendante de leur teneur en polyphénols et

flavonoïdes totaux. De même, les HEs notamment, celles de *T. polium* ssp. *polium* possèdent un potentiel antioxydant remarquable.

L'effet diurétique des extraits aqueux de *T. polium* ssp. *polium* et *T. polium* ssp. *aureum* a révélé que les deux extraits exercent un effet diurétique puissant après l'administration des doses uniques ou répétées (150 mg/kg de poids corporel) chez le rat Wistar. En effet, les deux extraits ont induit une augmentation significative du volume urinaire, de la clairance de la créatinine et de l'excrétion urinaire de sodium et de potassium sans pour autant modifier la concentration des électrolytes, l'urée et la créatinine plasmatiques par rapport au contrôle ( $P < 0,05$ ). L'effet diurétique de l'extrait de *T. polium* ssp. *polium* a été plus puissant que celui de *T. polium* ssp. *aureum*.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude pourrait constituer une justification scientifique de l'usage traditionnel de germandrée (*T. polium*) et de la cannelle (*C. cassia*) par la population marocaine pour traiter diverses maladies.

Des perspectives de recherche peuvent être dégagées de ces résultats tels que :

- l'analyse chromatographique par HPLC des extraits non volatils des deux sous-espèces de *T. polium* et de *C. cassia* afin d'identifier les molécules responsables des activités biologiques observées ;
- les résultats concernant la combinaison des huiles essentielles avec d'autres agents antibactériens demeurent prometteurs et pourraient servir de base pour des études ultérieures afin de proposer son utilisation en tant qu'agents antimicrobiens alternatifs par l'élaboration de nouvelles formulations pharmaceutiques à base de ce mélange pour traiter les infections et pour désinfecter l'atmosphère des établissements de santé.



**Références bibliographiques**

- Al-Shalabi E, Alkhalidi M, Sunoqrot S. Development and evaluation of polymeric nanocapsules for cirsiol isolated from Jordanian *Teucrium polium* L. as a potential anticancer nanomedicine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020; 56:101544.
- Aazza S, Lyoussi B, Miguel MG. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 2011; 16:7672-90.
- Abdala S, Martín-Herrera D, Benjumea D, Gutiérrez S. Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012; 140(2):277-81.
- Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 1940; 146:837-837.
- Adams RP. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2007b; 18(4):803-6.
- Adedapo AA, Jimoh FO, Afolayan AJ, Masika P. Antioxidant activities and phenolic contents of the methanol extracts of the stems of *Acokanthera oppositifolia* and *Adenia gummifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2008; 8.
- Adin D, Atkins C, Papich MG. Pharmacodynamic assessment of diuretic efficacy and braking in a furosemide continuous infusion model. *Journal of Veterinary Cardiology*, 2018; 20(2):92-101.
- Al-Abd NM, Nor ZM, Mansor M, Zajmi A, Hasan MS, Azhar F, *et al.* Phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ardisia elliptica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017; 7(6):569-76.
- Albert M, Rousselot D, Abedinzadeh Z, DJ-LA. Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'Actualité Chimique*, 2003:11-12.
- Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 2007; 128:1037-50.
- Al-Ghamdi AG and FA. Analysis of the essential oil of the germander (*Teucrium polium*) aerial parts from the northern region of Saudi Arabia. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* Available online at, 2014; 5(2):128-35.
- Alonso-Castro AJ, Alba-Betancourt C, Yáñez-Barrientos E, Luna-Rocha C, Páramo-Castillo AS, Aragón-Martínez OH, *et al.* Diuretic activity and neuropharmacological effects of an ethanol extract from *Senna septemtrionalis* (Viv.)H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2019; 239:111923.

- Al-Saikhan FI, Ansari MN. Evaluation of the diuretic and urinary electrolyte effects of methanolic extract of *Peganum harmala* L. in Wistar albino rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016; 23(6):749-53.
- Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, *et al.* Isolation and Characterization of Polyphenol Type-A Polymers from Cinnamon with Insulin-like Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52(1):65-70.
- Anderson RA, Zhan Z, Luo R, Guo X, Guo Q, Zhou J, *et al.* Cinnamon extract lowers glucose, insulin and cholesterol in people with elevated serum glucose. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2016; 6(4):332-6.
- Antwerpen P. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système Myeloperoxydase/ Peroxyde d'hydrogène : 2006.
- Aouam I, El Atki Y, Taroq A, Kamari F El, Abdellaoui A. Chemical composition, antimicrobial, and antioxidant activities of two Moroccan thymus essential oils. *Asian J Pharm Clin Res*, 2019; 12(1):447-51.
- Aoussar N, Manzali R, Nattah I, Rhallabi N, Vasiljevic P, Bouksaim M, *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of two lichens species (*Pseudevernia furfuracea* L and *Evernia prunastri* L) collected from Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 2017; 8(6):1968-76.
- Azita S, H. Mohammadreza R, Jamshid, Ali MF, Morteza A. The non-coding RNA rprA can increase the resistance to ampicillin in *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 2019; 29:266-70.
- Babba D. Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la lutte Contre la Désertification. 2015.
- Balkan İA, Taşkın T, Doğan HT, Deniz İ, Akaydın G, Yesilada E. A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potentials of subextracts from the aerial parts of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *oleoides*. *Industrial Crops and Products*, 2017; 95:695-703.
- Baradaran A, Madihi Y, Merrikhi A, Rafieian-Kopaei M, Nematbakhsh M, Asgari A, *et al.* Nephrotoxicity of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* in Wistar rats. *PAKISTAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*, 2013; 29(s):329-33.
- Barreira JCM, Ferreira ICFR. Artificial antioxidants. In : *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier ; 2019 , p 283-90.
- Bellakhdar J. Plantes médicinales au Maghreb et soins de base – Précis de phytothérapie moderne. Fennec. Casablanca; 2006 , 385 p.

- Belmekki N, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013; 7(14):897-902.
- Benslimane M. *Les plantes aromatiques et médicinales du Maroc*. 2010.
- Bertin R, Chen Z, Marin R, Donati M, Feltrinelli A, Montopoli M, *et al.* Activity of myricetin and other plant-derived polyhydroxyl compounds in human LDL and human vascular endothelial cells against oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2016; 82:472-8.
- Bhardwaj M, Singh B, Sinha D. Potential of Herbal Drug and Antibiotic Combination Therapy: A New Approach to Treat Multidrug Resistant Bacteria. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 2016; 7(11).
- Bicchi C, Liberto E, Matteodo M, Sgorbini B, Mondello L, Zellner B d. A, *et al.* Quantitative analysis of essential oils: A complex task. *Flavour and Fragrance Journal*, 2008; 23(6):382-91.
- Borg J. *Biochimie métabolique*. 2ème édit. Paris; 2008 , 217-225 p.
- Boudjelal A, Henchiri C, Sari M, Sarri D, Hendel N, Benkhaled A, *et al.* Herbalists and wild medicinal plants in M ' Sila ( North Algeria ): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 148(2):395-402.
- Bouhdid S, Abrini J, Baudoux D, Manresa A, Zhiri A. Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan : pouvoir antibactérien et mécanisme d'action - Recherche Google. *Pharm Clin* , 2012; 31(3):141-8.
- Boukhatem MN, Kameli A, Saidi F. Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. *Food Control*, 2013; 34(1):208-13.
- Bouyahya A, Bakri Y, Et-Touys A, Talbaoui A, Khouchlaa A, Charfi S, *et al.* Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 2017:1-11.
- Br J. Skin reactions to ampicillin. *British medical journal*, 1972; 1(5794):195-6.
- Briet M, Boutouyrie P. Diurétiques : aspects pharmacologiques et thérapeutiques. *EMC - Cardiologie*, 2009; 11:905-10.
- Bruneton J. *Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales*. 2009 , 1268 p.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Burt, S*, 2004;(94):223–253.

- Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, *et al.* Tackling antibiotic resistance. Nature Publishing Group, 2011; 9(12):894-6.
- Caddick LR, Rudall PJ, Wilkin P, Hedderson TAJ, Chase MW. Phylogenetics of Dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. Botanical Journal of the Linnean Society, 2002; 138(2):123-44.
- Carriere PP, Mir H, Kapur N, Clark CE, Singh S. Anti-proliferative effects of cinnamon extract in colon cancer. American Association for Cancer Research (AACR) ; 2017 : p 312-312.
- Cattoir V. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. Pathologie-biologie, 2004.
- Chahmi N, Anissi J, Jennan S, Farah A, Sendide K, Hassouni M El. Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2015; 5(3):228-33.
- Cheng S-S, Liu J-Y, Hsui Y-R, Chang S-T. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). Bioresource Technology, 2006; 97(2):306-12.
- Clemente I, Aznar M, Silva F, Nerín C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2016; 36:26-33.
- Cortella AR, Pochettino ML. Starch grain analysis as a Microscopic Diagnostic Feature in the Identification of Plant Material. Economic Botany, 1994; 48(2):171-81.
- Cox S, Mann C, Markham J. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Journal of applied microbiology, 2001; 91(3):492-7.
- Cozzani S, Muselli A, Desjobert J-M, Bernardini A-F, Tomi F, Casanova J. Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. Flavour and Fragrance Journal, 2005; 20(4):436-41.
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, *et al.* Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activities. J Agric Food Chem, 2007; 55(15):6300–6308.
- Da Silva RDCVDAF, De Souza P, Crestani S, Gasparotto Júnior A, Boligon AA, Athayde ML, *et al.* Hypotensive and diuretic effect of the butanolic soluble fraction of the hydroethanolic extract of bark of *Scutia buxifolia* Reissek in rats. Journal of Ethnopharmacology, 2015; 172:395-401.
- De Marino S, Festa C, Zollo F, Incollingo F, Raimo G, Evangelista G, *et al.* Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. Food Chemistry, 2012; 133(1):21-8.

- Debuigne G. Dictionnaire des plantes qui guérissent. Librairie. 1972.
- Defraigne J, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydants. *Revue médicale de Liège*, 2008; 63:10-9.
- Ding Y, Zhu X, Li X, Zhang H, Wu M, Liu J, *et al.* Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Safety Profiles of Ferric Carboxymaltose in Chinese Patients with Iron-Deficiency Anemia. *Clinical Therapeutics*, 2020:
- Djabou N, Allali H, Battesti M-J, Tabti B, Costa J, Muselli A, *et al.* Chemical and genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium scorodonia* L. *Phytochemistry*, 2012; 74:123-32.
- Djabou N, Lorenzi V, Guinoiseau E, Andreani S, Giuliani MC, Desjobert JM, *et al.* Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. *Food Control*, 2013; 30(1):354-63.
- Dvorackova E, Snoblova M, Chromcova L, Hrdlicka P. Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts. *Food Science and Biotechnology*, 2015; 24(4):1201-7.
- El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Gouch A, Lyoussi B, *et al.* Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. 2019.
- El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Lyoussi B, Oumokhtar B, *et al.* Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020; 13(2):3866-74.
- El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Nayme K, Timinouni M, *et al.* Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2019; 10(2):63.
- El Atki Y, Aouama I, Kamaria F El, Taroqa A, Lyoussia B, Abdellaouia A. Antioxidant Activity of Two Wild *Teucrium* Species From Morocco. *International Journal Pharmaceutical Sciences And Research*, 2019; 10(6):2723-9.
- El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, 2013; 61(5):209-16.
- Elmasri WA, Hegazy MEF, Mechref Y, Paré PW. Structure-antioxidant and anti-tumor activity of *Teucrium polium* phytochemicals. *Phytochemistry Letters*. 2016. p 81-7.

- Ervina M, Lie HS, Diva J, Caroline, Tewfik S, Tewfik I. Optimization of water extract of *Cinnamomum burmannii* bark to ascertain its in vitro antidiabetic and antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019; 19:101152.
- Fabiny DL, Ertingshausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical Chemistry*, 1971; 17(8):696-700.
- Fadli M, Pagès J, Mezrioui N, Abbad A. *Artemisia herba-alba* Asso and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils and their capability to restore antibiotics efficacy. *Industrial Crops & Products*, 2016; 89:399-404.
- Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pags JM, *et al.* Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - Bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine*, 2012; 19(5):464-71.
- Fakchich J, Elachouri M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014; 154(1):76-87.
- Fatouh AAA, Motawie AA, Abd Al-Aziz AM, Hamed HM, Awad MAM, El-Ghany AA, *et al.* Anti-diuretic hormone and genetic study in primary nocturnal enuresis. *Journal of Pediatric Urology*, 2013; 9(6 PART A):831-7.
- Fertout-Mouri N, Latrèche A, Mehdadi Z, Toumi-Bénali F, Khaled MB. Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytotherapie*, 2017; 15(6):346-53.
- Fiorentino A, D'Abrosca B, Pacifico S, Scognamiglio M, D'Angelo G, Gallicchio M, *et al.* Structure elucidation and hepatotoxicity evaluation against HepG2 human cells of neoclerodane diterpenes from *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 2011; 72(16):2037-44.
- Firmino DF, Cavalcante TTA, Gomes GA, Firmino NCS, Rosa LD, De Carvalho MG, *et al.* Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Cinnamomum* Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. *Scientific World Journal*, 2018; 2018:1-9.
- Fritze D, Pukall R. Chapter 4. Culture Media for *Bacillus* spp. and Related Genera Relevant to Foods. In : *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. Cambridge : Royal Society of Chemistry ; 2011 , p 90-114.
- Fuentes F, Palomo I, Fuentes E. Platelet oxidative stress as a novel target of cardiovascular risk in frail older people. *Vascular Pharmacology*, 2017; 93:14-9.
- Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Remodelage osseux et traitements diurétiques. *Revue du Rhumatisme Monographies*. 2011. p 124-8.

- Gary L, FURTADO A. Single-Disk Diffusion Testing (Kirby- Bauer) of Susceptibility of *Proteus mirabilis* to Chloramphenicol: Significance of the Intermediate Category. *Journal of Clinical Microbiology*, 1980; 14(2):550–553.
- Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol*, 2006; 111(2):361-79.
- Golmohammadi M, Borghei A, Zenouzi A, Heliyon NA-, 2018 undefined. Optimization of essential oil extraction from orange peels using steam explosion. *Heliyon*, 2018; 4(11):893.
- González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñó MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, 2010; 104(SUPPL.3):S15-27.
- Gunawardena D, Karunaweera N, Lee S, Van Der Kooy F, Harman DG, Raju R, *et al.* Anti-inflammatory activity of cinnamon (*C. zeylanicum* and *C. cassia*) extracts - Identification of E-cinnamaldehyde and o-methoxy cinnamaldehyde as the most potent bioactive compounds. *Food and Function*, 2015; 6(3):910-9.
- Gunawardena D, Shanmugam K, Low M, Bennett L, Govindaraghavan S, Head R, *et al.* Determination of anti-inflammatory activities of standardised preparations of plant- and mushroom-based foods. *European Journal of Nutrition*, 2014; 53(1):335-43.
- Guo N, Tong T, Ren N, Tu Y, Phytochemistry BL-, 2018 U. Saponins from seeds of Genus *Camellia*: Phytochemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 2018; 49:42-55.
- Haïdara M. Etude de la phytochimie et de l'activité antihypertensive de trois (3) plantes et d'une recette utilisées dans le traitement traditionnel de l'hypertension artérielle au Mali : 2008.
- Hamid AA, Usman LA, Adebayo SA, Zubair MF, Elaigwu SE. Chemical constituents of leaf essential oil of north-central nigerian grown *Vitex Agnus-castus*. *Advances in Environmental Biology*, 2010; 4(2):250-3.
- Hamilton-Miller J. Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004; 23(13):209-12.
- Hammoudi R, Hadj Mohammed M, Ramdane F, Khodir A. Activite Antibacterienne Des Extraits Phenoliques De La Plante *Teucrium Polium Geyrii*. *Algerian Journal of Arid Environment* , 2012; 2(1):49-55.
- Hanon O, Seux M, Rigaud A. Hypertension artérielle chez le sujet âgé. *EMC-Médecine*, 2004; 1:381–387.
- Hassan N, Din MU, Hassan FU, Abdullah I, Zhu Y, Jinlong W, *et al.* Identification and quantitative analyses of medicinal plants in Shahgram valley, district swat, Pakistan. *Acta Ecologica Sinica*, 2020; 40(1):44-51.

- Hassanabadi M, Ebrahimi M, Farajpour M, Dejahang A. Variation in essential oil components among Iranian *Ferula assa-foetida* L. accessions. *Industrial Crops and Products*, 2019; 140:111598.
- He J, Zeng L, Wei R, Zhong G, Zhu Y, Xu T, *et al.* *Lagopsis supina* exerts its diuretic effect via inhibition of aquaporin-1, 2 and 3 expression in a rat model of traumatic blood stasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019; 231:446-52.
- Hernandez Ochoa L. Substitution de solvants et matieres actives de synthese par un combine "solvant/actif" d'origine vegetale : 2005.
- Heywood V, Brummitt R, Culham A, Seberg O. Flowering plant families of the world. *Int J Pharmacol*, 2007; 11(7):874-87.
- Hmamouchi M. Les Plantes médicinales et aromatiques Marocaines : Utilisations, biologie, écologie, chimie, pharmacologie, toxicologie,. Imprimerie. Mohammedia; 2001 , 389 p.
- Hoberg E, Meier B, Sticher O. An analytical high performance liquid chromatography method for the determination of agnuside and p-hydroxybenzoic acid contents in *Agni-casti fructus*. *Phytochemical Analysis*, 2000; 11(5):327-9.
- Hong JW, Yang GE, Kim YB, Eom SH, Lew JH, Kang H. Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2012; 12.
- Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agric Food Chem*, 2005; 53:1841-56.
- Hul M Van, Geurts L, Plovier H, Druart C, Everard A, Ståhlman M. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2017; 314(14):334-52.
- Iserin P, Masson M. *Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins.* 2017 , 14 p.
- Jaffe M. Uber den Niederschlag, welchen pikrin saure in normalen harn erzeugt und Uber eine Reaktion eskreugtinines Hoppe seylers. In : *Physio Chem.* 1980 , p 391-400.
- Jalal Z, El Atki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015; 5(6):458-61.
- Jardim SI, Ramos dos Santos L, Araújo I, Marques F, Branco P, Gaspar A, *et al.* Overview of diuretic resistance in heart failure. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 2018; 37(11):935-45.

- Jardyardetzky O. Studies on the mechanism of action of chloramphenicol. I. The conformation of chloramphenicol in solution. *The Journal of biological chemistry*, 1963; 238:2498-508.
- Johanna R. Exploration des difficultés dans la prise de traitements au long cours chez le patient transplanté rénal : comment le rendre acteur de sa santé : 2013.
- Joy P, Thomas J, J MS-P, 1998 U. Cinnamon (*Cinnamomum verum* Presl) for flavour and fragrance. *Papai J*, 1998; 20(2):37-42.
- Kabouche A, Kabouche Z, Ghannadi A, Sajjadi SE. Analysis of the essential oil of *teucrium polium* ssp. *aurasiacum* from algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 2007; 19(1-4):44-6.
- Kallel I, Hadrich B, Gargouri B, Chaabane A, Lassoued S, Gdoura R, *et al.* Optimization of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) Essential Oil Extraction: Evaluation of Antioxidant and Antiproliferative Effects. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2019; 2019:7-18.
- Kasabri V, Afifi FU, Hamdan I. In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011; 133(2):888-96.
- Khaled-Khodja N, Boulekbache-Makhlouf L, Madani K. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 2014; 61:41-8.
- Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, Tarantilis PA, Pappas CS, Polissiou MG. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 2006; 13(1):54-60.
- Klejdus B, Kováčik J. Quantification of phenols in cinnamon: A special focus on « total phenols » and phenolic acids including DESI-Orbitrap MS detection. *Industrial Crops and Products*, 2016; 83:774-80.
- Kwiatkowski P, Mnichowska-Polanowska M, Pruss A, Masiuk H, Dziecioł M, Giedrys-Kalemba S, *et al.* The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers. *Burns*, 2017; 43(7):1544-51.
- L. Gonçalves L, Fernandes T, Bernardo MA, Brito J. Assessment of Human Health Risk of Toxic Elements Due to Cinnamon Ingestion in the Diet. *Biological Trace Element Research*, 2019; 189(2):313-24.
- Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005; 57(110):1471-85.
- Lee J-E, Jung M, Lee S-C, Huh M-J, Seo S-M, Park I-K. Antibacterial mode of action of trans-cinnamaldehyde derived from cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) essential oil against

- Agrobacterium tumefaciens*. Pesticide Biochemistry and Physiology, [En ligne] 2020: (Disponible sur : < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357520300353> > [Consulté le 03/03/2020]).
- Lemoine C. Les fleurs méditerranéennes. 2005.
- Leverve X. Oxidative, stress and antioxidants? Cahiers de Nutrition et de Dietetique, 2009; 44(5):219-24.
- Li AL, Li GH, Li YR, Wu XY, Ren DM, Lou HX, *et al.* Lignan and flavonoid support the prevention of cinnamon against oxidative stress related diseases. Phytomedicine, 2019; 53:143-53.
- Lin L-T, Wu S-J, Lin C-C. The Anticancer Properties and Apoptosis-inducing Mechanisms of Cinnamaldehyde and the Herbal Prescription Huang-Lian-Jie-Du-Tang ( Huáng Lián Jiě Dú Tang) in Human Hepatoma Cells. Journal of traditional and complementary medicine, 2013; 3(4):227-33.
- Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. Free Radical Biology and Medicine, 1995; 18(2):153-8.
- Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity in vitro. Evidence-based complementary and alternative medicine , 2006; 3(3):329-38.
- Lopes BP, Gaique TG, Souza LL, Paula GSM, Kluck GEG, Atella GC, *et al.* Beneficial effects of Cinnamon on hepatic lipid metabolism are impaired in hypothyroid rats. Journal of Functional Foods, 2018; 50:210-5.
- Lu F, Ding YC, Ye XQ, Ding YT. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. Agricultural Sciences in China, 2011; 10(9):1482-7.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L, Duval D, Wirth J. Atlas de poche de pharmacologie. 4e éditio. [Lavoisier] Médecine Sciences publications ; 2010 , 120 p.
- Luzzatto L, Apirion D, Schlessinger D. Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1968; 60(3):873-80.
- Da Costa L. A., Badawi A., & El-Soheby A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. Annals of Nutrition and Metabolism, 2012; 60(Suppl. 3): 27-36.
- Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, Saibene L, Macciocchi A. Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PCL) as membrane model. International Journal of Tissue Reactions, 1993; 15(6):225-34.

- Maghrani M, Zeggwagh NA, Haloui M, Eddouks M. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 99(1):31-5.
- Mahadlek J, Charoenteeraboon J, Phaechamud T. Combination effects of the antimicrobial agents and cinnamon oil. *Advanced Materials Research*, 2012; 506:246-9.
- Malouin F, Bryan L. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1986; 30:1.
- Mamadou B. *Actions pharmacologiques des Tanins* : 2002.
- Marieb N. *Biologie humaine Anatomie et physiologie*. Renouveau. Canada; 2000 , 450-493 p.
- Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Sanjust E, Meli M, *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub> Extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical Characterization and Antityrosinase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007; 55(24):10022-7.
- Marouf A, Reynaud J. *La botanique de A à Z*. Dunod. Paris; 2007 , 76 p.
- Martelli G, Giacomini D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018; 158(5):Pages 91-105.
- Martins N, Barros L, Ferreira ICFR. In vivo antioxidant activity of phenolic compounds: Facts and gaps. *Trends in Food Science and Technology*. 2016. p 1-12.
- Masson YT. *Analyse d'ouvrage*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2009; 67:374.
- Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. 2018. p 68-78.
- Momtaz S, Hassani S, Khan F, Ziaee M, Abdollahi M. Cinnamon, a promising prospect towards Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*. 2018. p 241-58.
- Mauro NM. *Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine* : 2006.
- Menichini F, Conforti F, Rigano D, Formisano C, Piozzi F, Senatore F. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 2012; 115(2):679-86.
- Miraliakbari H, Shahidi F. Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 2008; 111(2):421-7.
- Moody JA. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution. In: Isenberg, H.D. (Ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology Washington, 2003:1–28.
- Mota SI, Costa RO, Ferreira IL, Santana I, Caldeira GL, Padovano C, *et al.* Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2015; 1852(7):1428-41.

- Moure A, Cruz JM, Franco D, Manuel Domínguez J, Sineiro J, Domínguez H, *et al.* Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001. p 145-71.
- Nacera Belmekki, Nassima Bendimerad, Chahrazed Bekhechi XF. Chemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Teucrium polium* L. Essential Oil from Eastern Algeria. *J Med Plants Res*, 2014; 14(7):898-902.
- Naji KM, Thamer FH, Numan AA, Dauqan EM, Alshaibi YM, D'souza MR. Ferric-bipyridine assay: A novel spectrophotometric method for measurement of antioxidant capacity. *Heliyon*, 2020; 6(1):e03162.
- Nakano I, Tsuda M, Kinugawa S, Fukushima A, Kakutani N, Takada S, *et al.* Loop diuretic use is associated with skeletal muscle wasting in patients with heart failure. *Journal of Cardiology*, 2020.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, ninth International Supplement. 1999.
- Néné-Bi SA, Soro TY, Zahoui OS, Traoré F. Effet d'une administration aiguë d'un extrait aqueux de *Bridelia ferruginea* Benth. (Euphorbiaceae) sur la fonction rénale chez le rat. *Phytotherapie*, 2013; 11(6):359-64.
- Nguyen VT, Pham NMQ, Vuong Q Van, Bowyer MC, van Altena IA, Scarlett CJ. Phytochemical retention and antioxidant capacity of xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as prepared by different drying methods. *Drying Technology*, 2016; 34(3):324-34.
- Nile SH, Park SW. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*. 2014. p 134-44.
- Noble W, Virani Z, Cree R. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology letter*, 1992; 72:195-8.
- Ntezurubanza L, Scheffer JJ, Looman A, Baerheim Svendsen A. Composition of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* grown in Rwanda. *Planta Medica*, 1984; 50(5):385-8.
- OMS. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle 2014-2013. Geneve; 2014.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49:4619-4626.
- Ouelhadj A, Ait Salem L, Djenane D. Antibacterial activity of *Pelargonium x asperum* essential oil and its potential synergy with nisin. *Phytotherapie*, 2017.

- Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 2006; 69(5):1046-55.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 1986; 44(6):307-15.
- P. Hallouët, A. Borry. Bilan des entrées et des sorties, la diurèse. In : *Mémo-guide de biologie et de physiologie humaines - UE 21 et 22*. 2009.
- Parsaee H, Shafiee-Nick. Anti-spasmodic and anti-nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iranian Biomedical Journal*, 2006; 10(3):145-9.
- Peña-Gómez N, Ruiz-Rico M, Pérez-Esteve É, Fernández-Segovia I, Barat JM. Novel antimicrobial filtering materials based on carvacrol, eugenol, thymol and vanillin immobilized on silica microparticles for water treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2019; 58:102228.
- Pesaraklu A, Mianabadi M, Bagherieh- Najjar MB. Comparison of antioxidant properties of *Teucrium polium* from Golestan, North Khorasan, and Semnan Provinces. *Clinical Biochemistry*, 2011; 44(13):S261.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 1999; 269(2):337-41.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53(10):4290-302.
- Przygodzka M, Zielińska D, Ciesarová Z, Kukurová K, Zieliński H. Comparison of methods for evaluation of the antioxidant capacity and phenolic compounds in common spices. *LWT - Food Science and Technology*, 2014; 58(2):321-6.
- Quenzel P. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Paris; 1963.
- Rafieian-Kopaei M, Baradaran A. *Teucrium polium* and kidney. *J Ren Inj Prev*, 2013; 2(11):3-4.
- Rahim G, Qureshi R, Arshad M, Gulfraz M. Phytochemical Analysis and Antioxidant Properties of *Teucrium stocksianum* Flower from Malakand Division , Pakistan. 2013:377-81.

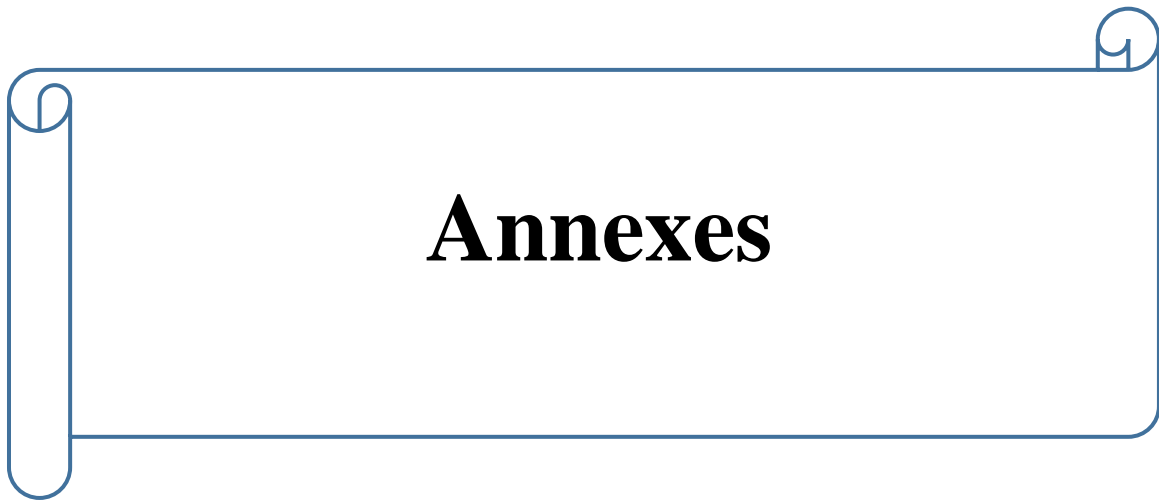
- Rajabi Z, Ebrahimi M, Farajpour M. Compositions and yield variation of essential oils among and within nine *Salvia* species from various areas of Iran. *Industrial Crops & Products*, 2014; 61:233-9.
- Rasekh HR, Khoshnood-Mansourkhani MJ, Kamalinejad M. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia*, 2001; 72(8):937-9.
- Ricci D, Fraternali D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G, *et al.* Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2005; 98(1-2):195-200.
- Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 2013; 28(5):269-79.
- Sadeghi S, Davoodvandi A, Pourhanifeh MH, Sharifi N, ArefNezhad R, Sahebnaasagh R, *et al.* Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019. p 131-40.
- Sagbo II, Afolayan AJ, Bradley G. Antioxidant, antibacterial and phytochemical properties of two medicinal plants against the wound infecting bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017; 7(9):817-25.
- Salazar-Gómez A, Pablo-Pérez SS, Estévez-Carmona MM, Meléndez-Camargo ME. Diuretic activity of aqueous extract and smoothie preparation of *verbena crocata* in rat. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2018; 13(3):236-40.
- Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging. *Food Sci Tech Int*, 2002; 8(13):121-37.
- Saroglou V, Arfan M, Shabir A, Hadjipavlou-Litina D, Skaltsa H. Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium royleanum* Wall. ex Benth growing in Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 2007; 22(2):154-7.
- Schlesier K, Harvat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res*, 2002; 36:177-87.
- Schlienger J-L. *Stress oxydant et alimentation*. Elsevier Masson ; 2018 , p 115-7.
- Schröder S, Beckmann K, Franconi G, Meyer-Hamme G, Friedemann T, Greten HJ, *et al.* Can medical herbs stimulate regeneration or neuroprotection and treat neuropathic pain in chemotherapy-induced peripheral neuropathy? *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013; 2013:18.
- Sellem I, Chakchouk-Mtibaa A, Zaghden H, Smaoui S, Ennouri K, Mellouli L. Harvesting season dependent variation in chemical composition and biological activities of the essential

- oil obtained from *Inula graveolens* (L.) grown in Chebba (Tunisia) salt marsh. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020; 13(3):4835-45.
- Septama A, Xiao J, Panichayupakaranant P. A Synergistic effect of artocarpanone from *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) on the antibacterial activity of some antibiotics and their effect on membrane permeability. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 2017; 6(2):1.
- Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 2006; 67(18):2058-70.
- Sharififar F, Dehghn-Nudeh G MM. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 2009; 112:885-885.
- Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 2009; 112:885-8.
- Sijelmassi A. *Les plantes Médicinales du Maroc*. Fennec. Casablanca; 2000 , 285 p.
- Silbernagl S, Agamemnon D, Daniel L. Atlas de poche de physiologie. In : *Médecine-sciences*. 2001.
- Silke B. Haemodynamic impact of diuretic therapy in chronic heart failure. *Cardiology*, 1994; 84(SUPPL. 2):115-23.
- Sim YY, Jess Ong WT, Nyam KL. Effect of various solvents on the pulsed ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from *Hibiscus cannabinus* L. leaves. *Industrial Crops and Products*, 2019; 140:111708.
- Simić A, Soković MD, Ristić M, Grujić-Jovanović S, Vukojević J, Marin PD. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 2004; 18(9):713-7.
- Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CAN. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 2007; 45(9):1650-61.
- Singh SB, Barrett JF. Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71:1006-15.
- Sisay M. Evaluation of the diuretic activity of the aqueous and 80% methanol extracts of the root of *Euclea divinorum* Hiern (Ebenaceae) in Sprague Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017; 202:114-21.
- Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977; 28(1):49-55.

- Sontakke, Sontakke S, Hm S, Rv S, Em. Studies on antioxidant activity and characterization of essential oil extracted from *Cinnamomum zeylanicum* Bark. ~ 137 ~ The Pharma Innovation Journal, 2019; 8(3):137-40.
- Stankovic MS, Niciforovic N, Mihailovic V, Topuzovic M, Solujic S. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2012; 81(2):117-22.
- Stinco CM, Heredia FJ, Vicario IM, Meléndez-Martínez AJ. In vitro antioxidant capacity of tomato products: Relationships with their lycopene, phytoene, phytofluene and alpha-tocopherol contents, evaluation of interactions and correlation with reflectance measurements. *LWT - Food Science and Technology*, 2016; 65:718-24.
- Stokes JB. Ion transport by the collecting duct. *Seminars in nephrology*, 1993; 13(2):202-12.
- Sueishi Y, Nii R, Uda C, Takashima A. Antioxidant capacities in various animal sera as measured with multiple free-radical scavenging method. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2019; 29(16):2145-9.
- Tabacco A, Meiattini F, Moda E, Tarli P. Simplified Enzymic / Colorimetric Serum Urea Nitrogen Determination Thymol Is a Suitable Preservative for Uric Acid Standards in the Uricase Technique CHEMISTRY , in the CK-BB Least-Squares Evaluation of Linearity More on the Detection of Serum CK-BB Acti. *Clinical chemistry*, 1979; 25(2):4-5.
- Tabarraei H, Hassan J, Parvizi MR, Golshahi H, keshavarz-Tarikhi H. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats. *Toxicology Reports*, 2019; 6:869-74.
- Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G, Mathé G. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2002. p 200-7.
- Taroq A, Kamari F El, Oumokhtar B, Aouam I, Atki Y El, Lyoussi B, *et al.* Phytochemical Screening of the Essential Oil of *Syzygium aromaticum* and Antibacterial Activity against Nosocomial Infections in Neonatal Intensive Care. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2018; 48(14):58-61.
- Tenore GC, Ciampaglia R, Arnold NA, Piozzi F, Napolitano F, Rigano D, *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food and Chemical Toxicology*, 2011; 49(1):238-43.
- Utchariyakiat I, Surassmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016; 16(1):158.


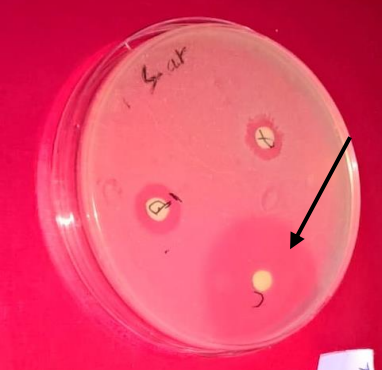
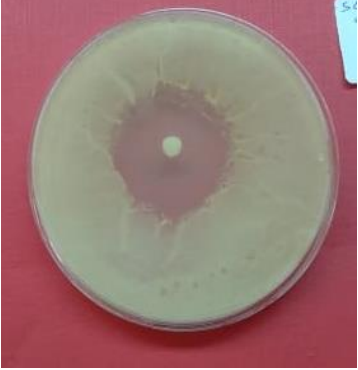

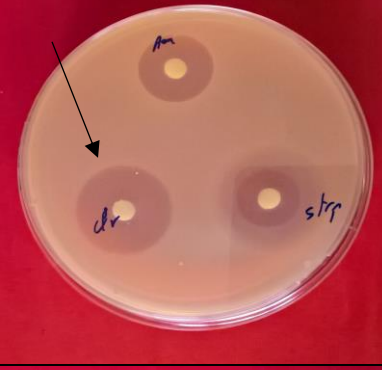



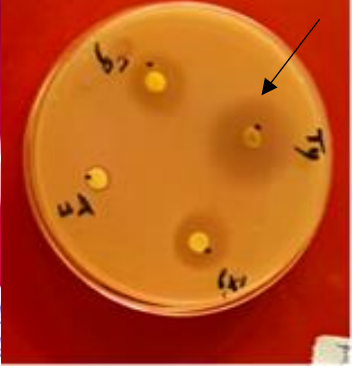



- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007. p 44-84.
- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents. *Microbial Pathogenesis*, 2018; 120:198-203.
- Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *RFL Revue francophone des laboratoires*, 2008; 2008(407):61-9.
- Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, *et al.* *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis*, 2019; 126:323-31.
- Waksman SA. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance. *Mycologia*, 1947; 5:39.
- Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 2000; 406:775–781.
- Walters NA, Beer D, Villiers A, Walczak B, Joubert E. Genotypic variation in phenolic composition of *Cyclopia pubescens* (honeybush tea) seedling plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2019; 78:129-37.
- Wei J, Neogi T, Terkeltaub R, Fenves AZ, Zeng C, Misra D, *et al.* Thiazide diuretics and risk of knee replacement surgery among patients with knee osteoarthritis: a general population-based cohort study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2019; 27(10):1454-61.
- Wendakoon, SAKAGUCHI M. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. *Journal of Food Protection*, 1995; 58(3):280-3.
- Wianowska D, Dawidowicz AL. Can matrix solid phase dispersion (MSPD) be more simplified? Application of solventless MSPD sample preparation method for GC-MS and GC-FID analysis of plant essential oil components. *Talanta*, 2016; 151:179-82.
- Wichtl M, Anton R. *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2e édition. 2003 , 788 p.
- Wile D. Diuretics: A review. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2012; 49(5):419-31.
- Wu C, Zhuang Y, Jiang S, Tian F, Teng Y, Chen X, *et al.* Cinnamaldehyde induces apoptosis and reverses epithelial-mesenchymal transition through inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in non-small cell lung cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2017; 84:58-74.

- Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 2003; 36(9):949-57.
- Xie G-Y, Ma J, Guan L, Liu X-M, Wang A, Hu C-H. Proliferation effects of cinnamon extract on human HeLa and HL-60 tumor cell lines. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2018; 22:5347-54.
- Xu Z, Ji A, Zhang X, Song J, Chen S. Biosynthesis and Regulation of Active Compounds in Medicinal Model Plant *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Herbal Medicines*, 2016; 8(1):3-11.
- Yang X, Sun Z, Wang W, Zhou Q, Shi G, Wei F, *et al.* Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. *Science of the Total Environment*, 2018; 643:559-68.
- Yap PSX, Lim SHE, Hu CP, Yiap BC. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, 2013; 20(8-9):710-3.
- Yuliana ND, Khatib A, Link-Struensee AMR, Ijzerman AP, Rungkat-Zakaria F, Young HC, *et al.* Adenosine A1 receptor binding activity of methoxy flavonoids from *Orthosiphon stamineus*. *Planta Medica*, 2009; 75(2):132-6.
- Zeng X, Xi Y, Jiang W. Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019; 59(13):2125-35.
- Zhang Y, Wang Y, Zhu X, Cao P, Wei S, Lu Y. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*, 2017; 113:396-402.
- Zhao Y, Wang P, Zheng W, Yu G, Li Z, She Y, *et al.* Three-stage microwave extraction of cuminal (Cuminum cyminum L.) Seed essential oil with natural deep eutectic solvents. *Industrial Crops and Products*, 2019; 140:111660.
- Zhishen. J MT, W J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on Superoxide radicals. *Food chem*, 1999; 64:555-9.
- Zhuang T, Han H, Yang Z. Iron, Oxidative Stress and Gestational Diabetes. *Nutrients*, 2014; 6:3968-80.
- Zrira S. Le marché des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. Maroc; 2015.
- Żukowski P, Maciejczyk M, Waszkiel D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*. 2018. p 8-17.

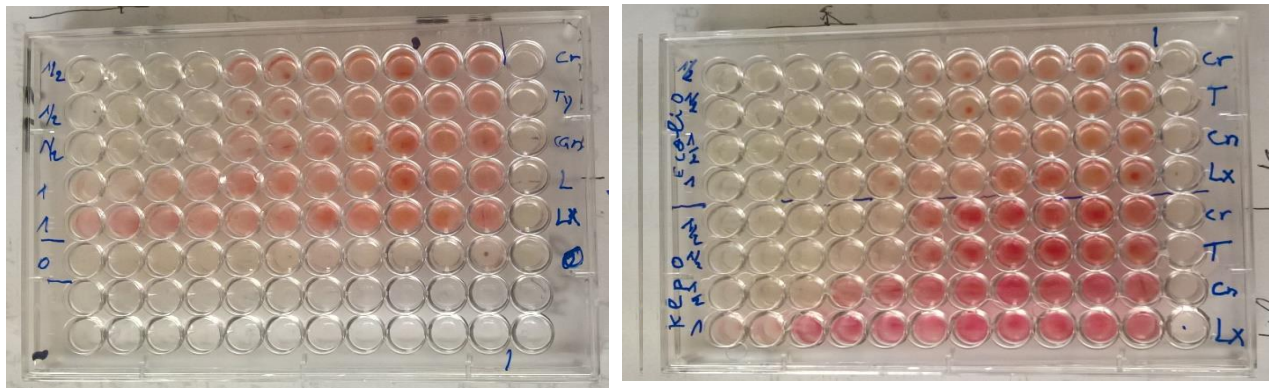


**Annexes**

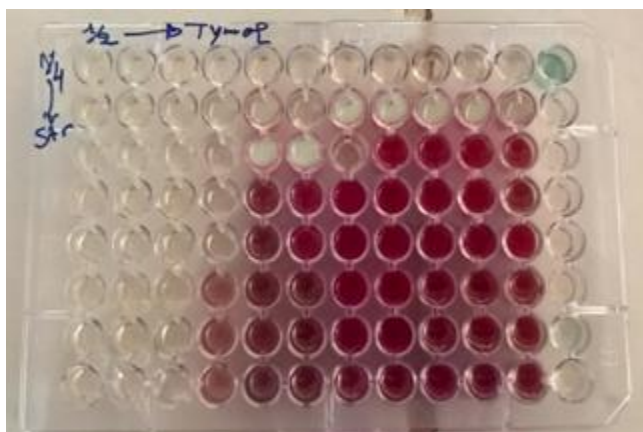
**Annexe 1 : Zone d'inhibition du pouvoir antibactérien de quelques composés testés.**

	<i>E. coli</i> BLCE 255	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2785
<i>C. cassia</i>			
<i>T. polium</i> ssp. <i>polium</i>			
Thymol			
Carvacrol			

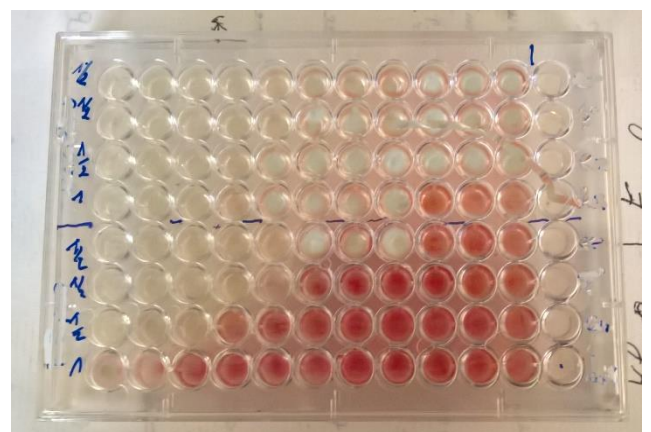
**Annexe 2 : Concentration minimale inhibitrice du pouvoir antibactérien de certains composés testés**



**Annexe 3 : Potentiel synergique antibactérien de quelques composés**



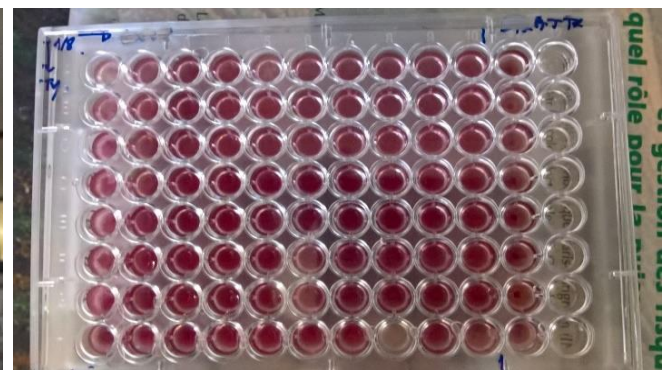
**Effet additif lors de la combinaison du Thymol avec l'HE de *T. polium* vis-à-vis *E. coli***



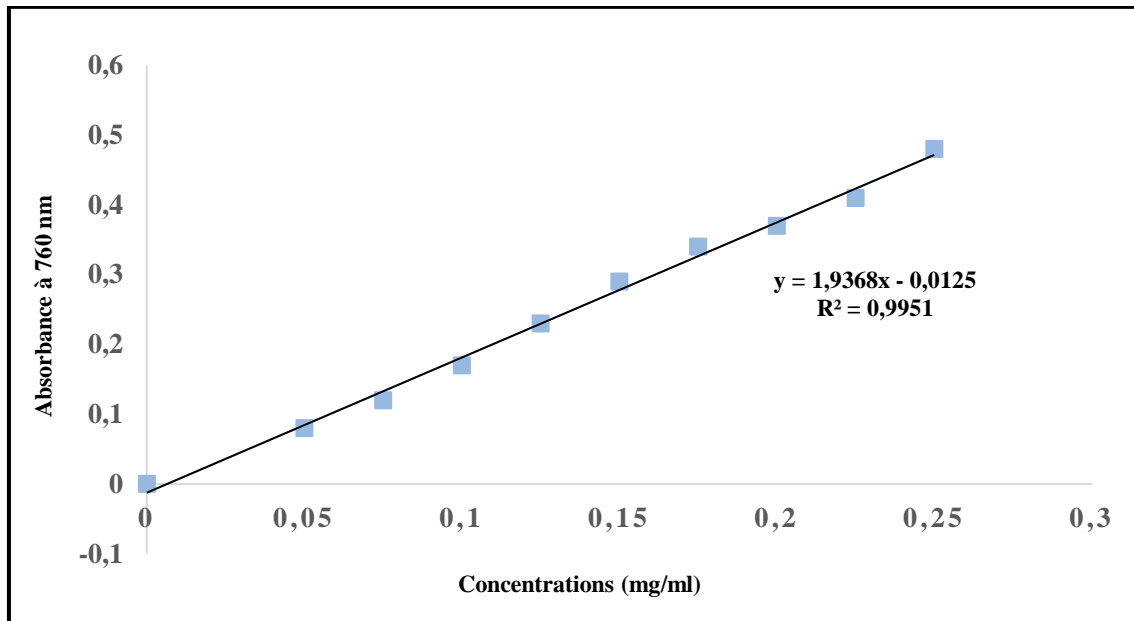
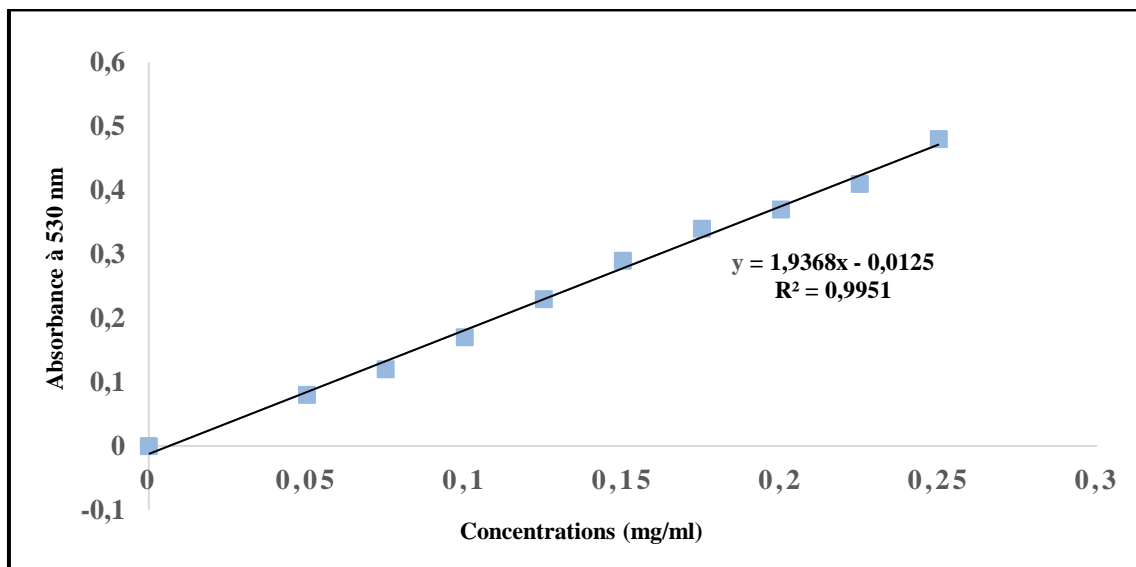
**Effet Synergique lors de la combinaison du Thymol avec l'HE de *C. cassia* vis-à-vis *S. aureus* SARM 27 C1**

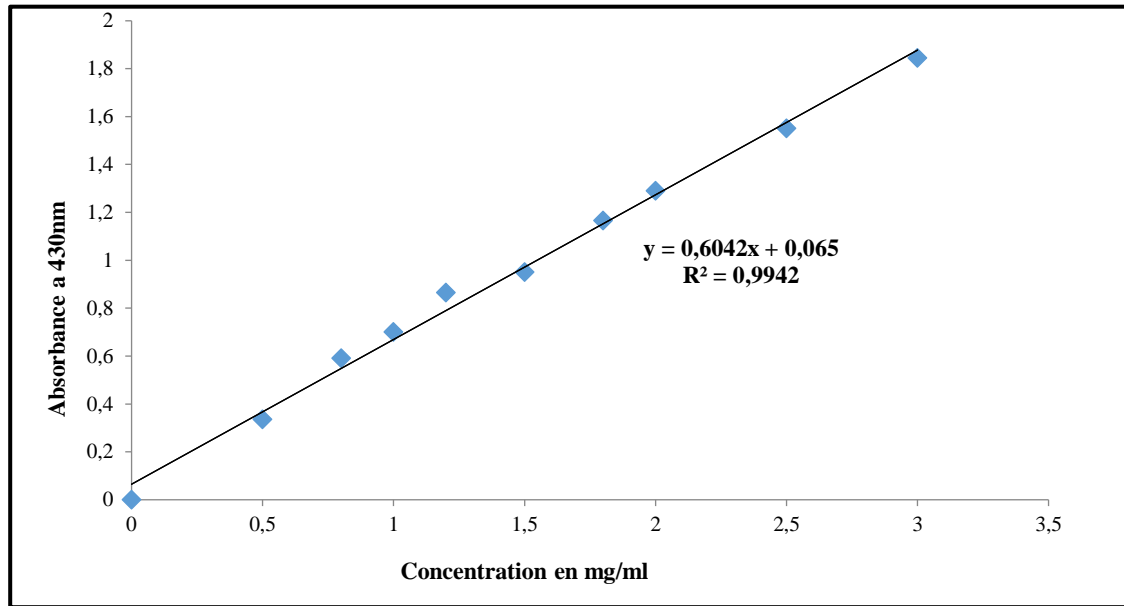


**Effet indifférent lors de la combinaison de l'HE de *C. cassia* avec Cinnamaldéhyde vis-à-vis *P. aeruginosa* ATCC2785**

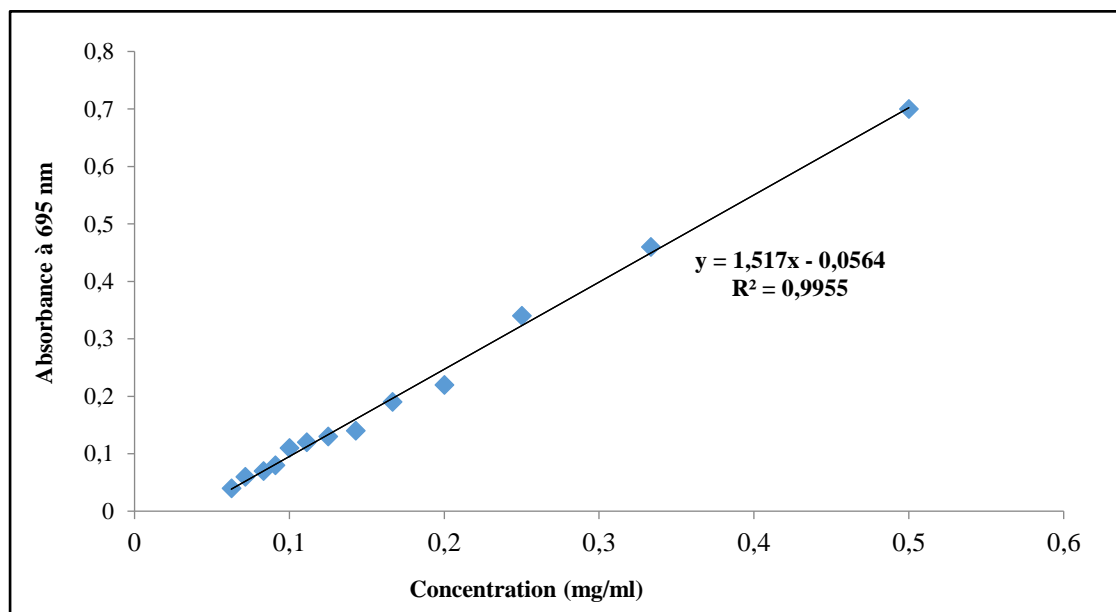


**Effet Antagoniste lors de la combinaison de l'HE de *C. cassia* avec l'Eugénol vis-à-vis *S. aureus* ATCC 25923**

**Annexe 4 : Les courbes d'étalonnages****Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.****Courbe d'étalonnage de Rutin pour le dosage des Flavonoïdes.**



*Courbe étalon de la quercétine pour le dosage des flavones et flavonols.*



*Courbe étalon de la vitamine C pour la mesure de la capacité antioxydante totale.*

# **Publications scientifiques**



ORIGINAL ARTICLE

# Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections

Yassine El Atki<sup>a,\*</sup>, Imane Aouam<sup>a</sup>, Fatima El Kamari<sup>a</sup>, Amal Taroq<sup>a</sup>,  
Badiaa Lyoussi<sup>a</sup>, Bouchra Oumokhtar<sup>b</sup>, Abdelfattah Abdellaoui<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar Mehraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

<sup>b</sup>Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Medicine and Pharmacy, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Morocco

Received 13 November 2018; accepted 3 April 2019

Available online 11 April 2019

## KEYWORDS

*Teucrium polium*;  
GC-MS;  
Nosocomial infections;  
Antibacterial;  
Antioxidant

**Abstract** The aim of the present study was to determine the chemical composition and antioxidant activity of essential oils (EOs) from two *Teucrium polium* subspecies, to evaluate, also their antibacterial activities, against some nosocomial-bacteria. The phytochemical screening of essential oils was analyzed using gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS). The antibacterial activities were assessed by disc diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC), against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter koseri* and *Acinetobacter baumannii*) and Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*. The antioxidant potential was evaluated in vitro by three assays, namely free radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing activity power (FRAP) and total antioxidant capacity. Twenty-six components were identified in the EO of *Teucrium polium* subsp. *aurum* representing. Its major component was Caryophyllene (19.13%) followed by  $\gamma$ -Muurolene (13.02%),  $\tau$ -cadinol, (11.01%),  $\alpha$ -Gurjunene (9.2%), Rosifoliol (8.79%), 3-Carene (7.04%). However, twenty two components were identified in the EO of *T. polium* subsp. *polium*. Its major components are 3-carene (16.49%),  $\gamma$ -Muurolene (14.03%),  $\alpha$ -pinene (9.94%),  $\alpha$ -phellandrene (6.93%) and

Abbreviations: EOs, essential oils; MIC, minimal inhibitory concentration; *T. polium*, *Teucrium polium*.

\* Corresponding author.

E-mail address: [yassinelbs@gmail.com](mailto:yassinelbs@gmail.com) (Y. El Atki).

Peer review under responsibility of King Saud University.



Production and hosting by Elsevier

Caryophyllene (7.51%). The antibacterial activity of both essential oils showed a higher activity against tested nosocomial bacteria especially against *S. aureus* and *A. baumannii*. The EO of *T. polium* subsp. *aureum* showed better antioxidant activity as measured by DPPH and FRAP assays with IC<sub>50</sub> values of  $3.7 \pm 0.2$  mg/ml and  $2.31 \pm 0.11$  mg/ml, respectively. The total antioxidant capacity assay showed that *T. polium* subsp. *aureum* had a significant activity with value to 3308.27 mg equivalent to ascorbic acid/g of EO. The Moroccan *T. polium* essential oils could be exploited as an antimicrobial agent for the treatment of several infectious diseases caused by bacteria, especially, those who have developed resistance to conventional antibiotics.

© 2019 Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Nosocomial infections dominated by bacterial strains represent a real problem in our modern health care system, and they are characterized by high morbidity and mortality rates (Jenkins, 2017). In Morocco, The incidence of nosocomial infections, in the reanimation units is high and dominated by multi-drugs resistant bacteria (Maoulainine et al., 2014). Utilization of medicament is crucial for treating these infections, but it is also under the important selection pressure affecting many bacteria and those who have developed resistance. The world health organization (WHO, 2017), published a report listing the most dangerous multidrug-resistant bacteria to which a new antibiotic should be discovered urgently. This is the reason why natural alternatives were established in order to overcome the incidence of resistant bacteria (Rossiter et al., 2017). Several reports have indicated potent antimicrobial activity of essential oils, extracted from aromatic and medicinal plants, against various microorganisms (Gherraf et al., 2017; Siddique et al., 2020). Against to antibiotics, essential oils are composed of secondary metabolites therefore, the microorganisms cannot resist in mutant (Moussaoui and Alaoui, 2016). Among these essential oils, the potential antimicrobial of *Teucrium* species has been documented (Belmekki et al., 2014; Djabou et al., 2013; Ricci et al., 2005). The *Teucrium polium* L. (Lamiaceae) is distributed throughout Morocco with its subspecies, among which *Teucrium polium* L. subsp. *Polium* and *Teucrium polium* L. subsp. *aureum* (Navarro and El oualidi, 1997). In Morocco folk medicine, *Teucrium polium* (Germander) locally called "Jaada", it is used for the treatment of a variety of diseases, including digestive disorders, liver problems (Fakchich and Elachouri, 2014) inflammation, hypertension, fever, diabetes, rheumatism, parasitic diseases such as amoebicide (Henchiri et al., 2009). Numerous studies showed therapeutic properties of *Teucrium polium* such as, anti-inflammatory, anti-cancer (Menichini et al., 2009), antibacterial (Djabou et al., 2013; Stanković et al., 2017), antidiabetic (Tabatabaie and Yazdanparast, 2017), anti-spasmodic, anti-nociceptive (Parsae and Shafiee-nick, 2006) and antioxidant effects (Khaled-Khodja et al., 2014). Study on chemical composition of essential oils from Algerian *Teucrium polium* subsp. *polium* have been previously reported,  $\alpha$ -pinene, Germacrene,  $\gamma$ -Cadinene, and  $\alpha$ -Cadinol were identified as their major constituents (Djabou et al., 2012). However, to our knowledge, this is the first report on the phytochemical of *T. polium* subsp. *aureum* essential oil and, there has not been any study on the antioxidant and antibacterial activities of EOs from *T. polium* subsp. *aureum* and *T. polium* subsp. *polium*. Therefore, the

main goal of the present work was to determine the phytochemicals and antioxidant potential of *T. polium* subsp. *polium* and *T. polium* subsp. *aureum* essential oils. Moreover to evaluate their antibacterial activity, against bacterial responsible for the nosocomial infections contracted at patients in the University Centre Hospital of Fez Morocco.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Homologous series of n-alkanes (C8–C20), Butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH), ammonium molybdate, sodium phosphate, quercetin, vitamin C, iron III chloride (FeCl<sub>3</sub>), and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). While potassium ferricyanide (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), culture media and standard antibiotics were purchased from COGELAB (Morocco).

### 2.2. Selection and identification of plant material

Aerial parts of *T. polium* L. subsp. *Polium* and *T. polium* L. subsp. *aureum* were collected in April 2015 from the regions of Midelt (Morocco). They were identified by Professor Amina Bari, a botanist in the department of Biological Sciences, Faculty of Science, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez (Morocco). Plant material was dried for three weeks in the shade at room temperature. The samples dried were stored at 5 °C until the preparation of the plant essential oils.

### 2.3. Isolation of the essential oils

A portion (200 g) of the dried aerial parts was submitted for 3 h to water distillation, using a Clevenger-type apparatus, according to the method recommended by the European Pharmacopoeia (1975). Plant material (200 g) was distilled in 700 ml of water in a 2000 ml flask. The obtained essential oils were dried with anhydrous "sodium t sulfate" and stored in a refrigerator at 4–5 °C prior to analysis. Yields were calculated based on the dried weight of each sample.

### 2.4. Chemical analysis of the essential oils

#### 2.4.1. Gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID)

The isolated essential oils were diluted with hexane (dilution ratio 10:100), and 1  $\mu$ l was sampled for the gas chromatographic analysis. Trace gas chromatograph (GC) (ULTRA

S/N 20062969, Thermo Fischer), gas chromatograph equipped with HP-5MS non polar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, film thickness 0.25 µm) was used. Operating conditions: oven temperature program from 50 °C (2 min) to 280 °C at 5 °C/min and the final temperature kept for 10 min; 2 “split mode” ratio 1:20; Nitrogen (N<sub>2</sub>) carrier gas, flow rate 1 ml/min; temperature of injector and detector (flame ionization detector) was fixed at 250 °C and 280 °C, respectively.

#### 2.4.2. Gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS)

The *Teucrium polium* essential oils were analyzed run on a Thermo Fischer capillary gas chromatograph directly coupled to the mass spectrometer system (model GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 210729), using an HP-5MS non polar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, 0.25 mm film thickness). The operating condition of GC-MS oven temperature was kept as follows: initial temperature 40 °C for 2 min, programmed rate 2 °C/min up to final temperature 260 °C with isotherm for 10 min; injector temperature 250 °C. The helium was the carrier gas with a flow rate (1 ml/min). Essential oils were diluted in hexane with a dilution ratio of 10:100. The volume of the injected specimen was 1 µl of diluted oil, split injection technique; ionization energy 70 eV, in the electronic ionization mode; ion source temperature 200 °C, scan mass range of *m/z* 40–650 and interface line temperature 300 °C. Components characterization was made by determination of their retention indices (RI) relative to those of a homologous series of *n*-alkanes (C8–C20) (Fluka, Buchs/sg, Switzerland) and by matching their recorded mass spectra with those stored in the spectrometer database (NIST MS Library v. 2.0) and the bibliography (Adams, 2007).

### 2.5. Antibacterial activities of essential oils

#### 2.5.1. Bacterial strains

In this study the antibacterial activity of *T. polium* L. subsp. *Polium* and *T. polium* L. subsp. *aureum* was tested against, Gram-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and Gram-negative bacteria included *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) and *Citrobacter koseri* (*C. koseri*). All strains tested were isolated in a hospital environment from clinical patients in reanimation service (CHU, Morocco). The inoculum suspension was obtained by taking colonies from 24 h cultures. The colonies were suspended in sterile 0.9% aqueous solution of NaCl and shaken for 20 s. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard (10<sup>8</sup> CFU/ml) (Mello et al., 2014).

#### 2.5.2. Agar disc diffusion assay

The agar disc diffusion assay was determined in triplicate according to the experiment described by Furtado and Medeiros (1980). The suspensions of microorganisms (1–5 × 10<sup>8</sup> CFU/ml) were flood inoculated onto the surface of Mueller Hinton (MH) agar plates. Sterile 6 mm diameter filter discs (Whatman paper N° 3) were impregnated with 10 µl/disc of the compound and were put on to the surface of the inoculated Mueller Hinton agar. The plates were incubated at 37 °C

for 18 h. Antibacterial effect was evaluated by measuring the inhibition zones against the tested bacterial strains. The standard drugs for comparison were the discs antibiogram of Imipenem (IMP) Vancomycin (VA), Cefaclor (CEC), Nifurofurantoin (F), Kanamycin (K).

#### 2.5.3. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using a microdilution assay in 96-well plates according to the experiment of the *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999)* with some modifications. The different concentrations of essential oils are prepared in a suspension containing 0.2% agar in sterile distilled water in order to disperse the compounds without adding solvent or detergent (Remmal et al., 1993). They are carried out by successive dilutions 1/2 ranging from 100 to 0.09 mg/ml. The concentrations obtained in the well were between 25 and 0.02 mg/ml. Bacterial suspensions were prepared in the same manner described previously and diluted in MH broth and plated in 96 well plates at a density of 1–5 × 10<sup>6</sup> CFU/ml. Finally, the plates were incubated at 37 °C for 18 h, bacterial growth was visually by adding to each well 20 µl of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) aqueous solution (1%), with additional incubation for 1 h. MIC was defined as the lowest concentration that does not produce a red color (Mello et al., 2014).

### 2.6. In vitro antioxidant activities of essential oils

#### 2.6.1. DPPH radical scavenging activity

The DPPH method was introduced 50 years ago by Blois (1958). The ability of the essential oil to scavenge the DPPH radical was measured using the method described by Wu et al. (2003). 0.1 ml of various concentrations of the essential oil or standard was added to 1.5 ml of the ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm by a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in dark. The percentage inhibition was calculated by the following equation:

$$I (\%) = \left( 1 - \left( \frac{A_s}{A_0} \right) \right) * 100$$

where A<sub>0</sub> is the absorbance of the negative control, and A<sub>s</sub> is the absorbance of the sample. BHT served as a positive control. The IC<sub>50</sub> values were calculated as the concentration of causing a 50% inhibition of DPPH radical.

#### 2.6.2. Reducing power capacity (FRAP)

The reducing power capacity of the tested oils was determined in accordance with the procedure of Oyaizu (1986). 200 µl of the essential oils were mixed with 500 µl of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 500 µl of potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 1%. The obtained solution was incubated at 50 °C for 20 min. The mixture was acidified with 500 µl of trichloroacetic acid (TCA) 10%. Which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500 µl of distilled water and 100 µl of FeCl<sub>3</sub> (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercetin and BHT were used as a standard. The results were expressed as IC<sub>50</sub> (mg/ml). IC<sub>50</sub> (concentration

corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

### 2.6.3. Total antioxidant capacity

The assay was based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) and subsequent formation of a green phosphate Mo (V) complex in acid pH (Prieto et al., 1999). A total volume of 25  $\mu$ l of essential oil was added to 1 ml of reagent solution (0.6 mol/L sulphuric acid, 28 mmol/L sodium phosphate and 4 mmol/L ammonium molybdate). The mixtures were incubated at 95 °C for 90 min and then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 695 nm (Jasco v-530). The total antioxidant activity was expressed as the number of equivalence of ascorbic acid (mg AAE/g EO).

### 2.7. Statistical analysis

The mean values,  $\pm$  standard deviations were calculated by using GraphPad Prism 5 (Microsoft Software). The results were compared by one-way ANOVA followed by Tukey-test, using the same software. Differences at  $P < 0.05$  were considered to be significant.

## 3. Result and discussion

### 3.1. Essential oils yield

The essential oils obtained from the aerial parts of *T. polium* subsp. *aureum* and *T. polium* subsp. *polium* were transparent yellow in color, yielded 0.9% and 0.75%, respectively. This yield is higher than that of *T. polium* studied in Algeria (0.27%) (Belmekki et al., 2014) and less than that of Saudi Arabia *T. polium* (1.65%) (Al-Ghamdi and Al-ghamdia, 2014).

### 3.2. Essential oils chemical composition

The chemical composition of essential oils from two *Teucrium* species was analyzed by GC-FID and GC-MS techniques, and their chromatographic profiles were summarized in Figs. 1 and 2. Constituents of EOs are listed in order of their elution on the HP-5MS column (Table 1). Twenty six components were found in the essential oil of *Teucrium polium* subsp. *aureum* representing 93.16% of the total oil. Its major component was Caryophyllene (19.13%) followed by  $\gamma$ -Muurolene (13.02%),  $\tau$ -cadinol, (11.01%),  $\alpha$ -Gurjunene (9.2%), Rosifoliol (8.79%), 3-Carene (7.04%), with a prevalence of Sesquiterpene hydrocarbons (64.11%). However, Twenty two components were identified in the oil of *T. polium* subsp. *polium* (94.49% of total oil). Its major components are 3-carene (16.49%),  $\gamma$ -Muurolene (14.03%),  $\alpha$ -pinene (9.94%),  $\alpha$ -phellandrene (6.93%) and Caryophyllene (7.51%). Sesquiterpene hydrocarbons (54.5%) and Monoterpene hydrocarbons (38.23%) constituted the most abundant fraction of this oil. Notice that certain components exist in the *T. polium* subsp. *aureum* EO ( $\alpha$ -terpenyl acetate,  $\beta$ -Cubebene, Aristolene, Valencene, Cubenol and Rosifoliol) but, are absent in the *T. polium* subsp. *polium* EO. Similarly;  $\alpha$ -phellandrene, Aromadendrene, and Ledol; exist in the essential oil of the *T. polium* subsp. *polium* but not in the oil of the *T. polium* subsp. *aureum*. Moreover, To our knowledge only one study has been reported on the

phytochemical of *T. polium* subsp. *polium* that demonstrated that Germacene (14.8%)  $\beta$ -pinene (16.6%) and  $\alpha$ -pinene (7.2%) are its main components (Djabou et al., 2012). However, other studies have determined the chemical composition of *T. polium* but they did not specify its subspecies. Cozzani et al. (2005) found that the main components of *T. polium* EO were  $\alpha$ -pinene (28.8%),  $\beta$ -pinene (7.2%) and p-cymene (7.0%). Germacrene (25.81%), bicyclgermacrene (13%),  $\beta$ -pinene (11.69%) were found to be the main components in *T. polium* EO (Belmekki et al, 2014). In Karpathos Island, Carvacrol (10.1%), Germacrene (3.1%), and  $\gamma$ -Cadinene (2.5%) are the major constituents of *T. polium* EO (Menichini et al., 2012). Furthermore, the major constituents of *T. polium* oil from Saudi Arabia were  $\alpha$ -Cadinol (5.93%) and  $\beta$ -pinene,  $\beta$ -gurjurenene, and  $\alpha$ -pinene (Al-Ghamdi and Al-ghamdia, 2014). These differences in the composition of essential oils can be dependent on different factors, including the location of the plant species and method of extraction of the essential oil (Zhigzhitzhapova et al., 2014). In other hand, gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS) have been extensively used in the determination of EOs composition, because of their advantages such as high efficiency and speed properties (Shabir, 2005). Moreover, owing to the widespread use of GC in routine essential oils analysis, it is necessary that good GC methods are developed and that these are thoroughly validated (Sousa and Brancalion, 2011). For example, Wang et al. (2014) developed an automatic gas chromatograph system equipped with a mass spectrometer and a flame ionization detector (GC-MS/FID) for online measurements of volatile compounds in ambient air, such as C2–C12 hydrocarbons, C3–C6 carbonyls, halocarbons, and alkyl nitrates (Wang et al., 2014).

### 3.3. Antibacterial activities of essential oils

The antibacterial activities of essential oils from *T. polium* subsp. *polium* and *T. polium* subsp. *aureum* were studied, for the first time, using agar disk diffusion test and minimal inhibitory concentration (MIC) methods against six bacteria strains (*E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. koseri* and *A. baumannii*) responsible for nosocomial infections in Centre Hospital University of Fez, Morocco. Table 2 revealed that the tested EOs showed a wide antibacterial spectrum, against tested strains with the inhibition zone diameters varying from 8 to 23 mm, we notice that *T. polium* subsp. *aureum* and *T. polium* subsp. *polium* EOs had similar and comparative activities. Interestingly, these diameters were sometimes higher than those obtained with standard antibiotics used as controls. The gram-positive *S. aureus* and the Gram-negative *A. baumannii* were the most sensitive of the strains tested to both oil samples. However, these EOs showed a low activity against the Gram-negative *P. aeruginosa*. Table 3 summarized the MIC values of the essential oils against the tested strains. Oils from *T. polium* subsp. *aureum* and *T. polium* subsp. *polium* exhibited significant antimicrobial activity against *S. aureus* (MIC 0.17 mg/ml) and *K. pneumonia* (MIC 1.4 and 0.7 mg/ml). Compared to *C. koseri* (MIC 2.81 mg/ml) and *A. baumannii* (MIC 2.81 and MIC > 1.4 mg/ml), respectively. While, these EOs have low activity against *P. aeruginosa*, which was only inhibited at high concentration (5.62 mg/ml).

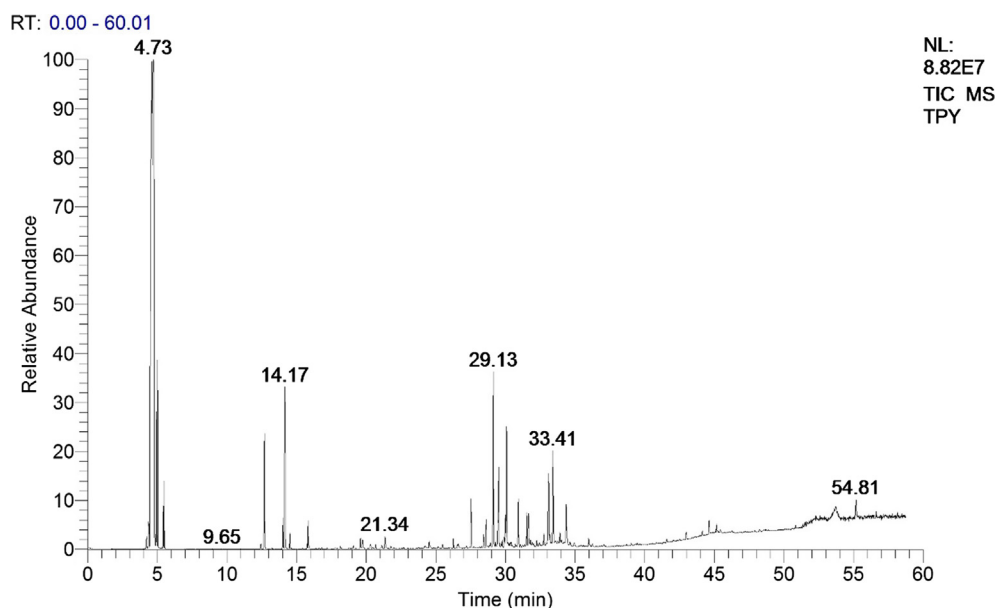


Fig. 1 Chromatographic profile by GC-MS of *T. polium* subsp. *polium*.

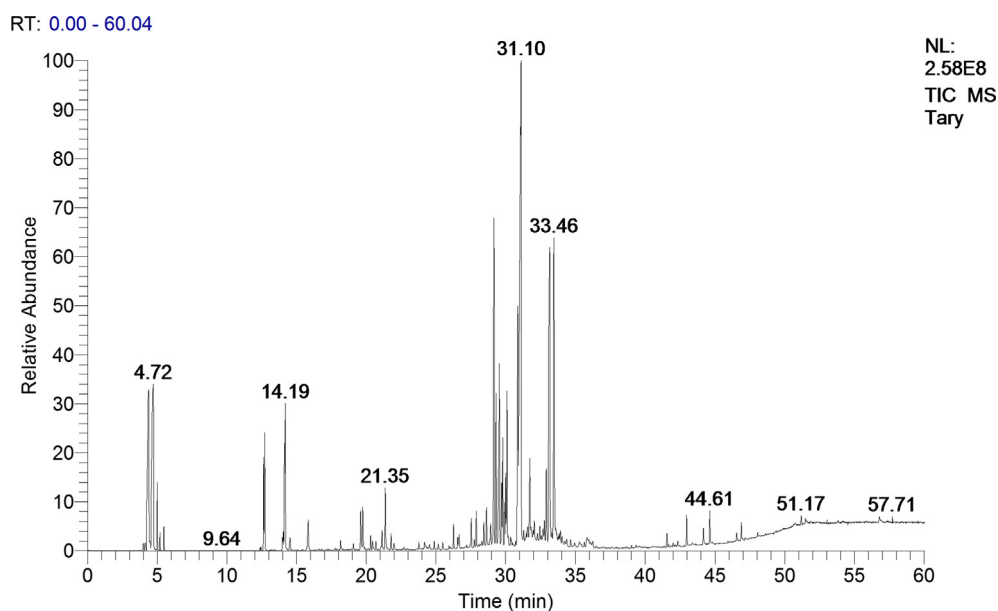


Fig. 2 Chromatographic profile by GC-MS of *T. polium* subsp. *aurum*.

Generally, the correlation between the antimicrobial activity of the EOs and their chemical composition suggests that the activity of the EOs could be attributed to the presence of high concentrations of the major compounds (Siddique et al., 2020). However, many reports have suggested that the synergistic or antagonistic action of the major and minor components from the EOs should be taken into consideration to explain their antimicrobial properties (Cutillas et al., 2018; Fadli et al., 2012). In the present study, we found that *S. aureus* appears to be more sensitive to both essential oils. It has been shown that Gram-negative bacteria are less sensitive than Gram-positive bacteria to the essential oils (Ruiz-Navajas et al., 2012; Tenore et al., 2011). This difference in susceptibility

could be explained by the structure of cell envelope Gram-negative bacteria possess an outer lipopolysaccharides membrane, delineating the periplasmic space with the cytoplasmic membrane that can limit diffusion of hydrophobic compounds. Without this membrane, the cell wall from Gram-positive group can be permeated more easily and external agents can alter the cytoplasmic membrane (Ruiz-Navajas et al., 2012; Tenore et al., 2011). As we showed, *P. aeruginosa* was the most highly resistant to both essential oils and to the antibiotics. Numerous studies had shown that *P. aeruginosa* is the most resistant to EOs (Kamari et al., 2018; El Atki et al., 2019; Jalal et al., 2015). It reported that the resistance of *P. aeruginosa* may be due to the structure of its outer

**Table 1** Percentage composition of essential oils from *T. polium* subsp. *polium* and *T. polium* subsp. *aureum*.

Compounds	RI	<i>T. polium</i> subsp. <i>aureum</i> area (%)	<i>T. polium</i> subsp. <i>polium</i> area (%)
$\alpha$ -Thujene	803	0.3	0.67
$\alpha$ -pinene	809	3.5	9.94
$\gamma$ -Terpinene	824	0.5	1.01
b-Myrcene	971	0.59	0.12
$\alpha$ -phelandrene	993	–	6.93
3-Carene	1007	7.04	16.49
Trans-sabinol	1109	0.4	0.62
Myrtenol	1194	3.02	1.11
$\alpha$ -Terpinyl acetate	1230	1	–
Thymol	1244	0.4	0.57
$\beta$ -Cubebene	1283	1.3	–
Aromadendrene	1343	–	1.3
Valencene	1391	0.56	–
Caryophyllene	1445	19.13	7.51
Aristolene	1416	0.9	–
Alloaromadendrene	1437	5.01	3.2
$\alpha$ -Himachalene	1452	1.32	5.56
$\beta$ -elemene	1463	–	0.2
$\gamma$ -selinene	1473	0.3	–
$\gamma$ -Muurolene	1478	13.02	14.03
$\alpha$ -Gurjunene	1492	9.2	6.54
$\beta$ -Eudesmol	1508	1.05	–
Ledol	1525	–	2.08
Germacrene-D-4-ol	1543	2.36	3.93
Spathulenol	1551	1.2	0.73
Caryophyllene oxid	1574	0.24	0.32
Cubenol	1583	0.7	–
$\tau$ -Cadinol	1595	11.01	5.1
Muurolol	1642	–	6.53
Rosifoliol	1654	8.79	–
Benzyl benzoate	1720	0.32	–
Monoterpene hydrocarbons		11.93	38.23
Oxygenated monoterpenes		3.82	2.3
Sesquiterpene hydrocarbons		64.11	54.3
Oxygenated sesquiterpenes		12.3	9.66
Total (%)		93.16	<b>94.49</b>

membrane particularly impermeable to EO and related to the action of efflux mechanisms, protecting the bacteria against the action of EO molecules (Utcharykiat et al., 2016; Tenore et al., 2011). According to Fertout-Mouri et al. (2017), the Gram-positive microorganisms were found to be more sensitive to essential oils from *T. polium* than Gram-negative bacteria. Antimicrobial activity of essential oil from *T. polium* has been investigated against five multi-drug resistant ATCC bacteria (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus*). The results showed that *T. polium* oil is active against all strains except for *P. aeruginosa* (Belmekki et al., 2014).

#### 3.4. Antioxidant activities of essential oils

DPPH test, FRAP, and phosphomolybdenum assays were used to evaluate antioxidant activities of *Teucrium polium* oils. The free radical scavenging activity of investigating essential oils was evaluated by the DPPH test. DPPH<sup>•</sup> is a stable free radical that can receive hydrogen or electron from an antioxidant to become a stable molecule. As depicted in Fig. 3, the both essential from *T. polium* oils presented a potent antiradical effect in a concentration dependent manner. The concentrations of the tested samples needed to remove 50% of the DPPH (IC<sub>50</sub>) are calculated and presented in Table 4. The results indicate that the *T. polium* subsp. *aureum* showed the higher DPPH radical scavenging activity than *T. polium* subsp. *polium* with IC<sub>50</sub> values of 3.7 and 7.2 mg/ml, respectively. But was significantly ( $p < 0.001$ ) lower than that of pure reference antioxidant BHT (0.12 mg/ml).

The reductive capacity is generally associated with the presence of antioxidant agents which exert their effect by breaking the free radical chains via hydrogen atom donation (Blažeković et al., 2010). Therefore, the ferric reducing power of investigating essential oils was evaluated by the FRAP assay. The reducing power assay is often used to evaluate the ability of an antioxidant to transform the Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup>. Fig. 4 showed the reducing power of different concentrations of two essential oil *T. polium* subspecies in comparison to quercetin and BHT. The results demonstrated that the both essential oils possessed the ability to reduce Fe<sup>3+</sup>, and their reducing power increased with a concentration. *T. polium* subsp. *aureum* had a significant ferric reducing power than

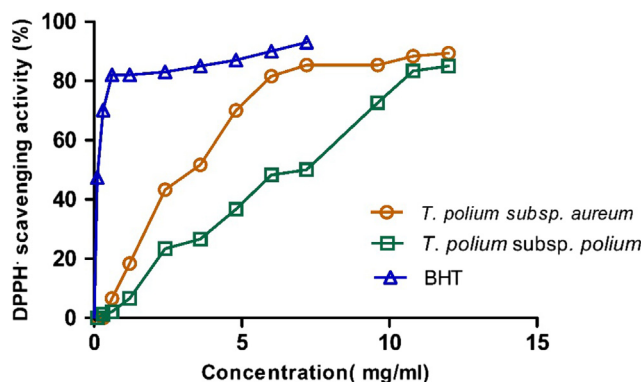
**Table 2** Inhibition zone diameter (mm) of *T. polium* subsp. *polium* and *T. polium* subsp. *aureum* essential oils.

Bacterial species	Inhibition zone (mm)						
	Essential oils		Antibiotics				
	<i>T. polium</i> subsp. <i>polium</i>	<i>T. polium</i> subsp. <i>aureum</i>	VA	F	CEC	IMP	K
<i>K. pneumoniae</i>	13 ± 0.5	11 ± 0.3	NI	22	NI	25	24
<i>P. aeruginosa</i>	8 ± 0.4	8 ± 0.2	13	20		12	NT
<i>S. aureus</i>	23 ± 1.4	21 ± 1	14	20	14	39	17
<i>A. Boumanii</i>	15 ± 0.8	20 ± 0.6	18	15	NI	NT	NT
<i>C. koseri</i>	12 ± 0.1	10 ± 0.01	16	16	9	12	15
<i>E. coli</i>	10 ± 0.5	11 ± 0.6	NI	19	NI	28	17

Inhibition zone includes diameter of disk (6 mm); NI: No inhibition; NT: Not tested; IMP: Imipenem; VA: Vancomycin; CEF: Cefaclor; F: Nifrofurantoin; K: Kanamycin.

**Table 3** Minimal inhibitory concentration (mg/ml) of *T. polium* subsp. *polium* and *T. polium* subsp. *aureum* essential oils.

Bacterial species	<i>T. polium</i> subsp. <i>polium</i>	<i>T. polium</i> subsp. <i>aureum</i>
<i>K. pneumoniae</i>	0.7	1.4
<i>P. aeruginosa</i>	5.62	5.62
<i>S. aureus</i>	0.17	0.17
<i>A. baumannii</i>	2.81	1.4
<i>C. koseri</i>	2.81	2.81
<i>E. coli</i>	5.62	2.81

**Fig. 3** DPPH free radical scavenging activity of *T. polium* subsp. *aureum* and *T. polium* subsp. *polium*. BHT was used as reference.**Table 4** Antioxidant activities of essential oils from *T. polium* subsp. *polium* and *T. polium* subsp. *aureum*.

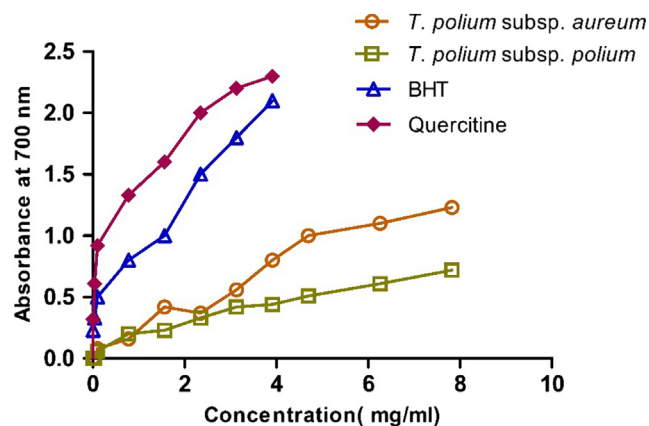
	DPPH (mg/ml)	FRAP (mg/ml)	Total antioxidant capacity (mg AAE/g EO)
<i>T. aureum</i>	3.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.11 <sup>b</sup>	1774.42 ± 87 <sup>b</sup>
<i>T. polium</i>	7.2 ± 0.55 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	3308.27 ± 100 <sup>a</sup>
BHT	0.12 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.01 <sup>c</sup>	540.62 ± 40 <sup>c</sup>
Quercetin	–	0.03 ± 0.00 <sup>d</sup>	512.70 ± 15 <sup>c</sup>

Values are giving as mean ± SD (n = 3). In each column, different letters are significantly different by the Tukey-test (P < 0.05).

*T. polium* subsp. *polium* with IC<sub>50</sub> values of 2.31 mg/ml and 3.5 mg/ml, respectively, but it was still significantly (p < 0.001) less than that of the synthetic antioxidants quercetin and BHT (Table 4).

Total antioxidant capacity of investigating *T. polium* essential oils, and reference antioxidant (quercetin and BHT) was determined by phosphomolybdenum method, which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) in the presence of an antioxidant (Prieto et al., 1999). The results expressed as ascorbic acid equivalents (mgAAE/g EO) are given in Table 4. The total antioxidant capacity of *T. polium* subsp. *polium* was significantly better in comparison to *T. polium* subsp. *aureum*, BHT and quercetin with values of 3308.27; 1774.42; 540.62 and 512.70 mgAAE/g EO, respectively.

According to Abdillah et al (2015), An antioxidant agent is considered to be active against free radicals if IC<sub>50</sub> less than

**Fig. 4** Reducing power of *T. polium* subsp. *aureum* and *T. polium* subsp. *polium*. Quercetin and BHT were used as references.

5 mg/ml (Abdillah et al., 2015). The EO studied of *T. polium* subsp. *aureum* have IC<sub>50</sub> < 5 mg/ml, therefore this EO is a possible good source of antioxidant compounds. The poor activity of the *T. polium* EO can be attributed to the weak ability of their main components to scavenge DPPH free radicals (Aazza et al., 2011). Moreover, previous studies showed significant free radical Scavenging activity of EOs from some Teucrium species (Ricci et al., 2005; Saroglou et al., 2007). It is noteworthy that the antioxidant activities of the two subspecies of *T. polium* essential oils are reported here for the first time.

#### 4. Conclusion

This study is the first characterization of the chemical composition, antioxidant and antibacterial (against nosocomial infections) activities of two wild Moroccan *T. polium* subsp. essential oils. Our results demonstrated that the major constituents are different in the essential oils of two subspecies. Moreover, the remarkable antioxidant effect and strong inhibitory activity against nosocomial-bacteria of *T. polium* essential oils suggest their possible use as a natural antibacterial drug for bacteria causing nosocomial infections in the intensive care rooms.

#### Acknowledgement

The authors wish to thank the Regional Center of Interface, University Sidi Mohamed Ben Abdellah, Morocco, for providing GC-MS facilities. Special thanks go to Professor Amina Bari (Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Morocco) for the identification of the plants.

#### Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Contribution of authors

We declare that this work was done by the authors named in this article, A. Abdellaoui conceived and designed the study.

Y. El atki and I. Aouam: carried out the laboratory work, collected and analyzed the data and writing the manuscript. F. El kamari and A. Taroq: supervised the work and assisted in data analysis, B. Oumokhtar who isolated and identified the nosocomial bacteria. While B. Lyoussi revised and corrected the manuscript. The manuscript was proof-read by all the authors and approved for publication.

## References

- Aazza, S., Lyoussi, B., Miguel, M.G., 2011. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules* 16, 7672–7690. <https://doi.org/10.3390/molecules16097672>.
- Abdillah, S., Tambunan, R.M., Farida, Y., Sandhiutami, N.M.D., Dewi, R.M., 2015. Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. *Asian Pacif. J. Trop. Dis.* 5, 454–457. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60814-3](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60814-3).
- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* [https://doi.org/10.1163/\\_q3\\_SIM\\_00374](https://doi.org/10.1163/_q3_SIM_00374).
- Al-Ghamdi, A.G., Al-ghamdia, F.A., 2014. Analysis of the essential oil of the germander (*Teucrium polium*) aerial parts from the northern region of Saudi Arabia. *Int. J. Appl. Biol. Pharma. Technol.* 5, 128–135.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- Blažeković, B., Vladimir-Knežević, S., Brantner, A., Štefan, B.S., 2010. Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. “Budrovka”: a comparative study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules* 15, 5971–5987. <https://doi.org/10.3390/molecules15095971>.
- Cozzani, S., Muselli, A., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., Tomi, F., Casanova, J., 2005. Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. *Flav. Fragr. J.* 20, 436–441. <https://doi.org/10.1002/ffj.1463>.
- Cutillas, A.-B., Carrasco, A., Martínez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela, J., 2018. Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. *J. Food Drug Anal.* 26, 529–544. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2017.05.004>.
- Djabou, N., Allali, H., Battesti, M.-J., Tabti, B., Costa, J., Muselli, A., Varesi, L., 2012. Chemical and genetic differentiation of two Mediterranean subspecies of *Teucrium scorodonia* L. *Phytochemistry* 74, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.09.002>.
- Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M.C., Desjobert, J.M., Bolla, J.M., Costa, J., Berti, L., Luciani, A., Muselli, A., 2013. Phytochemical composition of *Corsican Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxic-infectious pathogens. *Food Control* 30, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.025>.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.E., Pags, J. M., Hassani, L., 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.003>.
- Fakchich, J., Elachouri, M., 2014. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *J. Ethnopharmacol.* 154, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.016>.
- Fertout-Mouri, N., Latrèche, A., Mehdadi, Z., Toumi-Bénali, F., Khaled, M.B., 2017. Composition chimique et activité antibactérienne de l’huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytotherapie* 15, 346–353. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1048-1>.
- Furtado, G.L., Medeiros, A.A., 1980. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: significance of the intermediate category. *J. Clin. Microbiol.* 12, 550–553.
- Gherra, N., Zellaoui, A., Kabouche, A., Lahouel, M., Salhi, R., Rhouati, S., 2017. Chemical constituents and antimicrobial activity of essential oils of *Ammodaucus leucotricus*. *Arab. J. Chem.* 10, S2476–S2478. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2013.09.013>.
- Henchiri, H., Bodo, B., Deville, A., Dubost, L., Zourgui, L., Raies, A., Grellier, P., Mambu, L., 2009. Sesquiterpenoids from *Teucrium ramosissimum*. *Phytochemistry* 70, 1435–1441. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.012>.
- Jalal, Z., El Atki, Y., Lyoussi, B., Abdellaoui, A., 2015. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacif. J. Trop. Biomed.* 5, 458–461.
- Jenkins, D.R., 2017. Nosocomial infections and infection control. *Medicine* 45, 629–633. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2017.07.005>.
- Kamari, F. El, Taroq, A., El Atki, Y., Aouam, I., Lyoussi, B., Abdellaoui, A., 2018. Chemical composition of essential oils from *vitex agnus-castus* L. Growing in Morocco and its in vitro antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 11, 365–368. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.27307>.
- Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K., 2014. Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Ind. Crops Prod.* 61, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.037>.
- Maoulainine, F.-M.-R., Elidrissi, N.-S., Chkil, G., Abba, F., Soraa, N., Chabaa, L., Amine, M., Aboussad, A., 2014. Épidémiologie de l’infection nosocomiale bactérienne dans un service de réanimation néonatale marocain. *Archives de Pédiatrie* 21, 938–943. <https://doi.org/10.1016/J.ARCPED.2014.04.033>.
- Mello, S., Bittencourt, F., Fronza, N., Cunha, A., Neud, G., Rosana, C., Vieira, W., 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7°C. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.032>.
- Menichini, F., Conforti, F., Rigano, D., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F., 2012. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chem.* 115, 679–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.067>.
- Menichini, F., Conforti, F., Rigano, D., Formisano, C., Piozzi, F., Senatore, F., 2009. Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chem.* 115, 679–686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.067>.
- Moussaoui, F., Alaoui, T., 2016. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacif. J. Trop. Biomed.* 6, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.024>.
- Belmekki, Nacera, Bendimerad, Nassima, Chahrazed Bekhechi, X.F., 2014. Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Eastern Algeria. *J. M ed. Plants Res.* 14, 898–902. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.1160>.
- Navarro, T., El Oualidi, J., 1997. Synopsis of the genus *Teucrium* L. (Lamiaceae) in Morocco. *Acta Botanica Malacitana* 22, 187–203.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard), 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, ninth International Supplement.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from

- glucosamine. *Jpn. J. Nutrit. Diet.* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>.
- Parsaee, H., Shafiee-nick, R., 2006. Anti-spasmodic and anti-nociceptive effects of *Teucrium polium* aqueous extract. *Iran. Biomed. J* 9, 145–149.
- Pharmacopoeia, E., 1975. *European pharmacopoeia. maisonneuve. S. A. Sainte* 3, 68–80.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Essent. Oil Res* 5, 179–184.
- Ricci, D., Fraternali, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifano, F., Burini, G., Curini, M., 2005. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 98, 195–200. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2005.01.022>.
- Rositer, S.E., Fletcher, M.H., Wuest, W.M., 2017. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chem. Rev.* 117, 12415–12474. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., 2012. Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. *Food Control* 27, 294–299. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.04.005>.
- Saroglou, V., Arfan, M., Shabir, A., Hadjipavlou-Litina, D., Skaltsa, H., 2007. Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium royleanum* Wall. ex Benth growing in Pakistan. *Flav. Frag. J.* 22, 154–157. <https://doi.org/10.1002/ffj.1774>.
- Shabir, G.A., 2005. Method development and validation for the GC–FID assay of p-cymene in tea tree oil formulation. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 39, 681–684. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2005.03.036>.
- Siddique, S., Parveen, Z., Mazhar Firdaus-e-Bareen, S., 2020. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of three *Melaleuca* species of Pakistani flora. *Arabian J. Chem.* 13, 67–74. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.01.018>.
- Sousa, J., Brancalion, A., 2011. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 653–659.
- Stanković, M.S., Radić, Z.S., Blanco-Salas, J., Vázquez-Pardo, F.M., Ruiz-Téllez, T., 2017. Screening of selected species from Spanish flora as a source of bioactive substances. *Ind. Crops Prod.* 95, 493–501. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.070>.
- Tabatabaie, P.S., Yazdanparast, R., 2017. *Teucrium polium* extract reverses symptoms of streptozotocin-induced diabetes in rats via rebalancing the Pdx1 and FoxO1 expressions. *Biomed. Pharmacother.* 93, 1033–1039. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.082>.
- El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., Lyoussi, B., Abdellaoui, A., 2019. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J. Adv. Pharmaceut. Technol. Res.* 10, 63–67. [https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR\\_366\\_18](https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_366_18).
- Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F., 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food Chem. Toxicol.* 49, 238–243. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2010.10.022>.
- Utchariyakiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P., Chomnawang, M.T., 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complem. Altern. Med.* 16, 158. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1134-9>.
- Wang, M., Zeng, L., Lu, S., Shao, M., Liu, X., Yu, X., Chen, W., Yuan, B., Zhang, Q., Hu, M., Zhang, Z., 2014. Development and validation of a cryogen-free automatic gas chromatograph system (GC-MS/FID) for online measurements of volatile organic compounds. *Anal. Meth.* 6, 9424–9434. <https://doi.org/10.1039/C4AY01855A>.
- WHO, 2017. *A Global HealthGuardian: Climate Change, Air Pollution and Antimicrobial Resistance.* World Health Organization.
- Wu, H.-C., Chen, H.-M., Shiau, C.-Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36, 949–957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2).
- Zhigzhitzhapova, S.V., Radnaeva, L.D., Chen, S.L., Fu, P.C., Zhang, F.Q., 2014. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia hedinii* Ostenf. et Pauls. from the Qinghai-Tibetan Plateau. *Ind. Crops Prod.* 62, 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.047>.

ICMES 2018

## Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco

Y. El Atki<sup>a\*</sup>, I. Aouam<sup>a</sup>, F. El kamari<sup>a</sup>, A. Taroq<sup>a</sup>, B. Lyoussi<sup>a</sup>, M. Taleb<sup>b</sup>, A. Abdellaoui<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco.

<sup>b</sup>Laboratory of Electrochemical Engineering, Modeling and Environmental, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco.

---

### Abstract

The objective of the present study was to determine antioxidant activities, total phenolic and total flavonoid contents of methanol, ethanol, water and ethyl acetate extracts of Moroccan Germander (*Teucrium polium*). Total phenolic and flavonoid contents were determined spectrophotometrically using gallic acid and rutin as standards. Antioxidant activities was evaluated *in vitro* by three assays namely free radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and total antioxidant capacity. The total phenolic and flavonoid contents were significantly higher in the methanolic extract ( $P < 0.05$ ) than all other extracts. The methanolic extract showed the highest antioxidant activity as measured by DPPH and FRAP assays with  $IC_{50}$  values of  $0.41 \pm 0.03$  mg/ml and  $0.21 \pm 0.002$  mg/ml respectively. The total antioxidant capacity test showed that the water extract had a significant activity with value of  $129.5 \pm 3.19$  mg equivalent to ascorbic acid/g dry weight. However, the ethyl acetate extract had a weak antioxidant effect in the three tests. A significant correlation between antioxidant activities and contents of polyphenols and flavonoids was found. These results showed that Moroccan Germander have a great relevance in the prevention and treatment of diseases in which free radicals are implicated.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

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

**Keywords:** Germander; polyphenols; flavonoids; antioxidant activity; oxidative stress

---

\* Corresponding author. Tel.: +21273601470

E-mail address: [yassinelbs@gmail.com](mailto:yassinelbs@gmail.com)

## 1. Introduction

Oxidative stress defined as an imbalance between the production of reactive oxygen species (free radicals) and antioxidants defences [1]. This imbalance involved in the causation and progression of numerous diseases, including, neuro-degenerative disorders [2], cardiovascular disease, cancer [3], diabetes [4], and inflammatory diseases [5]. Because free radicals are highly reactive, they can cause damage of cell molecules, such as proteins, lipids and DNA leading to cell death by malfunction of these molecules.

Medicinal plants are considered as potential sources of natural antioxidant compounds, such as polyphenols flavonoids, tannins, stilbenes and coumarins [6]. These compounds can play a major role in prevent of free radical-mediated oxidative damages via acting at different levels in the pathophysiological chain [7].

The genus *Teucrium* (Lamiaceae family) includes 300 species distributed all over the world, particularly in the Mediterranean basin [8]. It usually develops on hillsides, sands, semi-arid and in arid places [9]. *Teucrium polium* plant is known for its richness on bioactive compounds such as essential oils, flavonoids, tannins and phenolic acids [10, 11], which have been reported in the literature to have antioxidant properties [12,13].

In Traditional Moroccan medicine, Germander (*T. polium*) locally called “Jaada”, aerial parts from the plant are used by the Moroccan population for the treatment of a various human diseases, including digestive disorders, liver problems [14], inflammation, hypertension, fever, diabetes, rheumatism and parasitic diseases [15]. Several biological activities of *T. polium* such as, anti-inflammatory, anti-cancer [16], antibacterial [8], antidiabetic [17], anti-spasmodic, anti-nociceptiv [18] and antioxidant [10] were reported. It known that the therapeutic benefit of *T. polium* is often attributed to their propriety to suppress oxidative processes [19]. According to Suboh *et al* (2004) the alcoholic of *T. polium* extract had a suppressing effect on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in red blood cells [20].

The main objective of our study was to investigate, for the first time, antioxidant activities, total phenolic and flavonoids contents of Moroccan *T. polium* extracts obtained by maceration method and to determine the relationship between antioxidant activities and phenolic compounds.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Reagents standards

Butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH), ammonium molybdate, aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>), sodium phosphate, quercetin, vitamin C, rutin, gallic acid, iron III chloride (FeCl<sub>3</sub>), potassium ferricyanide (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals and solvents used were of analytical grad.

### 2.2. Plants materials

Aerial parts of *T. polium* were collected in april, 2016 from the regions of Errachidia (South Morocco). The plant material was identified by Professor Amina Bari, a botanist at University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez, Morocco. A voucher specimen with reference number 2297/4-16-1/Er was deposited in the Department of Biology, Faculty of Science, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco.

### 2.3. Preparation of *T. polium* extracts

The plant material was dried at room temperature, powdered (10 g) and macerated for 48 H with 100 ml of solvent (water, methanol, ethanol and ethyl acetate). The resultant macerate was filtered and then concentrated to dryness under vacuum at 40°C using Rotary evaporator. The obtained extracts were kept in sterile sample tubes and stored in a refrigerator at 4°C.

## 2.4. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and results were expressed as mean  $\pm$  SD. The results were compared by one-way ANOVA followed by Tuckey-test, using the GraphPad Prism 5 (Microsoft Software). The correlations between antioxidant activities and phenolic compounds were realized by Pearson correlation coefficient (r) using the same program. Differences at  $P < 0.05$  were considered significant.

## 2.5. Determination of total phenolic contents

Total phenolic content of the extracts was determined by Folin-Ciocalteu method [21]. The 0.5 mL of a known dilution of the extract and 2 ml of 7% sodium carbonate solution were added to 2.5 mL of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2H of reaction at room temperature in the dark. Gallic acid was used as standard for the construction of calibration curve. Total phenol contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram dry weight of extract (mg GAE/g DW).

## 2.6. Determination of total flavonoid contents

Total flavonoid contents of extracts were measured by the aluminum chloride colorimetric assay [22]. 1 ml of sample or rutin standard solution was added into a 10 mL volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5% NaNO<sub>2</sub> was added, after five minutes 0.3 ml of 10 % AlCl<sub>3</sub> was added to react for 6 min. After that, 2 ml of NaOH (1M) was added and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as a standard for the construction of calibration curve. Total flavonoids contents were expressed as mg Rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW).

## 2.7. In vitro antioxidant activities

### 2.7.1. DPPH radical scavenging activity

The ability of the extracts to scavenge the DPPH radical was measured using the method described by Wu Chen *et al.*[23] 0.1 ml of different concentrations of the extracts or standard was added to 1.5 ml of ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH (2, 2-diphenyl-1 picrylhydrazyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in dark. The percentage of inhibition was calculated by the following equation:

$$I(\%) = \left( 1 - \left( \frac{A_s}{A_c} \right) \right) * 100$$

Where  $A_c$  is the absorbance of the negative control and  $A_s$  is the absorbance of the sample. BHT served as positive control. The IC<sub>50</sub> values were calculated as the concentration of causing a 50% inhibition of DPPH radical.

### 2.7.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The ferric reducing power of the tested extracts was determined in accordance with the method of Oyaizou [24]. 200  $\mu$ l of the extract was mixed with 500  $\mu$ l of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 500  $\mu$ l of potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 1%. The obtained solution was incubated at 50°C for 20 min. The mixture was acidified with 500  $\mu$ l of trichloroacetic acid (TCA) 10% which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500  $\mu$ l of distilled water and 100  $\mu$ l of FeCl<sub>3</sub> (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercetin was used as standard. The results were expressed as IC<sub>50</sub> (mg/ml). the IC<sub>50</sub> (concentration corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

### 2.7.3. Total antioxidant capacity

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

## 3. Results and discussion

### 3.1. Total phenolic and flavonoids contents

The total amounts of phenol were estimated by the Folin–Ciocalteu method and expressed in mg of gallic acid equivalents per gram of the dry weight. The distribution of phenolic compounds in *T. polium* extracts (tab. 1) demonstrated that the methanol extract contained the highest amounts with value of  $95.53 \pm 1.65$  mg GAE / g dry weight and the lowest phenolic content was observed in ethyl acetate extract with value of  $29.25 \pm 0.22$  mg GAE / g dry weight. According to the results found by *Stankovic et al.* [26], they demonstrate also that the highest total phenolic contents of *T. polium* is noticed with the methanolic extract with value of 157.84 mg of GAE/g DW. Results of another study reported that essential oils of *T. polium* exhibited lower amount of phenolic components [10]. On the other hand, it was reported that the levels of phenolics in plants depend on environmental conditions (temperature, light intensity and salinity) and biological factors (genotype, organ and ontogeny). Moreover, the phenolic compounds solubility is governed by the type of extraction and solvent used, the degree of polymerization of phenolics, and their interaction [27].

The total flavonoid contents were determined in comparison with rutin standard and the results were expressed in terms of mg RE/g dry weight of extract. As shown in tab. 1, the total flavonoid content of *T. polium* extracts ranged between 101.9 and 43.22 mg RE/g DW. Furthermore, the methanolic extract contained significantly a higher concentration of flavonoids ( $101.9 \pm 1.97$  mg RE/g DW) than the other tested extracts. The Flavonoids contents results obtained in our study are higher than that reported by *Tepe et al.*, (2011) [28]. According to another study, the flavonoid content values are ranged from 6.48 to 139.87 mg RE/g DW in the leaves, flowers and stem of *T. polium* extracts with the acetone extract giving a highest concentration of flavonoids [26] (Table 1). Methanol is therefore the best solvent to extract phenolic and flavonoids compounds from medicinal plants [29]. Several studies reported that polyphenols and flavonoids have a strong antioxidant activity [7, 23], and they are considered as anti-cancer, anti-inflammatory, antiviral and antibacterial agents due to their antioxidant and free radical scavenging properties [30].

Tab. 1: Total phenolic and flavonoid contents of different extracts from *T. polium*

Type of extract	Total phenolic content (GAE mg/g DW)	Total flavonoid content (RE mg/g DW)
Methanolic	$95.53 \pm 1.65^a$	$101.9 \pm 1.97^a$
Ethanollic	$70.28 \pm 3.89^b$	$65.83 \pm 0.38^c$
Water	$40.63 \pm 1.64^d$	$82.66 \pm 0.82^b$
Ethyl acetate	$29.25 \pm 0.22^{c,d}$	$43.22 \pm 2.36^d$

Values are giving as mean  $\pm$  SD (n=3). In each column, different letters are significantly different by the tukey-test (P<0.05).

### 3.2. In vitro antioxidant activities

#### 3.2.1. DPPH radical scavenging activity

The free radical-scavenging activity of the *T. polium* extracts was determined by the DPPH method, this method is based on the measure of capacity of the extracts to scavenge the free radical DPPH formed in solution by donation of hydrogen atom or an electron. Using this method, the results in tab. 2 showed a significant difference between all extracts ( $p < 0.05$ ) and between extracts and positive control (BHT). The methanol indicated, significantly, the greatest DPPH free radical-scavenging activity than other tested extracts with  $IC_{50}$  value of  $0.41 \pm 0.03$  mg/ml,

followed by water then ethanol and ethyl acetate extracts. However, when compared to the pure reference antioxidant BHT ( $0.12 \pm 0.01$  mg/ml), all the tested extracts showed significantly ( $p < 0.05$ ) a lower antioxidant activity. In addition, extracts with high scavenging activity should have a low  $IC_{50}$  value. An antioxidant agent is considered to be active against free radicals if  $IC_{50}$  is less than 5 mg/ml [31]. All extracts studied of *T. polium* have  $IC_{50}$  less than 5 mg/ml, therefore all extracts of *T. polium* are a possible source of antioxidants compounds. Previous studies demonstrated that *T. polium* showed significant free radical scavenging activity [10, 28]. Sharififar *et al.*, (2009) found that the methanolic extract of *T. polium* exhibited a strong DPPH radical-scavenging activity with an  $IC_{50}$  value of  $20.1 \mu\text{g/ml}$  [32], which is lower than that found in our study. Another study found that  $IC_{50}$  of *T. polium* extracts were ranging from ( $14.50$  to  $238.25 \mu\text{g/ml}$ ) and the highest activity noticed with polar solvent extracts [26]. These observed differences could be attributed to the extraction type used (Table 2).

Tab. 2:  $IC_{50}$  values of DPPH radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power of different extracts from *T. polium*.

Type of extract	DPPH (mg/ml)	FRAP (mg/ml)
Methanolic	$0.41 \pm 0.03^d$	$0.21 \pm 0.002^d$
Ethanollic	$0.74 \pm 0.005^c$	$0.34 \pm 0.006^c$
Water	$0.61 \pm 0.04^b$	$2.35 \pm 0.04^b$
Ethyl acetate	$1.62 \pm 0.08^a$	$4.25 \pm 0.1^a$
BHT	$0.12 \pm 0.01^c$	-
Quercetin	-	$0.03 \pm 0.00^e$

Values are giving as mean  $\pm$  SD (n=3). In each column, different letters are significantly different by the tukey-test ( $P < 0.05$ )

### 3.2.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The reducing power of *T. polium* extracts were evaluated by the FRAP assay. The reductive capacity is generally associated with the presence of antioxidant agents which exert their effect by breaking the free radical chains via hydrogen atom donation [33]. Therefore, the reducing power assay is often used to evaluate the ability of extracts to transform the  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$ , this capacity is compared to that of quercetin used as standard antioxidant. Results of reducing power assay, are shown in tab. 2. Extracts with high reducing power should have a low  $IC_{50}$  value. Methanolic extract showed the stronger reductive effect than all other extracts with an  $IC_{50}$  value of  $0.21 \pm 0.002$  mg/ml. But it was still significantly ( $p < 0.05$ ) lower than that of the synthetic antioxidant quercetin ( $0.03 \pm 0.00$  mg/ml). While the ethyl acetate extract possessed a lowest reductive effect with an  $IC_{50}$  value of  $4.25 \pm 0.1$  mg/ml. However, Ardestani *et al.*, (2007) demonstrated that *T. polium* ethyl acetate extract possess a high reducing power [34]. Several studies reported the reducing power of the extracts of *T. polium* and showed that the activity increased with concentration [10, 23]. According to Hasani *et al.*, (2007) *T. polium* extracts effectively inhibits oxidative stress *in vivo* by DPPH and reducing power assays [35].

### 3.3.3. Total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity of investigated *T. polium* extracts were determined by the phosphomolybdenum method, which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the antioxidant compounds and the subsequent formation of a green phosphate Mo (V) complex at acidic pH [25]. Generally, the phosphomolybdenum is a quantitative test of antioxidant potential, used as an indicator of antioxidant capacity of plant extracts. The found results, expressed as ascorbic acid equivalents per gram of dry weight (AAE/g DW) are presented in Fig.1. They revealed that the highest level of total antioxidant capacity was significantly ( $p < 0.01$ ) founded in water extract with value of  $129.5 \pm 3.19$  mg AAE/g DW, while the ethyl acetate extract significantly ( $p < 0.01$ ) gave the lowest capacity antioxidant ( $21.70 \pm 2.20$  mg AAE/g DW). This result suggests an important electron donating propriety of the water extract and so a great antioxidant capacity. Similar to our results, authors proved that the aqueous extract of *T. polium* had a substantial antioxidant activity *in vitro* [36]. Moreover, ethyl acetate extracts of this plant showed higher total antioxidant capacity with value of ( $318.4 \pm 25.5$  AAE/ DW)[34].

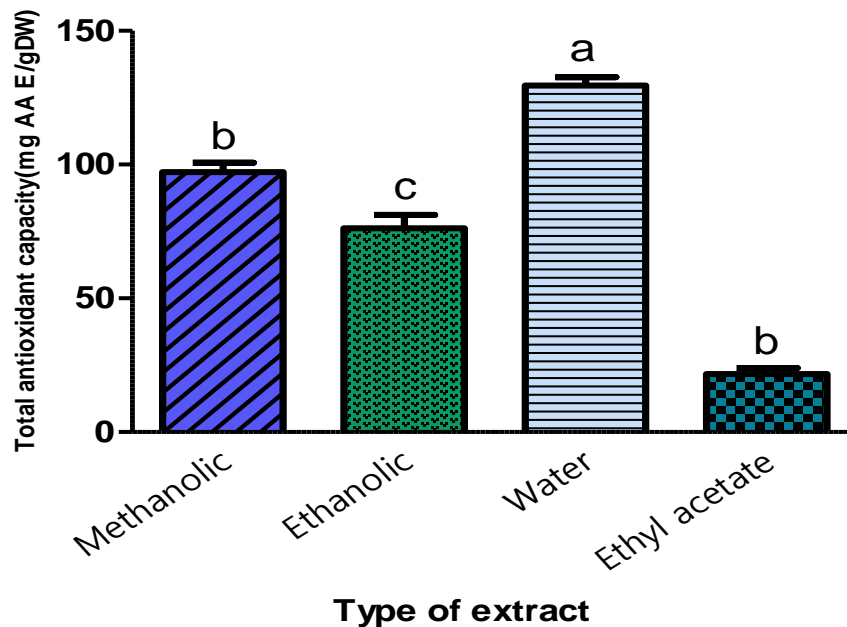


Fig. 1: Total antioxidant capacity of different extracts from *T. polium*. Results were expressed as mg AAE/g dry weight. Each value represents means  $\pm$  SD (n=3). Different letters symbolized significant differences by the tukey-test ( $P < 0.05$ )

### 3.3. Correlations of antioxidant activities with phenolic and flavonoids contents

In order to estimate the influence of phenolic compounds on the antioxidant activity of *T. polium* extracts, the correlation between the results of three antioxidant tests and contents of total phenols and flavonoids was studied. As illustrated in table 3, a significant and negative correlation was found between DPPH and total phenols ( $r^2 = -0.75$ ). Therefore, DPPH was also significantly correlated with total flavonoids ( $r^2 = -0.93$ ). For the ferric reducing power, the  $IC_{50}$  values were significantly and negatively correlated with total phenols ( $r^2 = -0.92$ ) and with total flavonoids ( $r^2 = -0.73$ ). Weak and non-significant correlation between total antioxidant capacity and totals phenols was found. Similar to our results, a high correlation between the total phenol and flavonoids contents with two of the antioxidant assays, like free radical scavenging activity and ferric reducing power has been reported in literature [10, 33]. Moreover, it was reported that the free radical scavenging ability of phenolic compounds is due to their capacity to trap free radicals by the transfer of the hydrogen atom then transformed into a stable molecule [37], and their reducing power is due to the presence of hydroxyl group in their structure that can serve as an electron donor [33]. Weak correlation between the total antioxidant capacity and phenols contents, indicating that total antioxidant capacity, in the extracts of *T. polium*, measures the activity of some other chemical components than the polyphenols. A similar result was also observed by Brantner *et al.*, [33] with Lavandula extracts. According to the literature, the antioxidant activity of extracts, in our study, could be attributed to the phenol and flavonoids contents [36, 34]. furthermore, antioxidant effect of phenolic compounds is mainly due to their redox propriety, which allow them to act as reducing agents, singlet oxygen quenchers, metal chelators, hydrogen donors, and reductants of ferryl hemoglobin [7].

Tab. 3: Correlations (Pearson correlation coefficient, r) of antioxidant activities with phenolic and flavonoids contents

Compounds	DPPH	Ferric reducing power	Total antioxidant capacity
Phenols contents	-0.75	-0.92	0.34
Flavonoids contents	-0.93	-0.73	0.80

#### 4. Conclusion

In the current study, the extracts of aerial parts of Moroccan *T. polium*, were investigated and compared for their antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. The greatest antioxidant propriety and the highest levels of total phenol and flavonoid contents are noticed with methanolic extract. Significant correlations were found between the phenolic compounds and two of the antioxidant activity tests, such as free radical scavenging activity and ferric reducing power, indicating that the phenolic compounds are the responsible of antioxidant effect from *T. polium*. Based on these results, Germander (*T. polium*) is an interesting source of phenol and natural antioxidant compounds. Consequently, this plant has a great relevance in the prevention and treatment of diseases in which free radicals are implicated; Germander can also be good sources of natural food preservative. Our results on antioxidant tests justified its uses in traditional medicine.

#### Acknowledgement

The authors wish to thank Professor Amina Bari (Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Morocco) for the identification of the plant.

#### References

- [1] J.M. McCord, Am. J. Med. 108 (2000) 652–659.
- [2] J. Emerit, M. Edeas, F. Bricaire, Biomed. Pharmacother. 58 (2004) 39–46.
- [3] E.M. Ju, S.E. Lee, H.J. Hwang, J.H. Kim, Life Sci. 74 (2004) 1013–1026.
- [4] T. Zhuang, H. Han, Z. Yang, Nutrients 6 (2014) 3968–3980.
- [5] T. Khouya, M. Ramchoun, A. Hmidani, S. Amrani, H. Harnafi, M. Benlyas, et al., Asian Pac. J. Trop. Biomed. (2015) 636–644.
- [6] D. Moussa, K.M. Konan, N.D.E. Koffi, J.A. Mamyrbekova-bekro, Y. Bekro, J. Mater. Environ. Sci. 9(2018) 724–729.
- [7] S.K. T. Pejatović, D. Samardžić, J. Mater. Environ. Sci. 8 (2017) 1929–1934.
- [8] N. Djabou, V. Lorenzi, E. Guinoiseau, S. Andreani, M.C. Giuliani, J.M. Desjobert, J.M. Bolla, J. Costa, L. Berti, A. Luciani, A. Muselli, Food Contr. 30 (2013) 354–363.
- [9] A.G. and F.A. Al-Ghamdi, Int. J. Appl. Biol. Pharm 5 (2014) 128–135.
- [10] N. Khaled-Khodja, L. Boulekbache-Makhlouf, K. Madani, Ind. Crops Prod. 61 (2014) 41–48.
- [11] T. Kadifkova Panovska, S. Kulevanova, M. Stefova, Act. Pharmac. (Zagreb, Croatia) 55 (2005) 207–214.
- [12] I. Aouam, Y. El Atki, A. Taroq, F. El Kamari, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, J. Pharm. Sci. & Res 10 (2018) 2689–2692.
- [13] A. Taroq, F. EL Kamari, I. Aouam, Y. EL Atki, B. Lyoussi, Asian J. Pharm Clin Res. 11 (2018) 1–4.
- [14] J. Fakhich, M. Elachouri, J. Ethnopharmacol. 154 (2014) 76–87.
- [15] H. Henchiri, B. Bodo, A. Deville, L. Dubost, L. Zourgui, A. Raies, P. Grellier, L. Mambu, Phytochem. 70 (2009) 1435–41.
- [16] F. Menichini, F. Conforti, D. Rigano, C. Formisano, F. Piozzi, F. Senatore, Food Chem. 115 (2009) 679–686.
- [17] M.R. Shahraki, M.R. Arab, E. Mirimokaddam, M.J. Palan, Iran. Biomed. J. 11 (2007) 65–68.
- [18] H. Parsaee, R. Shafiee-nick, Iran. Biomed. J. 9 (2006) 145–149.
- [19] S. Shtukmaster, P. Ljubuncic, A. Bomzon, Adv. Pharmacol. Sci. 2010 (2010) 1–7.
- [20] S.M. Suboh, Y.Y. Bilot, T.A. Aburjai, Phyther. Res. 18 (2004) 280–284.
- [21] K. Slinkard, V.L. Singleton, Am. J. Enol. Vit. 28 (1977) 49–55.
- [22] J. Zhishen, T. Mengcheng, W. Jianming, Food Chem. 64 (1999) 555–559.
- [23] H.C. Wu, H.-M. Chen, C.-Y. Shiau, Food Res. Int. 36 (2003) 949–957.
- [24] M. Oyaizu, Japanese J. Nutr. Diet. (1986) 307–315.
- [25] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, Anal. Biochem. 269 (1999) 337–341.
- [26] M.S. Stankovic, N. Niciforovic, V. Mihailovic, M. Topuzovic, S. Solujic, Acta Soc. Bot. Pol. 81 (2012) 117–122.
- [27] R. Ksouri, W. Megdiche, H. Falleh, N. Trabelsi, M. Boulaaba, A. Smaoui, C. Abdelly, Comp. Ren. Biol. 331 (2008) 865–873.
- [28] B. Tepe, S. Degerli, S. Arslan, E. Malatyali, C. Sarikurkcu, Fitoterapia 82 (2011) 237–46.
- [29] K. Chigayo, P.E.L. Mojapelo, S. Mnyakeni-Moleele, J.M. Misihairabgwi, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 6 (2016) 1037–1043.
- [30] W.R.B.R.K. Meskin Mark S., Randolph, Taylor Francis, New York, 2008.
- [31] S. Abdillah, R.M. Tambunan, Y. Farida, N.M.D. Sandhiutami, R.M. Dewi, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 5 (2015) 454–457.
- [32] F. Sharififar, G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini, Food Chem. 112 (2009) 885–888.
- [33] A. Brantner, Molecules 15 (2010) 5971–5987.
- [34] A. Ardestani, R. Yazdanparast, Food and Chemical Toxicology 45 (2007) 2402–2411.
- [35] S.V.-G. Parisa Hasani, N. Yasa, Acta Pharm. 57 (2007) 123–129.
- [36] P. Ljubuncic, S. Dakwar, I. Portnaya, U. Cogan, H. Azaizeh, A. Bomzon, Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 3 (2006) 329–338.
- [37] M.B.Š. Sanda Vladimir-Knežević, Biljana Blažeković, A. Antun, Molecules 16 (2011) 1454–1470.

# Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics

Yassine El Atki, Imane Aouam,  
Fatima El Kamari, Amal Taroq,  
Kaotar Nayme<sup>1</sup>,  
Mohammed Timinouni<sup>1</sup>,  
Badiaa Lyoussi,  
Abdelfattah Abdellaoui

Department of Biology, Laboratory  
of Physiology Pharmacology and  
Environmental Health, Faculty of  
Sciences Dhar Mehraz, Sidi Mohamed  
Ben Abdellah University, Fez, Morocco,  
<sup>1</sup>Molecular Bacteriology Laboratory,  
Pasteur Institute of Morocco,  
Casablanca

*J. Adv. Pharm. Technol. Res.*

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of *Cinnamomum cassia* (cinnamon) essential oil (EO) alone and in combination with some classical antibiotics against three multidrug-resistant bacteria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*, to search a possible synergy. The antibacterial activity of all tested compounds was determined by agar disc diffusion and minimum inhibitory concentration assays. The checkerboard method was used to quantify the efficacy of cinnamon EO in combination with these antibiotics. Fractional inhibitory concentrations were calculated and interpreted as synergy, addition, indifferent, or antagonism. A synergistic interaction was shown against *S. aureus* with the combination cinnamon EO and ampicillin or chloramphenicol and against *E. coli* when cinnamon EO was combined with chloramphenicol. However, the combination of cinnamon oil and streptomycin displayed additive effects against all bacteria stains. The combinations of cinnamon EO and antibiotics can be used as an alternative therapeutic application, which can decrease the minimum effective dose of the drugs, thus reducing their possible adverse effects and the costs of treatment.

**Key words:** Antibacterial drugs, fractional inhibitory concentration index, resistant bacteria, synergy

## INTRODUCTION

Multidrug-resistant bacteria are widely known as a serious threat to global health in the 21<sup>st</sup> century.<sup>[1]</sup> The World Health Organization published in 2017 a report listing the most dangerous multidrug-resistant bacteria to which new antibiotics should be urgently discovered.<sup>[2]</sup> The discovery of new antibacterial agents was mainly based on natural products that can be obtained from different sources including plants, bacteria, algae, fungi, and animals; but, there has been an increased interest in bioactive compounds provided by the plant as an alternative to the common

antibiotics.<sup>[3]</sup> Essential oils (EOs) account for a source of very promising natural compounds for producing new antibacterial drugs. Numerous studies have reported a strong antibacterial effect for some EOs.<sup>[4,5]</sup> Among these EOs, the potential antibacterial of cinnamon has been documented frequently.<sup>[6-8]</sup> Furthermore, the combinations, either single EOs or mixtures of purified main components, would assure the exhibition of the target bacteria to many chemical compounds and usually lead to better activity.<sup>[9]</sup> Combining different EOs has been recently studied in a view to increasing their antibacterial effect without increasing their concentration.<sup>[10-12]</sup> It was argued that the combination of cinnamon and some plants' EOs showed an additive effect against bacterial species compared to their pure EOs.<sup>[12,13]</sup> Limited reports on the combinations of cinnamon

### Address for correspondence:

Yassine El Atki,  
No. 196, Lots Alhadika Q4, Quartier Tghat, Fez 30090, Morocco.  
E-mail: yassinelbs@gmail.com

### Access this article online

#### Quick Response Code:



#### Website:

www.japtr.org

#### DOI:

10.4103/japtr.JAPTR\_366\_18

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

**For reprints contact:** reprints@medknow.com

**How to cite this article:** El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Nayme K, Timinouni M, *et al.* Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J Adv Pharm Technol Res* 2019;10:63-7.

with antibiotics demonstrated synergistic and additive effects against various microorganisms.<sup>[14-16]</sup> However, to the best of our knowledge, there are no available data about the antibacterial activity of cinnamon EO associated with antibiotics against multidrug-resistant *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Therefore, the aim of this study was to search the possible synergistic antibacterial effect of cinnamon EO combined with certain classical antibiotics as ampicillin, streptomycin, or chloramphenicol against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*.

## MATERIALS AND METHODS

### Essential oils extraction

*Cinnamomum cassia* (cinnamon) barks were purchased from a local supermarket in Fez province (Morocco). A total of 200 g of cinnamon barks was subjected to hydrodistillation for 3 h with 700 ml of distilled water using a Clevenger-type modified apparatus. The hydrosol was collected in a separatory funnel (1 L) so that the heavy oil was decanted to the bottom of the flask, while the hydrosol water was recycled into the flask containing the boiling plant material. The EO was collected and stored at 4°C before analysis.

### Bacterial strains

In this study, the antibacterial activity of cinnamon oil alone and in combination with some antibiotics as ampicillin, streptomycin, and chloramphenicol was tested against three bacterial strains (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *P. aeruginosa* ATCC 27853) provided by the Pasteur Institute of Casablanca (Morocco). The inoculum suspension was obtained by taking colonies from 24 h cultures. The colonies were suspended in sterile 0.9% aqueous solution of NaCl. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard ( $10^8$  colony-forming unit [CFU]/mL).<sup>[17]</sup>

### Agar disc diffusion assay

The agar disc diffusion assay was determined according to the experiment of Kirby-Bauer;<sup>[18]</sup> the suspensions of microorganisms ( $10^8$  CFU/ml) were flood inoculated onto the surface of Mueller Hinton (MH) agar plates. Sterile 6 mm diameter filter discs (Whatman paper No 3) were impregnated with 10 µg/disc of the compounds and were put onto the surface of the inoculated MH agar. The plates were incubated at 37°C for 18 h. The antibacterial effect was evaluated by measuring the inhibition zones against the tested bacterial strains. All the tests were performed in triplicate. The values of inhibition diameter are given as mean ± standard deviation. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test, using GraphPad Prism 5 software. Differences at  $P < 0.05$  were considered to be significant.

### Determination of the minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using a microdilution assay in 96 well plates according

to the experiment of the National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>[19]</sup> with modification; the different concentrations of cinnamon EO and antibiotics were prepared in a suspension containing 0.2% agar in sterile distilled water.<sup>[20]</sup> They were carried out by successive dilutions 1/2 ranging from 5000 to 9 µg/ml for EO and from 200 to 0.4 µg/ml for antibiotics. Cinnamon EO or antibiotics were added at different concentrations at the corresponding well in plate. The concentrations obtained in the wells are between 1250 and 2 µg/ml for EO and between 50 and 0.1 µg/ml for antibiotics. Bacterial suspensions were prepared in the same manner described previously and diluted in MH broth and plated in 96 well plates at a density of  $10^6$  CFU/ml. Finally, the plates were incubated at 37°C for 18–24 h. Bacterial growth was visually by adding to each well 20 µl of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride aqueous solution (1%). MIC was defined as the lowest concentration that does not produce red color.<sup>[17]</sup>

### Checkerboard assay

The evaluation of the interaction between cinnamon EO and antibiotics was carried out according to the method of Mody<sup>[21]</sup> with some modifications. Briefly, ten concentrations of cinnamon EO and eight concentrations of each antibiotic were prepared in sterile tubes by dilutions 1/2. Subsequently, EO at decreasing concentrations, going from MIC × 4 to MIC/128, was introduced horizontally into the 96 well plates. In the same manner, the antibiotics at decreasing concentrations, going from MIC × 4 to MIC/32, was introduced vertically. The final volume in each well was 200 µl comprising 25 µl of EO, 25 µl of one of the antibiotics' dilution, and 150 µl of MH media containing  $10^6$  CFU/ml of bacterial suspensions. The plates were then incubated at 37°C for 18 h. The analysis of the combination was obtained by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI) using the following formula:<sup>[22]</sup>

$$\text{FIC index (FICI)} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

$$\text{FIC}_A = \frac{\text{MIC of (A) in combination}}{\text{MIC of (A) alone}}$$

$$\text{FIC}_B = \frac{\text{MIC of (B) in combination}}{\text{MIC of (B) alone}}$$

Where (A) is cinnamon EO and (B) is one of the antibiotics.

The FICI values were interpreted as a synergistic effect when  $\text{FICI} \leq 0.5$ ; an additive effect when  $0.5 < \text{FICI} < 1$ ; an indifferent when  $1 < \text{FICI} < 4$ ; and an antagonistic effect when  $\text{FICI} > 4$ .

## RESULTS

### Antibacterial activity

The antibacterial activity of the cinnamon EO, streptomycin, ampicillin, and chloramphenicol tested against three

bacterial strains (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *P. aeruginosa* ATCC 27853) and the MIC results are shown in Table 1. Cinnamon oil was able to inhibit all strains tested: *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa* with the MIC of 4.88, 4.88, and 19.53 µg/ml, respectively. However, streptomycin had the same MIC (3.13 µg/ml) against all bacteria strains. Ampicillin and chloramphenicol inhibited *E. coli* with the same MIC of 0.31 µg/ml. However, the antibacterial effect of ampicillin was higher than that of chloramphenicol against *S. aureus* with the MIC of 0.16 and 0.31 µg/ml, respectively. While *P. aeruginosa* was resistant to ampicillin and chloramphenicol [Table 1].

### Combined effects of cinnamon essential oil and antibiotics

Tables 2 and 3 show the cinnamon oil tested against three multidrug-resistant bacteria in combination with some

antibiotics. As shown in Table 3, mixing antibiotics with cinnamon EO reduces the MICs, 2 fold for *P. aeruginosa*, 2–8 fold for *S. aureus*, and 2–4 for *E. coli*. As revealed in Table 3, the synergistic effect was obtained by the combination of cinnamon EO with ampicillin or chloramphenicol against *S. aureus* and by the combination of EO and chloramphenicol against *E. coli* with the FICI of 0.5. However, an additive effect was founded when EO was combined with streptomycin against all stains tested; *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*; with FICI of 1.00, 0.75, and 1.00, respectively. Moreover, the combination EO–ampicillin showed an indifferent effect against *E. coli* with the FICI of 1.25 [Table 3].

### DISCUSSION

Based on the results in Table 1, it was known that the cinnamon oil was able to inhibit all strains tested; these results are

**Table 1: Inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration of cinnamon essential oil and antibiotics**

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	ID	MIC	ID	MIC	ID	MIC
Cinnamon EO	29.0±0.7 <sup>a</sup>	4.88	40±0.5 <sup>a</sup>	4.88	30.5±1.0 <sup>a</sup>	19.53
Streptomycin	15.3±0.1 <sup>d</sup>	3.13	16±0.0 <sup>d</sup>	3.13	15.2±0.6 <sup>b</sup>	3.13
Ampicillin	20±0.5 <sup>c</sup>	0.31	37.1±0.2 <sup>b</sup>	0.16	NI	NT
Chloramphenicol	25±1.0 <sup>b</sup>	0.31	25.0±0.4 <sup>c</sup>	0.31	NI	NT

Inhibition zone includes diameter of disk (6 mm). Values of inhibition diameter are given as mean±SD. In each column, different letters are significantly different by the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). ID: Inhibition zone diameter (mm), MIC: Minimum inhibitory concentration (µg/ml), NT: Not tested, NI: No inhibition, EO: Essential oil, SD: Standard deviation, ATCC: American type culture collection

**Table 2: Minimum inhibitory concentrations (µg/ml) and fractional inhibitory concentration values of the combinations of Cinnamon EO and antibiotics**

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
	MIC alone	MIC combined	FIC	MIC alone	MIC combined	FIC	MIC alone	MIC combined	FIC
EO + streptomycin									
EO	4.88	2.44	0.50	4.88	1.22	0.25	19.53	9.77	0.50
Streptomycin	3.13	1.56	0.50	3.13	1.56	0.50	3.13	1.56	0.50
EO + ampicillin									
EO	4.88	1.22	0.25	4.88	0.61	0.13	19.53	NT	-
Ampicillin	0.31	0.31	1.00	0.16	0.04	0.25			
EO + chloramphenicol									
EO	4.88	1.22	0.25	4.88	1.22	0.25	4.8	NT	-
Chloramphenicol	0.31	0.08	0.25	0.31	0.08	0.25	NT		

FIC: Fractional inhibitory concentration, MIC: Minimum inhibitory concentration, EO: Essential oil, NT: Not tested, ATCC: American type culture collection

**Table 3: Fractional inhibitory concentration indices values of the combinations of cinnamon EO and antibiotics**

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	FICI	Interaction	FICI	Interaction	FICI	Interaction
EO + streptomycin	1.00	Additive	0.75	Additive	1	Additive
EO + ampicillin	1.25	Indifferent	0.38	Synergy	-	-
EO + chloramphenicol	0.50	Synergy	0.50	Synergy	-	-

EO: Essential oil, FICI: Fractional inhibitory concentration index, ATCC: American type culture collection



relatively in agreement with the previous reports.<sup>[7,12]</sup> The high antibacterial activity observed in cinnamon EO may be due to the action of transcinnamaldehyde, considered as its single major compound.<sup>[7,8]</sup> It has been reported that transcinnamaldehyde possesses the highest antimicrobial in comparison with other constituents of cinnamon oil.<sup>[9,23,24]</sup> On the other hand, synergistic interactions between different plant extracts are the aim of the herbal formulation in folk medicine.<sup>[25]</sup> Some authors had determined the antibacterial effect of cinnamon EO combinations; Utchariyakiat *et al.* showed that cinnamon EO combined with colistin demonstrated a synergistic action against multidrug-resistant *P. aeruginosa*.<sup>[14]</sup> Mahadlek *et al.* used the checkerboard assay to determine the activity of cinnamon oil associated with the same antimicrobial agents; they observed that cinnamon EO combinations with doxycycline hyclate, ciprofloxacin HCl, or metronidazole displayed an additive against *S. aureus* ATCC 6538P.<sup>[16]</sup> It was reported that the association of cinnamon oil and piperacillin demonstrated a synergistic interaction against *E. coli*.<sup>[15]</sup> There are some reports on the interaction between plant EOs and antibiotics, which indicated a synergistic action.<sup>[25,26]</sup> These data were confirmed by the present work, thus highlighting the efficacy of cinnamon oil when combined with ampicillin or chloramphenicol. The effect of a combination of cinnamon and other EOs was reported, for example, Clemente *et al.* demonstrated that the combination of cinnamon with mustard EOs showed an additive effect against *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and some other bacteria species.<sup>[12]</sup> Lu *et al.* showed that cinnamon combined with thyme or clove EOs displayed in most cases an additive or indifferent action against foodborne bacteria.<sup>[13]</sup> However, the mechanism that is responsible for the antimicrobial activity of cinnamon includes its chemical composition such as Cinnamaldehyde,<sup>[6]</sup> which is an electronegative molecule that could interfere with the cellular biological process, particularly nitrogen-containing substances such as proteins and nucleic acids.<sup>[25]</sup> Furthermore, cinnamon EO has been reported to inhibit bacteria through antiquorum sensing effects; inhibiting cell division, ATPase, biofilm formation membrane porin, and mobility; altering the lipid profile<sup>[6]</sup> and thereby acting cell membrane producing lumps and autoaggregation.<sup>[12]</sup> These properties could conduct the reduction of bacterial susceptibility to antibiotics, decrease the dose of the antibiotic required for treatment, and therefore will decrease the toxic side effects of the drugs.<sup>[25]</sup> However, other studies are needed to explain the mechanism responsible for the antibacterial effect of the combination of cinnamon and antibiotics.

## CONCLUSION

The present study reported that the combinations between cinnamon EO and some classical antibiotics had synergistic and additive interactions against multidrug-resistant bacteria. These combinations can be used as an alternative

therapeutic application, which could decrease the minimum effective dose of the drugs, thus reducing their possible adverse effects and the costs of treatment.

## Acknowledgment

The authors would like to thank the Pasteur Institute of Casablanca, Morocco, for providing multidrug-resistant bacteria.

## Financial support and sponsorship

Nil.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Martelli G, Giacomini D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *Eur J Med Chem* 2018;158:91-105.
- World Health Organization. A Global Health Guardian: Climate Change, Air Pollution and Antimicrobial. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017.
- Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chem Rev* 2017;117:12415-74.
- Jalal Z, Elatki Y, Lyoussi B, Abdellaoui A. Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. Growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pac J Trop Biomed* 2015;6:1-4.
- Marwa C, Fikri-Benbrahim K, Ou-Yahia D, Farah A. African peppermint (*Mentha piperita*) from Morocco: Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil. *J Adv Pharm Technol Res* 2017;8:86-90.
- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb Pathog* 2018;120:198-203.
- Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food Chem Toxicol* 2010;48:3274-80.
- Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CA. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1650-61.
- Shi C, Zhang X, Zhao X, Meng R, Liu Z, Chen X, *et al.* Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Control* 2017;71:10-6.
- Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* 2008;124:91-7.
- Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol* 2008;116:403-6.
- Clemente I, Aznar M, Silva F, Nerin C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2016;36:26-33.
- Lu F, Ding YC, Ye XQ, Ding YT. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agr Sci China* 2011;10:1482-7.
- Utchariyakiat I, Surassmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. Efficacy of cinnamon bark oil and

- cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement Altern Med* 2016;16:158.
15. Yap PS, Lim SH, Hu CP, Yiap BC. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine* 2013;20:710-3.
  16. Mahadlek J, Charoenteeraboon J, Phaechamud T. Combination effects of the antimicrobial agents and cinnamon oil. *Adv Matr Res* 2012;506:246-9.
  17. Mello S, Bittencourt F, Fronza N, Cunha A, Neud G, Rosana C, *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 C. *LWT Food Sci Technol* 2014;59:86-93.
  18. Furtado GL, Medeiros AA. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of proteus mirabilis to chloramphenicol: Significance of the intermediate category. *J Clin Microbiol* 1980;12:550-3.
  19. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Ninth International Supplement. USA: National Committee for Clinical Laboratory Standard; 1999.
  20. Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Essent Oil Res* 1993;5:179-84.
  21. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth microdilution. In: Isenberg HD, editor. *Clin Microbiology Procedures Handbook*. Washington: American Society for Microbiology; 2003. p. 1-28.
  22. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Prot* 1995;58:280-3.
  23. Cheng SS, Liu JY, Hsui YR, Chang ST. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour Technol* 2006;97:306-12.
  24. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, *et al.* Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005;4:20.
  25. Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM, *et al.* Antibacterial activity of thymus maroccanus and thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection – Bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 2012;19:464-71.
  26. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 2007;14:727-32.

## Antioxidant activities, total phenol and flavonoid contents of two *Teucrium polium* subspecies extracts

Y. El Atki<sup>a\*</sup>, I. Aouam<sup>a</sup>, F. El kamari<sup>a</sup>, H. zejli<sup>a</sup>, A. Taroq<sup>a</sup>, B. Lyoussi<sup>a</sup>, M. Taleb<sup>b</sup>, A. Abdellaoui<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar Mehraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, B.P. 1796, Atlas, Fez, Morocco.

<sup>b</sup>Laboratory of Electrochemical Engineering, Modeling and Environmental, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

### Abstract

The soxhlet extracts of two subspecies from Moroccan *Teucrium polium* were examined for their antioxidant activities, total polyphenol and total flavonoids contents. The Antioxidant activities was evaluated *in vitro* spectrophotometrically using four methods, such as ABTS<sup>+</sup>, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), ferric reducing antioxidant power and phosphomolybdenum assay. Total polyphenol and flavonoid contents were measured using Folin-Ciocalteu test and aluminum chloride colorimetric method, respectively. The total phenol contents, flavonoids contents and antioxidant activities of *T. polium subsp. polium* extracts were higher than *T. polium subsp. aurum*. The phenols contents ranged from 112.27 to 4.38 mg GA E/ g dry extract. The total flavonoids varied between 174.57 and 40.42 mg RE/ g dry weight. The extract showed significant scavenging activity of ABTS<sup>+</sup> and DPPH<sup>•</sup>, with IC<sub>50</sub> values ranging from 0.38 to 5 mg/ml and from 0.23 to 4.02 mg/ml, respectively. Moreover all extracts showed a good ferric reducing antioxidant power with EC<sub>50</sub> values varying between 0.19 and 3.94 mg/ml. The total antioxidant capacity assay revealed that the water extract of *T. polium subsp. aurum* had a high activity with a value of 220 mg VitCE/g dry weight. The ethyl acetate extract has a weak antioxidant activity in the four tests. These results shows that Moroccan *T. polium* subspecies are a rich source of phenols and natural antioxidant compounds, which can be used as a natural food preservative.

\* Corresponding author:

[yassinelbs@gmail.com](mailto:yassinelbs@gmail.com)

Received 08 June 2019,

Revised 11 April 2020,

Accepted 12 April 2020.

**Keywords:** *T. polium*; phenolic compounds; flavonoids; antioxidant activity; DPPH

## 1. Introduction

Antioxidants are compounds that eliminate the oxidation of some molecules. Antioxidant activity has been based on neutralizing the oxidative damage resulting from the action of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) [1]. These species are mainly, produced in vivo following exposure to exogenous factors or for specific metabolic reasons [2]. Accumulation of these species ( ROS and RNS) lead them to react with biological macromolecules such as protein, lipids, nucleic acids and carbohydrates [3]. High levels of certain reactive species can contribute to cell damage and development of many pathologies [4]. Moreover, when a greater imbalance between the production of reactive species and antioxidant defense activity, oxidative stress develops [5]. This imbalance has been associated with numerous diseases [4, 6]. Medicinal plants are considered as an important source of active principles with high antioxidant potential. Polyphenols, usually referred to as antioxidant compounds, play a major role in the prevention and protection against many diseases [7]. The genus *Teucrium* (Lamiaceae family) includes 300 species distributed all over the world, particularly in the Mediterranean basin [8] . It usually develops on hillsides, sands, semi-arid and in arid places [9]. In Morocco folk medicine, Germander (*T. polium*) locally called "Jaada", it is used for the treatment of a variety of diseases, including digestive disorders, liver problems [10] inflammation, hypertension, fever, diabetes, rheumatism, parasitic diseases such as amoebicide [11]. Numerous studies showed therapeutic properties of some *Teucrium* species such as, anti-inflammatory, anti-cancer [12] antiulcer [13], and anti-allergic [14], antibacterial [15,16], antidiabetic, anti-spasmodic, anti-nociceptive [17] and antioxidant [18] effects. It was reported that the therapeutic ability of *T. polium* extracts are generally attributed to their proprieties to suppress oxidative processes [19]. It was also reported that the alcoholic extract of *T. polium* possess a suppressing effect on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in red blood cells [20]. However to our knowledge, no data is available on the antioxidant activity, total polyphenol and flavonoid contents of *T. polium subsp. aurum* species extracts. The objective of our study was to evaluate, the antioxidant activities of methanol, aqueous ethanol and ethyl acetate extracts of two *Teucrium polium* subspecies which grow in wild habitats in southeast of Morocco.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant samples and reagents

Aerial parts of two *Teucrium polium* subspecies were collected in april, 2015 from the regions of Errachidia (Morocco). Butylated hydroxytoluene (BHT), azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH), ammonium molybdate, aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>), sodium phosphate, quercetin, vitamin C, rutin, gallic acid, iron III chloride (FeCl<sub>3</sub>), potassium ferricyanide (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>), sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals and solvents used were of analytical grad.

### 2.2. Soxhlet extraction

The plant material was dried at room temperature and powdered (5 g) and extracted with 100 ml of solvent (water, methanol, ethanol and ethyl acetate) using a Soxhlet extractor. The extracts were filtered and to dryness under vacuum at 40°C using Rotary evaporator. The obtained extracts were kept in sterile sample tubes and stored in a refrigerator at 4°C.

### 2.3. Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and results were expressed as mean ± SD. The results were compared by one-way ANOVA followed by Tuckey-test, using the GraphPad Prism 5 (Microsoft Software). Differences at P < 0.05 were considered significant.

## 2.4. Determination of total phenolic content

Total phenolic content of the extracts was determined by Folin-Ciocalteu method [21]. The 0.5 mL of a known dilution of the extract and 2 ml of 7% sodium carbonate solution were added to 2.5 mL of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2H of reaction at room temperature in the dark. Gallic acid was used as standard for the construction of calibration curve. Total phenol contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram dry weight of extract (mg GAE/g DW).

## 2.5. Determination of total flavonoids contents

Flavonoids are considered as the most important natural phenols. They have a broad spectrum of biological and chemical effects including radical scavenging activities. Total flavonoids contents of *T. polium* subsp. *polium* extracts were measured by the aluminum chloride colorimetric assay [22]. 1 ml of sample or rutin standard solution was added into a 10 mL volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5% NaNO<sub>2</sub> was added, after five minutes 0.3 ml 10 % AlCl<sub>3</sub> was added to react for 6 min. After that, 2 ml of NaOH (1M) was added and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as a standard for the construction of calibration curve. Total flavonoids contents were expressed as mg Rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW).

## 2.6. In vitro antioxidant activities

### 2.6.1. ABTS radical scavenging activity

ABTS is a green colored radical, usually used to evaluate the antioxidant capacity of natural products. In the present study, ABTS<sup>•+</sup> radical was generated from oxidation of ABTS by potassium persulfate using the method described by Adedapo et al. [23]. The radical was prepared by mixing equal amounts of 7 mM ABTS and 2.4 mM potassium persulfate. These were later allowed to react for 12 h in the dark at room temperature. The resulting solution (1,5 ml) was further mixed with methanol to obtain an absorbance of 0.7 at 734 nm. Moreover, 1 ml of extract or standard prepared in methanol at different concentrations was added to 1 ml of the ABTS<sup>•+</sup> methanolic solution. The absorbance of was then measured spectrophotometrically at 734 nm after 7 min. The percentage ABTS scavenging activity of the extract or standard was calculated using the formula:

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

Where I (%) is the percentage of inhibition, Ac and As are the absorbencies of the negative control and sample, respectively. Trolox served as positive control. The IC<sub>50</sub> values were calculated as the concentration of causing a 50% inhibition of ABTS radical.

### 2.6.2. DPPH radical scavenging activity

DPPH is a stable radical, largely used to determine the antioxidant effect of natural and synthetic compounds. The ability of the extracts to scavenge the DPPH radical was measured using the method described by Wu, Chen [24]. 0.1 ml of various concentrations of each extract or standard was added to 1.5 ml of ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in dark. The percentage inhibition was calculated by the following the formula (1). BHT served as positive control. The IC<sub>50</sub> values were calculated as the concentration of causing a 50% inhibition of DPPH radical.

### 2.6.3. Ferric Reducing antioxidant power (FRAP)

The reducing power capacity of the tested extracts was determined in accordance with the procedure of Oyaizou [25]. 200 µl of extract was mixed with 500 µl of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 500 µl of potassium ferricyanide [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 1%. The obtained solution was incubated at 50°C for 20 min. The mixture was acidified with 500 µl of trichloroacetic acid (TCA) 10% which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500 µl of distilled water and 100 µl of FeCl<sub>3</sub> (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercitin was used as standard. The results were expressed as EC<sub>50</sub> (mg/ml). EC<sub>50</sub> (concentration corresponding 0.5 of absorbance) was calculated by plotting absorbance against the corresponding concentration.

### 2.6.4. Phosphomolybdenum assay

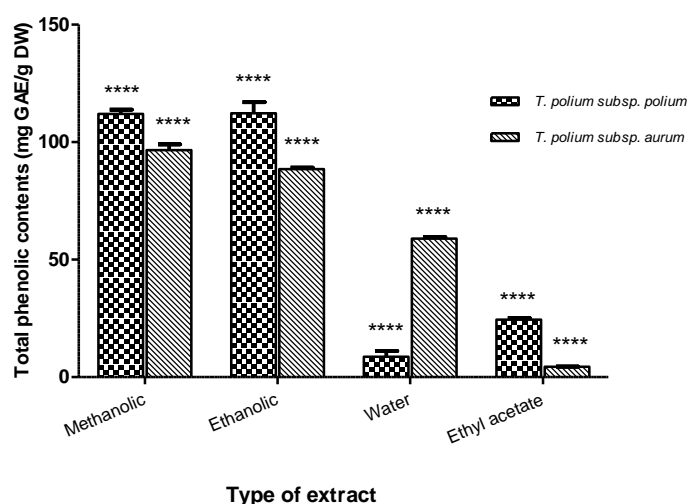
The assay was based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) and subsequent formation of a green phosphate Mo (V) complex in acid pH [26]. A total volume of 25 µL extract was added to 1 mL of reagent solution (0.6 mol/L sulphuric acid, 28 mmol/L sodium phosphate and 4 mmol/L ammonium molybdate). The mixtures were incubated at 95 °C for 90 min, and then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 695 nm (Jasco v-530). The total antioxidant activity was expressed as the number of equivalence of ascorbic acid (mg Vit C E/g DW).

## 3. Results

### 3.1. Total phenolic and flavonoids contents

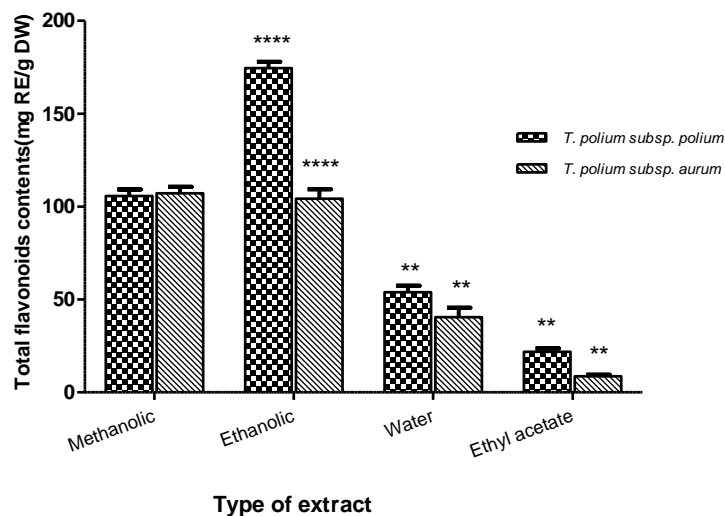
The distribution of phenolic compounds in *Teucrium polium* subspecies (figure 1) demonstrated that the ethanol and methanol extract from *T. polium subsp. polium* contained the highest amounts 112.27 ± 4.75 mg GAE / g dry weight and 112.04 ± 1.78 mg GAE / g dry weight of extract, respectively. The lowest phenolic content was observed in ethyl acetate *T. polium subsp. aurum* extract (4.38 ± 0.12 mg GAE / g DW) (Figure 1). In all extracts (except for water extract), the contents of phenolics were higher in *T. polium subsp. polium* than *T. polium subsp. aurum*.

Total flavonoid content was determined in comparison with rutin standard and the results were expressed in terms of mg RE/g dry weight extract..



**Figure 1.** Total phenolic compounds of different extracts from two *Teucrium polium* subspecies. Results were expressed as mg GAE/g dry weight. Each value represents means ± SD of three experiments. (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 and \*\*\*\*p < 0.0001).

As shown in figure 2, the total flavonoid content of two plants extracts ranged from 174.54 to 8.66 mg RE/g. The ethanol extracts of *T. polium subsp. polium* contained significantly a higher concentration of flavonoids ( $174.54 \pm 3.04$  mg of RE/g) than the other tested extract. Comparing the flavonoid concentration of *T. polium subsp. polium* and *T. polium subsp. aurum*, all extracts of *T. polium subsp. polium* (except water) had significantly greater concentration of flavonoids than *T. polium subsp. aurum* extract obtained using the same solvent



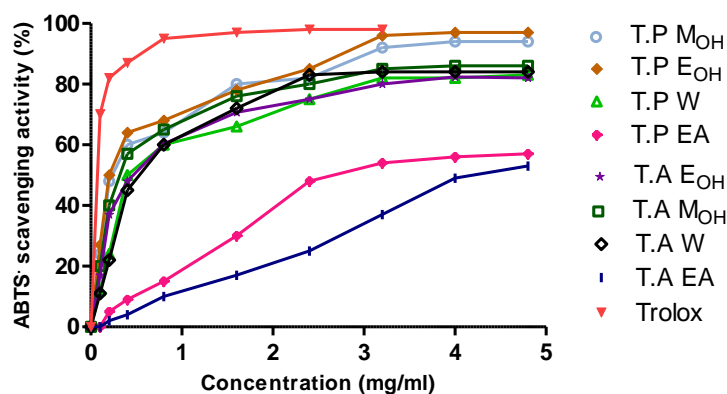
**Figure 2.** Total flavonoid content of different extracts from two *Teucrium polium* subspecies. Results were expressed as mg RE/g dry weight. Each value represents means  $\pm$  SD of three experiments. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 3.2. Antioxidant activities

The antioxidant activities of *Teucrium polium* extracts was investigated by ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>•</sup>, ferric reducing power, and total antioxidant capacity assays. All extracts showed a noticeable effect which varied significantly among species.

#### 3.2.1. ABTS radical scavenging activity

The ABTS<sup>+</sup> radical assay was generated by potassium persulfate in order to determine its hydrogen donating propriety of tested extracts. As depicted in figure 3, the both essential from *T. polium* subspecies extracts presented a potent antiradical effect in a concentration dependent manner. The concentrations of the tested samples (IC<sub>50</sub>), needed to remove 50% of the initial ABTS radical concentration, are calculated and presented in table 1. The IC<sub>50</sub> values of all tested extracts through ABTS scavenging activity test ranged from 0.23 to 4.02 mg/ml. The ethanolic and methanolic extracts of *T. polium subsp. polium* were more efficient in the reduction of ABTS<sup>+</sup> with IC<sub>50</sub> values of  $0.23 \pm 0.029$  and  $0.3 \pm 0.01$  mg/ml, respectively than all other extracts. Whereas lowest values were recorded with ethyl acetate extracts in the two subspecies. When compared to the pure reference antioxidant Trolox ( $0.01 \pm 0.002$  mg/ml), all the tested extracts showed a significantly lower antioxidant activity ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3:** Dose-dependent ABTS radical scavenging activity of the studied extracts. Each point represents the mean of three experiments. T.P: *T. polium subsp polium*; T.A: *T. polium subsp aurum*; M<sub>OH</sub>: methanol; E<sub>OH</sub>: ethanol; W: water; EA: ethyl acetate.

**Table 1.** ABTS radical scavenging activity (mg/ml) different extracts from two *Teucrium polium* subspecies compared to that of Trolox ( $IC_{50} = 0.01 \pm 0.002$ ). Values are given as mean  $\pm$  SD (n=3). The extracts of the same solvent and Rutin are significantly different by the Tuckey-test ( $P < 0.05$ )

Type of extract	Methanolic	Ethanolic	Water	Ethyl acetate
<i>T. polium subsp. polium</i>	$0.3 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.029$	$0.42 \pm 0.022$	$2.70 \pm 0.31$
<i>T. polium subsp. aurum</i>	$0.33 \pm 0.013$	$0.38 \pm 0.003$	$0.5 \pm 0.04$	$4.02 \pm 1.06$

### 3.2.2. DPPH radical scavenging activity

Free radical scavenging capacity were defined as the concentration of antioxidant necessary to reduce the initial DPPH radical concentration by 50% ( $IC_{50}$ ). The highest antioxidant activity was indicated by the lowest  $IC_{50}$  value. Results in table 2 shows DPPH radical scavenging activity of *Teucrium polium* and *Teucrium arum* extracts. In general, all extracts inhibited the DPPH radical as follows: methanol > ethanol > ethyl acetate. These results clearly indicate that *T. polium subsp. polium* extracts had higher activity than the *T. polium subsp. aurum* extract in comparison to the same solvent extracts. We found that, the methanol extract from *T. polium subsp. polium* had the greatest radical scavenging capacity in all samples tested with  $IC_{50}$  value of  $0.38 \pm 0.06$  mg/ml, followed by ethanol ( $0.39 \pm 0.04$  mg/ml) then water ( $0.49 \pm 0.01$  mg/ml) and ethyl acetate  $3.50 \pm 0.17$  mg/ml. With *T. polium subsp. aurum*, we found also that the methanol extract had the greatest capacity with an  $IC_{50}$  value of  $0.46 \pm 0.007$  mg/ml followed by water extract ( $0.49 \pm 0.01$ mg/ml), then ethanolic extract ( $0.51 \pm 0.04$  mg/ml). However, when compared to the pure reference antioxidant BHT ( $0.11 \pm 0.0001$ mg/ml), all the tested extracts showed a significantly lower antioxidant activity ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** DPPH radical scavenging activity (mg/ml) of different extracts from two *Teucrium polium* subspecies compared to that of BHT ( $IC_{50} = 0.118 \pm 0.0001$ ). Values are given as mean  $\pm$  SD (n=3). The extracts of the same solvent and BHT are significantly different by the Tuckey-test ( $P < 0.05$ )

Type of extract	Methanolic	Ethanolic	Water	Ethyl acetate
<i>T. polium subsp. polium</i>	$0.388 \pm 0.06$	$0.397 \pm 0.042$	$0.459 \pm 0.012$	$3.502 \pm 0.179$
<i>T. polium subsp. aurum</i>	$0.469 \pm 0.007$	$0.512 \pm 0.046$	$0.491 \pm 0.011$	$5.003 \pm 0.921$

### 3.2.3. Ferric reducing antioxidant power

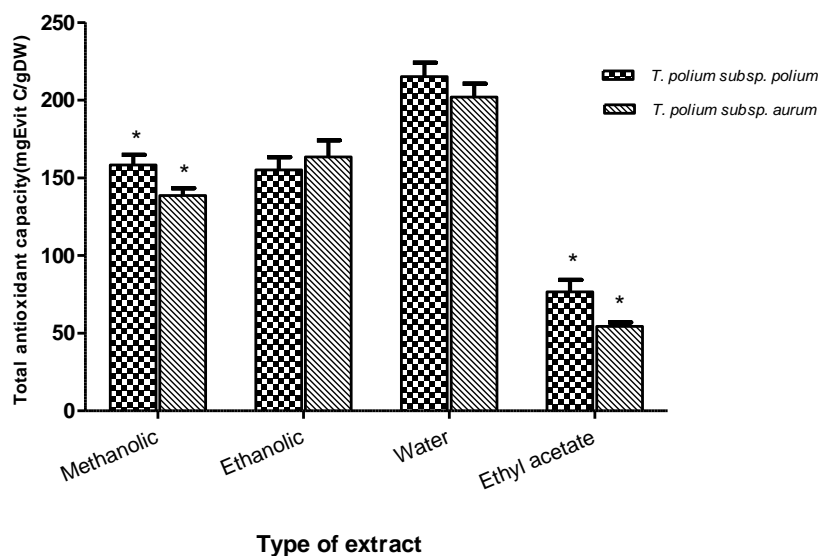
The reducing power of investigated extracts were evaluated by the FRAP assay. The reductive capacity is generally associated with the presence of antioxidant agents which exert its effect by breaking the free radical chains via hydrogen atom donation [27]. Therefore, the reducing power assay is often used to evaluate the ability of extracts to transform the  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$ , this capacity is compared to that of quercetin. The results in table 3 showed that the methanolic extract of *T. polium subsp. aurum* had the strongest ferric reducing power than all other extracts with an  $EC_{50}$  value of  $0.193 \pm 0.006$  mg/ml but this was still significantly ( $p < 0.05$ ) lower than that of the synthetic antioxidant quercetin (0.033 mg/ml). The ethyl acetate from *T. polium subsp. aurum* possessed a lowest ferric reducing power with an  $EC_{50}$  value of  $3.947 \pm 0.15$  mg/ml.

**Table 3.** Ferric reducing power capacity (mg/ml) of two *Teucrium polium* subspecies compared to that of quercetin ( $EC_{50}=0.033 \pm 0.0004$ ). Values are giving as mean  $\pm$  SD (n=3). The extracts of same solvent and quercetin are significantly different by the tuckey-test ( $P<0.05$ ).

Type of extract	Methanolic	Ethanolic	Water	Ethyl acetate
<i>T. polium subsp. polium</i>	$0.319 \pm 0.012$	$0.395 \pm 0.011$	$0.456 \pm 0.011$	$3.293 \pm 0.059$
<i>T. polium subsp. aurum</i>	$0.193 \pm 0.006$	$0.381 \pm 0.009$	$0.588 \pm 0.031$	$3.947 \pm 0.15$

### 3.2.4. Phosphomolybdenum assay

Total antioxidant capacity of investigated both *T. polium* subspecies extracts were determined by the phosphomolybdenum method which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the antioxidant compounds and the subsequent formation of a green phosphate Mo (V) complex at acidic pH [26]. The found results, expressed as ascorbic acid equivalents (vit C E) are presented in Figure 4. They revealed that the most solvent extraction of antioxidant capacity was water and the highest level of antioxidant capacity was found in water extract from *T. polium subsp. aurum* with 220 mg ascorbic acid equivalent to /g dry weight. In methanol and ethyl acetate extracts, the antioxidant capacity was significantly higher in *T. polium subsp. polium* than *T. polium subsp. aurum*.



**Figure 4.** Total antioxidant capacity of different extracts from two *Teucrium polium* subspecies. Results were expressed as mg vit C E/g dry weight. Each value represents means  $\pm$  SD of tree experiments. (\* $p < 0.05$ ).

## 5. Discussion

The antioxidant activities has been evaluated using four different methods based on various mechanisms of action. It is important to use numerous tests to take in consideration the chemical composition of extract which act through different mechanisms. The present study is the first to demonstrate that extracts, obtained by Soxhlet, from *T. polium subsp. aurum* and *T. polium subsp. polium* from Morocco had a good antioxidant effects. However, there are some studies have determined the antioxidant activity of *T. polium* but they did not specify its subspecies. Based on the results of selected *T. polium* from Serbiae [28], the authors found that the highest total phenolic concentration of different parts of this plant is noticed with the methanol extract of leaves (157.84 mg of GA/g dry weight). Similarly, our study revealed also that methanol extract of *T. polium subsp. polium* contained the highest total phenolic content (112.27 mg GAE / g DW (figure 1). Methanol is therefore the best solvent to extract phenolic compounds from medicinal plants. In our study the total flavonoids content results obtained are higher than the results reported by Tepe et al [29]. According to another study, the flavonoids content values ranged from 6.48 to 139.87 mg RE/g in the leaves, flowers and stem from *T. polium subsp. polium* extracts with the acetone extract giving a high amount of flavonoids [28]. Like polyphenols, flavonoids have been confirmed to have a strong antioxidant activity [30,31]. In the other hand, Chemical studies on the Teucrium genus revealed the presence of flavonoids, saponins, polyphenols, sterols and tannins [32]. The *T. polium* specie contains essential oils, iridoids, flavonoids and diterpenoids [12].

The ABTS<sup>•+</sup> radical assay was generated by potassium persulfate in order to determine its hydrogen donating propriety. In this study, both *T. polium* subsp. extracts scavenged ABTS<sup>•+</sup> radical in a concentration dependent-manner. The high percentage of ABTS scavenging activity founded in this study can be attributed to a high content of phenolic compounds, which is similar to the results reported in previous studies [4]. An antioxidant agent is considered to be active against free radicals if IC<sub>50</sub> is less than 5 mg/ml [33]. All the extracts studied have IC<sub>50</sub> less than 5 mg/ml, therefore all tested extracts are a possible good source of antioxidants compounds. In addition, extracts with high scavenging activity should have a low IC<sub>50</sub> value. Previous studies demonstrated that extracts of Teucrium plants have strong antioxidant activity [15,34]. Extracts of *Teucrium polium* showed significant free radical scavenging [18,35]. Methanolic extract of *T. polium* exhibited an IC<sub>50</sub> value of 20.1µg/ml [35], which is below that found in our study. Other study found that the IC<sub>50</sub> values of *Teucrium polium* extracts were ranging between 14.50 and 238.25 µg/ml and the highest activity noticed with polar solvents extracts [28]. These observed differences could be attributed to the different extraction types used. In addition, extracts with high reducing power should have a low EC<sub>50</sub> value. Previous published papers demonstrated that Teucrium genus possess a high reducing power [36]. In this study we found that methanolic extract of *T. polium subsp. aurum* showed the highest reducing power propriety. Several studies reported the reducing power of the extracts of *T. polium* and that its activity increased with concentration [29,37]. The phosphomolybdenum assay of is often used as an indicator of antioxidant capacity for plant extracts. According to a study performed by Ljubuncic et al. [38], the aqueous extract of *T. polium* had a substantial antioxidant activity *in vitro*. A previous *in vivo* study reported that rats treated with a *T. polium subsp. polium* ethanolic extract showed significant antioxidant activity in the DPPH test compared to the positive control  $\alpha$ -tocopherol [39]. Acoording to our previous study[18], the ethanolic, mathanolic and water extracts of *T. polium* obtained by the maceration technique showed a good antioxidant potential but it's low than that founded in this work. Moreover, the free radical scavenging activity of the extracts, in our case, could be attributed to the phenolic content. According to the literature phenol compounds can contribute to the antioxidant potent [40,41] and they are considered as anti-cancer, anti-inflammatory, antiviral, and anti-bacterial agents due to their antioxidant and free radical scavenging properties [42].

## 6. Conclusion

In this study, the extracts of aerial parts of two Moroccan *Teucrium polium* subspecies (*T. polium subsp. polium* and *T. polium subsp. aurum*), were investigated and compared for their, antioxidant activities and total polyphenol and flavonoid contents. Considerable antioxidant activity of methanolic extracts of the two subspecies showed that *T. polium subsp. polium* has the greatest antioxidant properties and the highest level of total phenols and flavonoids content. The highest antioxidant propriety is noticed with polar solvents extracts. The Germander (*T. polium*) is a rich source of phenols and natural antioxidant compounds which can be used as a natural food preservative. Our results on antioxidant tests justified it uses in folk medicine.

## References

- [1] S. D. Meo, T. T. Reed, P. Venditti, V. M. Victor, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, (2016).
- [2] G.M. Saed, M.P. Diamond, N.M. Fletcher, *Oncol.*, 145 (2017) 595–602.
- [3] P.S. Tabatabaie, R. Yazdanparast, *Biomed. Pharmacother.*, 93 (2017) 1033–1039.
- [4] L. Gali, F. Bedjou, *Sth African J Botany* 120 (2019) 163–169.
- [5] J.M. McCord, *Am. J. Med.*, 108 (2000) 652–659.
- [7] I.J. Sagbo, A.J. Afolayan, G. Bradley, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 7 (2017) 817–825.
- [8] N. Djabou, V. Lorenzi, E. Guinoiseau, S. Andreani, M.C. Giuliani, J.M. Desjobert, J.M. Bolla, J. Costa, L. Berti, A. Luciani, A. Muselli, *Food Control.*, 30 (2013) 354–363.
- [9] A.G. and F.A. Al-Ghamdi, *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*, 5 (2014) 128–135.
- [10] J. Fakchich, M. Elachouri, *J. Ethnopharmacol.*, 154 (2014) 76–87.
- [11] H. Henchiri, B. Bodo, A. Deville, L. Dubost, L. Zourgui, A. Raies, P. Grellier, L. Mambu, *Phytochemistry.*, 70 (2009) 1435–41.
- [12] F. Menichini, F. Conforti, D. Rigano, C. Formisano, F. Piozzi, F. Senatore, *Food Chem.*, 115 (2009) 679–686.
- [13] B. Fernández Puntero, I. Iglesias Peinado, A.M. Villar Del Fresno, *J. Ethnopharmacol.*, 55 (1997) 93–98.
- [14] V.M. Chandrashekar, K.S. Halagali, R.B. Nidavani, M.H. Shalavadi, B.S. Biradar, D. Biswas, I.S. Muchchandi, *J. Ethnopharmacol.*, 137 (2011) 336–340.
- [15] M.S. Stanković, Z.S. Radić, J. Blanco-Salas, F.M. Vázquez-Pardo, T. Ruiz-Téllez, *Ind. Crops Prod.*, 95 (2017) 493–501.
- [16] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, B. Lyoussi, B. Oumokhtar, A. Abdellaoui, *Arabian Journal of Chemistry*, (2019) [doi: 10.1016/j.arabjc.2019.04.001](https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2019.04.001).
- [17] H. Parsaee, R. Shafiee-nick, *Iran. Biomed. J.*, 9 (2006) 145–149.
- [18] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, *Int J Pharm Sci & Res.*, 10 (2019) 1000–1007.
- [19] S. Shtukmaster, P. Ljubuncic, A. Bomzon, *Adv. Pharmacol. Sci.*, 8 (2010) 1–7.
- [20] S.M. Suboh, Y.Y. Bilot, T.A. Aburjai, *Phyther. Res.*, 18 (2004) 280–284.
- [21] K. Slinkard, V.L. Singleton, *Am. J. Enol. Vitic.*, 28 (1977).
- [22] M.T. Zhishen, J. J. W, *Food Chem.*, 64 (1999) 555–559.
- [23] A. A. Adedapo, F.O Jimoh, A.J Afolayan, P.J Masika, *BMC Complement Altern Med* 8(2008) 54-60
- [24] H.C. Wu, H.-M. Chen, C.-Y. Shiau, *Food Res. Int.*, 36 (2003) 949–957.
- [25] M. Oyaizu, *Studies on products of browning reaction, Japanese J. Nutr. Diet.*, 44 (1986) 307–315.
- [26] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, *Anal. Biochem.* 269 (1999) 337–341.
- [27] A. Brantner, *Molecules.*, (2010) 5971–5987.

- [28] M.S. Stankovic, N. Niciforovic, V. Mihailovic, M. Topuzovic, S. Solujic, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 81 (2012) 117–122.
- [29] B. Tepe, S. Degerli, S. Arslan, E. Malatyali, C. Sarikurkcu, *Fitoterapia.*, 82 (2011) 237–46.
- [30] K. Chigayo, P.E.L. Mojapelo, S. Mnyakeni-Moleele, J.M. Misihairabgwi, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 6 (2016) 1037–1043.
- [31] S. Rakass, H.A.A. Babiker, H. Oudghiri-hassani, *Mor. J. Chem.*, 2 (2018) 218–226.
- [32] G. Rahim, R. Qureshi, M. Arshad, M. Gulfraz, *Int. J. Agric. Biol.*, 11 (2013) 377–381.
- [33] S. Abdillah, R.M. Tambunan, Y. Farida, N.M.D. Sandhiutami, R.M. Dewi, *Asian Pacific J. Trop.*, 5 (2015) 454–457.
- [34] T. Kadifkova Panovska, S. Kulevanova, M. Stefova, *Acta Pharm.* 55 (2005) 207–214.
- [35] F. Sharififar, G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini, *Food Chem.*, 112 (2009) 885–888.
- [36] S. De Marino, C. Festa, F. Zollo, F. Incollingo, G. Raimo, G. Evangelista, M. Iorizzi, *Food Chem.*, 133 (2012) 21–28.
- [37] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A.Taroq, B. Lyoussi, M. Taleb, A. Abdellaoui, *Matertoday Procd.*, 13 (2019) 777-783.
- [38] P. Ljubuncic, S. Dakwar, I. Portnaya, U. Cogan, H. Azaizeh, A. Bomzon, *Alternat. Med.*, 3 (2006) 329–338.
- [39] P. Hasani, N. Yasa, S. Vosough-Ghanbari, A. Mohammadirad, G. Dehghan, M. Abdollahi *Acta Pharm.* 57(2007) 123-129.
- [40] I. Aouam, Y. El Atki, A. Taroq, F. El Kamari, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, *J. Pharm. Sci. & Res.*, 10 (2018) 2689-2692
- [41] A. Taroq, F. El Kamari, I. Aouam, Y. El Atki, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, *Asian J Pharm Clin Res.*, 11 (2018) 540-543
- [42] M. S. Meskin, W. R. Bidlack, R. Keith Randolph, Taylor Francis Group., (2008) 83-101.

# Antibacterial Effect of Combination of Cinnamon Essential Oil and Thymol, Carvacrol, Eugenol, or Geraniol

## Abstract

Bacterial resistance to classic antibiotics is an alarming rate to put this into control with the use of natural products of plant derivatives. The objective of this study was to determine the phytochemical of cinnamon essential oil (EO) and to evaluate its antibacterial activity alone and in combination with some main components of EOs such as thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol against three bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*). The phytochemical analysis of cinnamon EO was evaluated using gas chromatography-flame ionization detector and gas chromatography-mass spectrometer analysis. The antibacterial activity of tested compounds was determined by agar disk diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) assays. The checkerboard method was used to quantify the efficacy of cinnamon EO in combination with those compounds. The results showed that the major compound in the cinnamon EO was trans-cinnamaldehyde (91.01%). Cinnamon oil was the highest antibacterial activity with MIC of 0.005, 0.005, and 0.02 mg/mL against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, respectively. Synergistic activity was shown only against *S. aureus* by the combination of cinnamon EO and thymol. The additive effect was found against *E. coli* when cinnamon EO was combined with thymol or carvacrol, and against *S. aureus* when cinnamon EO was combined with carvacrol. However, the combination of EO and thymol or carvacrol showed an indifference action against *P. aeruginosa*. The combination of cinnamon EO with thymol or carvacrol can be used as an alternative therapeutic agent for medical application and as a natural preservative.

**Keywords:** Antibacterial activity, cinnamon, combination, gas chromatography-mass spectrometer analysis

## Introduction

Antibacterial resistance is widely known as a dangerous level in all parts of the world.<sup>[1]</sup> Overuse and misuse of antibiotics in clinical context are extensively considered as major pathways of promoting antibiotic resistance. Other nonclinical large-scale uses of antibiotics in aquaculture, livestock, and poultry farms have strongly contributed to antibiotic contaminations with development of pathogenic bacterial resistance.<sup>[2]</sup> The discovery of new antibacterial agents is mainly based on natural products that can be obtained from different sources, including plants, animals, algae, fungi, and bacteria, but there has been a growing interest in bioactive compounds provided by the plant as an alternative to the common antibiotic.<sup>[3]</sup> Essential oils (EOs) account for a source of very promising natural compounds for producing new antibacterial drugs. Numerous studies have reported a strong antibacterial

effect of EOs.<sup>[4-7]</sup> Among these oils, the potential antibacterial of cinnamon has been documented frequently.<sup>[8-11]</sup>

Furthermore, the combinations, either single EO or mixtures of purified main components (MCs), would assure the exhibition of the target bacteria to many chemical compounds and usually lead to better activity.<sup>[12]</sup> Combining different EO has been recently studied in a view to increasing their antibacterial effects without increasing their concentrations.<sup>[13-15]</sup> It was argued that the combined treatment with cinnamon and some plants EOs showed an additive effect against bacterial species as compared with their pure EOs.<sup>[15,16]</sup> The combination of cinnamon and mustard EOs possesses an additive effect against some food-borne bacteria.<sup>[15]</sup> In another study, cinnamon oil combined with thyme or clove displayed an additive antibacterial effect.<sup>[16]</sup> An important synergistic effect of some antibiotics and cinnamon against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was proved.<sup>[17]</sup> On the

**Yassine El Atki<sup>1</sup>,  
Imane Aouam<sup>1</sup>,  
Amal Taroq<sup>1</sup>,  
Fatima El Kamari<sup>1</sup>,  
Mohammed  
Timinouni<sup>2</sup>,  
Badiaa Lyoussi<sup>1</sup>,  
Abdelfattah  
Abdellaoui<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biology, Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco, <sup>2</sup>Molecular Bacteriology Laboratory, Pasteur Institute of Morocco, Casablanca

**Received:** 18 Mar 2019

**Accepted:** 06 Oct 2019

**Published:** 26 Jun 2020

### Address for correspondence:

Mr. Yassine El Atki,  
Department of Biology,  
Laboratory of Physiology  
Pharmacology and  
Environmental Health, Faculty  
of Sciences Dhar El Mehraz,  
Sidi Mohamed Ben Abdellah  
University, Fez, Morocco.  
E-mail: yassinelbs@gmail.com

### Access this article online

Website:  
www.jrpsjournal.com

DOI:10.4103/jrtps.JRPTPS\_25\_19

### Quick Response Code:



**How to cite this article:** El Atki Y, Aouam I, Taroq A, El Kamari F, Timinouni M, Lyoussi B, et al. Antibacterial effect of combination of cinnamon essential oil and thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol. J Rep Pharm Sci 2020;9:104-9.

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

**For reprints contact:** reprints@medknow.com

contrary, the antibacterial propriety of the MCs of EOs, including thymol, carvacrol, and eugenol, largely studied, and it has been proved to be a strong antimicrobial.<sup>[18-20]</sup> Although the antibacterial mechanism of EOs and their constituents is not fully understood, recent studies have shown that constituents with a phenolic structure, such as thymol carvacrol and eugenol, have the greatest bactericidal activities, followed by aldehydes, ketones, alcohols, ethers, and hydrocarbons.<sup>[1,18,19]</sup> However, to the best of our knowledge, there are no available data about the antibacterial effect of cinnamon EO combined with the main monoterpenes of EOs such as thymol, carvacrol, eugenol, and geraniol, which are frequently absent in cinnamon EO. The aim of this study was to search the possible synergistic antibacterial effect of cinnamon EO associated with certain compounds such as thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol against *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## Materials and Methods

### Essential oil extraction

The barks of *Cinnamomum cassia* (cinnamon) were purchased from a local supermarket in Fez (Morocco). Identification was confirmed by professor Amina Bari, a botanist at the Department of Biological Sciences, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Morocco. A powder of 200 g cinnamon were hydro-distilled for 3 h with 700 mL of water using a modified Clevenger-type apparatus: the hydrosol was collected in a separating flask, so that the heavy oil was decanted at the bottom of the flask, whereas the water of the hydrosol was recycled into the flask containing the boiling powder plant. The obtained EO was stored at 4°C before analysis.

### Chemical analysis of the essential oils

#### Gas chromatography-flame ionization detector

The cinnamon EO was diluted in hexane and 1 µL of diluted EO was sampled for the gas chromatographic analysis. Trace gas chromatograph (GC) (ULTRA S/N 20062969, Thermo Fischer, Waltham, USA), the GC (TRACE GC-ULTRA, S/N 20062969, Thermo-Fischer) analysis equipped with flame ionisation detector (GC-FID), using an HP-5MS nonpolar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, film thickness 0.25 µm). The operating conditions were as follows: oven temperature program from 50 °C (2 min) to 280 °C at 5 °C/min and the final temperature kept for 10 min; “split mode” ratio 1:20; carrier gas nitrogen, flow rate 1 mL/min; temperature of detector (flame ionization detector) and injector were fixed at 280 °C and 250 °C, respectively.

#### Gas chromatography-mass spectrometry analysis

The cinnamon EO was analyzed by a capillary GC (Thermo Fischer) directly coupled to the mass spectrometer system (model GC ULTRA S/N 20062969; Polaris QS/N 2107, Thermo-Fischer; Waltham, USA), involving an HP-5MS apolar fused silica capillary column (60 m × 0.32 mm, 0.25 µm film thickness). The operating condition of GC-MS oven

temperature was as follows: initial temperature 40°C for 2 min, programmed rate 2°C per min up to final temperature 260°C with isotherm for 10 min; injector temperature 250°C. The carrier gas was the helium with a flow rate of 1 mL/min. The EO sample was diluted in hexane. The injected specimen volume was 1 µL of diluted EO; systems were operated with a split ratio of 1:15. Ionisation of the sample components was performed in electron impact mode (EI, 70 eV). The ion source temperature was fixed to 200°C. The mass range from 40–650 amu, was scanned at a rate of 2.9 scans/s and Transfer line temperature was 300°C. The characterization of the components was determined by their retention indices (RI) relative to those homologous *n*-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>20</sub>) series (Fluka, Buchs/sg, Switzerland) and by matching their recorded mass spectra with those stored in the database of spectrometer (NIST MS Library v. 2.0) and the bibliography.<sup>[21]</sup>

### Bacterial strains and inoculums standardization

In this study, the antibacterial activity of cinnamon oil, alone and in combination with some MCs of EOs such as thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), was tested against three bacterial strains: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *P. aeruginosa* ATCC 27853, which was provided by the Pasteur Institute of Casablanca (Morocco). The inoculum suspension was obtained by taking colonies from 24-h cultures. The colonies were suspended in sterile 0.9% aqueous solution of NaCl. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland standard (1–5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL).<sup>[20,21]</sup>

### Agar disk-diffusion assay

The agar disk-diffusion assay was determined in triplicate according to the Kirby–Bauer experiment<sup>[23]</sup>; the suspensions of microorganisms (1–5 10<sup>8</sup> CFU/mL) were flood inoculated on to the surface of Mueller–Hinton (MH) agar plates. Sterile filter disks of 6 mm diameter (Whatman Paper No. 3) were impregnated with 10 µg/disk of the compound and were put on to the surface of the inoculated MH agar. All plates were incubated for 18 h at 37°C. Antibacterial effect was evaluated by measuring the inhibition zones.

### Determination of the minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using a microdilution assay in 96-well microtiter plates according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).<sup>[24]</sup> In fact, different concentrations of cinnamon EO and MCs were prepared in a suspension containing 0.2% agar in sterile distilled water in order to disperse the compounds without adding solvent or detergent.<sup>[25]</sup> They were carried out by successive dilutions 1/2 ranging from 1.25 to 0.002 mg/mL for EO, thymol, and carvacrol and from 25 to 0.04 mg/mL for eugenol and geraniol. Bacterial suspensions were prepared in the same manner described previously and plated in 96-well plates at a density of 1–5 × 10<sup>6</sup> CFU/mL. Cinnamon EO or MCs were added at different concentrations at the corresponding wells in microtiter plates. Finally, all plates were incubated during 18 h at 37°C; bacterial

proliferation was visually by adding to each well 20  $\mu\text{L}$  of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) aqueous solution (1%), with additional incubation for 1 h. MIC was the lowest concentration that does not produce red color.<sup>[22]</sup>

### Checkerboard method

The evaluation of the interaction between cinnamon EO and MCs (thymol, carvacrol, eugenol, or geraniol) was carried out according to the method of Moody.<sup>[26]</sup> Briefly, ten concentrations of cinnamon EO and eight concentrations of the MCs were prepared in sterile tubes by dilutions 1/2. EO at decreasing concentrations, going from MIC  $\times$  4 to MIC/128, was introduced horizontally into 96-well microtiter plates. In the same manner, the MCs at decreasing concentrations, going from MIC  $\times$  4 to MIC/32, were introduced vertically. The final volume in each well was 200  $\mu\text{L}$  comprising 25  $\mu\text{L}$  of EO, 25  $\mu\text{L}$  of MC dilution, and 150  $\mu\text{L}$  of MH media containing  $1-5 \times 10^6$  CFU/mL of bacterial suspensions. All plates were then incubated during 18 h at 37 °C. The analysis of the combination was obtained by calculating the fraction inhibitory concentration index (FICI) using the following formula<sup>[26]</sup>:

$$\text{FIC index(FICI)} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B$$

$$\text{FIC}_A = \frac{\text{MIC of(A) in combination}}{\text{MIC of(A) alone}}$$

$$\text{FIC}_B = \frac{\text{MIC of(B) in combination}}{\text{MIC of(B) alone}}$$

where (A) is cinnamon EO and (B) is one of the MCs.

The FICI values were interpreted as follows: a synergistic effect when  $\text{FICI} \leq 0.5$ ; an additive effect when  $0.5 < \text{FICI} < 1$ ; an indifferent (no interaction) when  $1 < \text{FICI} < 4$ ; and an antagonistic effect when  $\text{FICI} > 4$ .

## Results

### Essential oil composition

The yield of the EO of cinnamon was 1.26% (v/w, dark yellow) calculated on a dry weight basis. The GC–MS analysis of EO is presented in Table 1. Eleven components were identified comprising 98.44% of the total amount. Trans-cinnamaldehyde was found as the single major component (91.01%). The other component's insignificant percent were as follows: cis-cinnamyle acetate (2.04%), linalool (1.3%), caryophyllene oxide (1.06%),  $\gamma$ -terpinene (1.03%), and  $\delta$ -cadinene (0.9%) [Table 1].

### Antibacterial activity

The antibacterial activity of the cinnamon EO, thymol, carvacrol, eugenol, and geraniol, tested against three bacterial strains (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, and *P. aeruginosa* ATCC 27853), is shown in Table 2. Cinnamon EO was the strongest antibacterial effect against all strains tested:

*E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*, with the MIC values of 0.005, 0.005, and 0.02 mg/mL, respectively. In addition, *E. coli* and *S. aureus* were sensitive to the thymol and carvacrol (MIC: 0.072 and 0.31 mg/mL, respectively) and were resistant to eugenol and geraniol. *Pseudomonas aeruginosa* was relatively resistant to all MCs tested.

### Combined effects of cinnamon essential oil and main components

Synergistic interactions between different plant extracts are the aim of the herbal formulation in folk medicine.<sup>[27]</sup> The interaction of plant with MCs of EOs is one of the novel ways to inhibit the resistance mechanisms of bacteria. In this study, the combined antibacterial effect of cinnamon oil was evaluated by the checkerboard method, in order to determine the fractional inhibitory concentration (FIC). Table 3 shows the cinnamon EO tested against three bacterial strains in combination with some MCs. FICI were calculated and interpreted as synergy, addition, indifference, or antagonism. As shown in Table 3, mixing MCs with cinnamon EO reduces the MICs, 2-fold for *P. aeruginosa* and 2–8-fold for *E. coli* and *S. aureus*. The synergistic activity was obtained only by the combination of cinnamon EO and thymol against *S. aureus*, with the FICI value of 0.5. In addition, the combination of cinnamon oil with thymol showed an additive effect against *E. coli* with the FICI of 0.75. An additive effect was also found when cinnamon oil was combined with carvacrol against *E. coli* and *S. aureus* with the FICI of 1 and 0.625, respectively, whereas the combination of cinnamon with thymol or carvacrol showed an indifferent effect against *P. aeruginosa*. However, the combination of cinnamon EO and eugenol or geraniol displayed an antagonism action against all bacteria tested [Table 3].

## Discussion

Eleven components were identified in EO of cinnamon bark. Trans-cinnamaldehyde was found as its single major component (91.01%). Several studies on the chemical composition of cinnamon EO were reported and showed that trans-cinnamaldehyde was the single major compound.<sup>[10,11,16]</sup> Simic et al.<sup>[28]</sup> reported

**Table 1: Chemical composition of cinnamon bark essential oil**

Compounds	Kovats index	Area (%)
$\alpha$ -Pinene	909	<0.1
$\gamma$ -Terpinene	924	1.03
Limonene	1027	0.2
1,8-Cineole	1031	<0.1
Linalool	1116	1.3
Trans-Cinnamaldehyde	1277	<b>91.01</b>
Cis-Cinnamyle acetate	1291	2.04
Caryophyllene oxide	1321	1.06
$\alpha$ -Copaene	1375	0.5
$\delta$ -Cadinene	1534	0.9
Benzyl benzoate	1660	0.4
Totale	–	98.44

**Table 2: Antibacterial activity of cinnamon EO, thymol, carvacrol, eugenol, and geraniol**

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	
	ID	MIC	ID	MIC	ID	MIC
Cinnamon EO and main components						
EO	29.0 ± 0.7	0.005	40.0 ± 0.0	0.005	30.5 ± 1.0	0.02
Thymol	41.2 ± 0.0	0.078	42.3 ± 0.1	0.078	12.2 ± 0.3	0.04
Carvacrol	39.6 ± 0.3	0.156	38.6 ± 0.4	0.315	10.0 ± 0.0	0.625
Eugenol	14.0 ± 0.5	>5	16.1 ± 0.5	>5	8.0 ± 0.2	Nt
Geraniol	18.1 ± 0.2	>5	18.0 ± 1.0	>5	Ni	Nt

ID = inhibition zone diameter (mm), MIC = minimal inhibitory concentrations (mg/mL), Nt = not tested, Ni = no inhibition

Inhibition zone includes diameter of disk (6 mm)

Values of inhibition diameter are given as mean ± SD

**Table 3: FIC and FICI values of the combinations**

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
	MIC alone	MIC combined	FIC	FICI	MIC alone	MIC combined	FIC	FICI	MIC alone	MIC combined	FIC	FICI
EO+thymol												
EO	0.005	0.002	0.5	0.75(A)	0.005	0.001	0.25	0.5(S)	0.02	0.02	1	1.5(I)
Thymol	0.078	0.020	0.25		0.078	0.02	0.25		0.039	0.02	0.5	
EO+carvacrol												
EO	0.005	0.002	0.50	1.0(A)	0.005	0.002	0.5	0.625(A)	0.02	0.039	2	2.5(I)
Carvacrol	0.156	0.078	0.50		0.312	0.039	0.125		0.625	0.313	0.5	
EO+eugenol												
EO	0.005	0.02	4.00	4.12(At)	0.005	0.020	4.00	4.063(At)	0.02	0.08	4	6 (At)
Eugenol	25	3.125	0.12		25.000	1.563	0.063		200	100	2	
EO+geraniol												
EO	0.005	0.020	4.00	4.12(At)	0.005	0.020	4.000	4.125 (At)	Nt	Nt	-	-
Geraniol	12.5	1.563	0.12		12.500	1.563	0.125					

EO = cinnamon essential oils, S = synergy, Ad = addition, I = indifference, At = antagonism, Nt = not tested

trans-cinnamaldehyde (62.8%) and cinnamaldehyde propylene (5.5%) as the major compounds from cinnamon (*C. zeylanicum*) volatile oil. Marongino *et al.*<sup>[29]</sup> found that the MCs of cinnamon (*C. zeylanicum*) were trans-cinnamaldehyde (77.1%), trans-β-caryophyllene (6.0%), and α-terpineol (4.4%).

Concerning the antibacterial effect, our results are higher than that described by Clemente *et al.*,<sup>[15]</sup> who found that cinnamon EO inhibits the growth of *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa* at MIC values of 0.4, 0.4, and 0.2 mg/mL, respectively. They are in accordance with the data reported by Gallucci *et al.*<sup>[30]</sup> *Escherichia coli* and *S. aureus* are sensitive to thymol and carvacrol (MIC: 15.07, 7.53, 7.62, and 3.82 mg/mL, respectively), and resistant to eugenol and geraniol (MIC > 20 mg/mL). Pei *et al.*<sup>[31]</sup> revealed that *E. coli* growth was inhibited by thymol, carvacrol, and eugenol at MIC values of 1.6, 0.4, and 0.4 mg/mL, respectively. In a study conducted by Miladi *et al.*,<sup>[32]</sup> carvacrol had better activity against *S. aureus* (MIC: 64 mg/mL) and thymol and eugenol at MIC values of 256 mg/mL. In addition, the sensitivity of *P. aeruginosa* to cinnamon EO is probably attributed to the combined effects of several compounds constituting this EO, acting on various cell targets. Bouhdid *et al.*<sup>[33]</sup> showed that cinnamon EO damages the cell membrane of *P. aeruginosa*, which leads to cell death.

According to the previous studies, the high antibacterial activity observed with cinnamon EO may be because of the action of trans-cinnamaldehyde, which is considered as its single major compound.<sup>[9-11]</sup> It has been reported that trans-cinnamaldehyde possess the highest antimicrobial activity in comparison with other constituents of cinnamon oil.<sup>[12,20,34]</sup> Furthermore, thymol, carvacrol, eugenol, and geraniol are the main compounds of thyme, oregano, clove, and geranium plants, respectively. The antibacterial effect of their EOs has been reported.<sup>[35-36]</sup> Moreover, several authors show the antibacterial activity of various EOs plants including, thyme, oregano, lemon balm, basil, marjoram, and baccharis against the bacterial strains under consideration in this study.<sup>[13,14]</sup>

Previous studies have explored the antibacterial effect of cinnamon EO combinations. Clemente *et al.*<sup>[15]</sup> demonstrated that the combination of cinnamon with mustard EOs showed an additive effect against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and some other bacteria species. Lu *et al.*<sup>[16]</sup> used the checkerboard assay to determine the activity of cinnamon combined with thyme and clove EOs. Both cinnamon combinations displayed in most cases an additive or indifferent action against food-borne bacteria. These results were

confirmed by this study, thus highlighting the effectiveness of cinnamon oil when combined with thymol or carvacrol. Moreover, eugenol and geraniol are the MCs of EOs from clove and pelargonium, respectively. The additive effects of these EOs have been reported.<sup>[16,37]</sup>

On the contrary, the mechanism that is responsible for the antimicrobial activity of cinnamon includes its chemical composition such as cinnamaldehyde,<sup>[8]</sup> which is an electronegative molecule that could interfere with the biological process in microorganism particularly nitrogen containing substances such as proteins and nucleic acids.<sup>[38]</sup> Furthermore, cinnamon EOs and their MCs have been reported to inhibit bacteria via Antiquorum sensing effects, inhibiting cell division, ATPase, biofilm formation membrane porine, and mobility; altering the lipid profile<sup>[8]</sup>; and thereby acting cell membrane producing lumps and autoaggregation.<sup>[15]</sup> Furthermore, thymol and carvacrol are phenolic compounds; their hydroxyl groups play a major role in their antibacterial activities.<sup>[39]</sup> They are able to alter the cell outer membrane<sup>[40]</sup> and combine with the charged groups of membrane through increasing its permeability.<sup>[41]</sup> Furthermore, carvacrol had ATPase inhibitory propriety, which causes dissipation of the motive force of the proton, and can subsequently inhibit other enzymes.<sup>[42]</sup> However, there are limited reports on the action mechanisms of a mixture of EOs and theirs purified components on bacteria. Nevertheless, it is possible to explain the synergistic or additive effects caused by the combination of cinnamon EO and thymol or carvacrol by the fact that the thymol or carvacrol could increase the cell membrane permeability, making it easier for cinnamon compounds to penetrate into the cell and combine with proteins and nucleic acids. In addition, some explanations for the mechanisms of antibacterial interaction that produce antagonism include the use of compounds that act on the same target of the microorganism, combinations of bactericidal and bacteriostatic agents, and chemical interactions between compounds.<sup>[43,44]</sup>

## Conclusion

This work has shown that cinnamon EO possesses a stronger antimicrobial effect than all main compounds tested against resistant bacteria. This effect could be because of the trans-cinnamaldehyde, which is considered as the major compound of this EO. The synergistic effect was shown only against *S. aureus* with the combination of cinnamon oil and thymol. In addition, we have shown that the combination of cinnamon EO with thymol or carvacrol and their synergistic or additive effects can be used as an alternative therapeutic agent for medical application, as a natural preservative and food additive.

## Acknowledgement

The authors would like to thank the Pasteur Institute of Casablanca, Morocco, for providing multidrug-resistant bacteria, and PhD. Soumia Ait Assou (Laboratory of Biotechnology, Faculty of Sciences Dhar El Mehraz, fez, Morocco) for his critical reading of the manuscript.

## Financial support and sponsorship

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## References

- Martelli G, Giacomini D. Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *Eur J Med Chem* 2018;158:91-105.
- Kaur SP, Rao R, Nanda S. Amoxicillin: A broad spectrum antibiotic. *Int J Pharm Pharm Sci* 2011;3:30-7.
- Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chem Rev* 2017;117:12415-74.
- El Atki Y, Aouam I, El kamari F, Tarog A, Nayme K, Timinouni, *et al.* Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J Adv Pharm Technol Res* 2019;10:63-7.
- Tarog A, El Kamari F, Oumokhtar B, Aouam I, El Atki Y, Lyoussi B, *et al.* Phytochemical screening of the essential oil of syzygium aromaticum and antibacterial activity against nosocomial infections in neonatal intensive care. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2018;48:58-61.
- El Kamari F, Tarog A, El Atki Y, Aouam I, Lyoussi B, Abdellaoui A. Chemical composition of essential oils from vitex agnus-castus l. Growing in Morocco and its *in vitro* antibacterial activity against clinical bacteria responsible for nosocomial infections. *Asian J Pharm Clin Res* 2018;7:365-8.
- Fathollahi R, Dastan D, Lari J, Masoudi S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Crupina crupinastrumas* a medicinal plant growing wild in West of Iran. *J Rep Pharma Sci* 2018;174-82.
- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents. *Microb Path* 2018;120:198-203.
- Unlu M, Ergene E, Unlu GV, Zeytinoglu HS, Vural N. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* blume (lauraceae). *Food Chem Toxicol* 2010;48:3274-80.
- Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CA. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol* 2007;45:1650-61.
- Firmino DF, Cavalcante TTA, Gomes GA, Firmino NCS, Rosa LD, De Carvalho MG, *et al.* Antibacterial and antibiofilm activities of *Cinnamomum Sp.* essential oil and cinnamaldehyde: Antimicrobial activities. *Sci W J* 2018;2018:1-9.
- Shi C, Zhang X, Zhao X, Meng R, Liu Z, Chen X, *et al.* Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Food Contr* 2017;71:10-16.
- Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* 2008;124:91-7.
- Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between thymus vulgaris and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol* 2008;116:403-6.
- Clemente I, Aznar M, Silva F, Nerin C. Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. *Innov Food Sci Emerging Technol* 2016;36:26-33.
- Lu F, Ding YC, Ye XQ, Ding YT. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agr Sci China* 2011;10:1482-7.

17. El Atki Y, Aouam I, El kamari F, Taroq A, Lyoussi B, Oumokhtar B, *et al.* Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections. *Arabian J Chem* 2019;12.
18. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Chaabouni Y, Mahdouani K, Bakhrouf A, *et al.* Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and resistance modifying susceptibility of salmonella enterica serovar typhimurium strains to nalidixic acid. *Microb Pathog* 2017;104:56-63.
19. Netopilova M, Houdkova M, Rondevaldova J, Kmet V, Kokoska L. Evaluation of in vitro growth-inhibitory effect of carvacrol and thymol combination against *Staphylococcus aureus* in liquid and vapour phase using new broth volatilization checkerboard method. *Fitoterapia* 2018;129:185-90.
20. El Atki Y, Aouam I, El kamari F, Taroq A, Gouch A, Abdellaoui A, *et al.* Antibacterial efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria. *J Pharm Sci Res* 2019;11:306-9.
21. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation; 2007. p. 456.
22. Mello S, Bittencourt F, Fronza N, Cunha A, Neud G, Rosana C, *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 C. *LWT – Food Sci Technol* 2014;59:86-93.
23. Gary L, Furtado L. Single-disk diffusion testing (Kirby–Bauer) of susceptibility of proteus mirabilis to chloramphenicol: Significance of the intermediate category. *J Clin Microbiol* 1980;14:550-3.
24. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Ninth International Supplement. Delaware County, PA: NCCLS; 1999.
25. Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J Essent Oil Res* 1993;5:179-84.
26. Moody JA. Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth microdilution. In: Isenberg, H.D., editor, *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2003. p. 1-28.
27. Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM, *et al.* Antibacterial activity of thymus maroccanus and thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection: Bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 2012;19:464-71.
28. Simić A, Soković MD, Ristić M, Grujić-Jovanović S, Vukojević J, Marin PD. The chemical composition of some lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytother Res* 2004;18:713-7.
29. Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Tuveri E, Sanjust E, Meli M, *et al.* Supercritical CO<sub>2</sub> extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical characterization and antityrosinase activity. *J Agric Food Chem* 2007;55:10022-7.
30. Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygodlo J, *et al.* Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flav Frag J* 2009;24:348-54.
31. Pei RS, Zhou F, Ji BP, Xu J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. Coli* with an improved method. *J Food Sci* 2009;74:M379-83.
32. Miladi H, Zmantar T, Kouidhi B, Al Qurashi YMA, Bakhrouf A, Chaabouni Y, *et al.* Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and  $\gamma$ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microb Pathog* 2017;112:156-63.
33. Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J Appl Microbiol* 2010;109:1139-49.
34. Cheng SS, Liu JY, Hsui YR, Chang ST. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresour Technol* 2006;97:306-12.
35. Ouedrhiri W, Balouiri M, Bouhdid S, Moja S, Chahdi FO, Taleb M, *et al.* Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Ind Crops Prod* 2016;89:1-9.
36. Boukhatem MN, Kameli A, Saidi F. Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens. *Food Contr* 2013;34:208-13.
37. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 2007;14:727-32.
38. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of enterobacter aerogenes by active components in spices. *J Food Prot* 1995;58:280-3.
39. Saad NY, Muller CD, Lobstein A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flav Frag J* 2013;28:269-79.
40. Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int J Food Microbiol* 2004;94:223-53.
41. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, *et al.* Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem* 2007;55:6300-8.
42. Gill AO, Holley RA. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol* 2006;111:170-4.
43. Goñi P, López P, Sánchez C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem* 2009;116:982-9.
44. Cox S, Mann C, Markham J. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 2001;91:492-7.



Received on 02 October 2018; received in revised form, 28 December 2018; accepted, 30 December 2018; published 01 June 2019

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TWO WILD *TEUCRIUM* SPECIES FROM MOROCCO

Y. El Atki<sup>\*</sup>, I. Aouam, F. El kamari, A. Taroq, B. Lyoussi and A. Abdellaoui

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

### Keywords:

*Teucrium*, Polyphenols,  
Flavonoids, Antioxidant activity

### Correspondence to Author:

**Yassine El Atki**

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

**E-mail:** yassinelbs@gmail.com

**ABSTRACT:** The aim of the present study was to investigate antioxidant activity, total polyphenols and total flavonoids contents of extracts from two Moroccan *Teucrium* species (*Teucrium polium* and *Teucrium aurum*). The Antioxidant activity was evaluated *in-vitro* by three assays namely, free radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and total antioxidant capacity. Total polyphenol content was measured using Folin-Ciocalteu assay. The aluminum chloride colorimetric test measured total flavonoids contents. The total phenols contents, flavonoids contents, and the antioxidant activity of *T. polium* extracts were higher than *T. aurum*. The phenols contents ranged from 109.28 to 20.61 mg GA E/ g dry extract. The total flavonoids varied between 102.99 and 10.33 mg RE/g dry weight. The extracts showed significant scavenging activity of DPPH, with IC<sub>50</sub> values ranging between 0.40 and 2.12 mg/ml and a good ferric reducing power, with IC<sub>50</sub> values varying from 0.15 to 4.23 mg/ml. The total antioxidant capacity assay showed that the water extract of *T. polium* had a highest activity with a value of 153.89 mg Vit C E/g dry weight. The ethyl acetate extract has a weak antioxidant activity in the three tests. A good correlation between antioxidant activities and contents of polyphenols and flavonoids was found. These results show that Moroccan *Teucrium* species, especially *T. polium*, is a rich source of phenols and natural antioxidant compounds, which can be used as a natural food preservative.

**INTRODUCTION:** Oxidative stress is characterized as an imbalance between the production of reactive species and antioxidant defense activity<sup>1</sup>. This imbalance has been associated with numerous diseases such as, neurodegenerative and Alzheimer's disease<sup>2, 3</sup>, cardiovascular disease<sup>4</sup>, cancer<sup>5</sup> diabetes<sup>6, 7</sup> and inflammatory diseases<sup>8</sup>.

Medicinal and aromatic plants are considered as an important source of active principles with high antioxidant potential. Polyphenols, usually referred to as antioxidant compounds, play a major role in the prevention and protection against various diseases<sup>9</sup>. The genus *Teucrium* (Lamiaceae family) includes 300 species distributed all over the world, particularly in the Mediterranean basin<sup>10</sup>.

It usually develops on hillsides, sands, semi-arid and in arid places<sup>11</sup>. In Morocco folk medicine, Germander (*T. polium* and *T. aurum*) locally called "Jaada," it is used for the treatment of a variety of diseases, including digestive disorders, liver problems,<sup>12</sup> hypertension, fever, diabetes, rheumatism, parasitic diseases such as amoebicide<sup>13</sup>.

<p>QUICK RESPONSE CODE</p> 	<p>DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(6).2723-29</p>
	<p>The article can be accessed online on <a href="http://www.ijpsr.com">www.ijpsr.com</a></p>
<p>DOI link: <a href="http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(6).2723-29">http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(6).2723-29</a></p>	

Numerous studies showed therapeutic properties of some *Teucrium* species such as anti-cancer<sup>14, 15</sup>, anti-allergic<sup>16</sup>, antibacterial<sup>17</sup>, antidiabetic<sup>7</sup>, anti-inflammatory, anti-nociceptive<sup>18</sup> and antioxidant<sup>19</sup> effects. It was reported that the therapeutic ability of *T. polium* extracts is generally attributed to their propriety to suppress oxidative processes<sup>20</sup>. It was also reported that the alcoholic extract of *T. polium* possesses a suppressing effect on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in red blood cells<sup>21</sup>.

To the best of our knowledge, no data are available on the antioxidant activity, total polyphenol and flavonoid contents of *T. aurum* species extracts. However, the objective of our study was to evaluate, for the first time, the antioxidant activity of methanol, aqueous, ethanol and ethyl acetate extracts of *Teucrium polium* and *Teucrium aurum* which are growing in South Morocco.

#### **MATERIALS AND METHODS:**

**Reagents and Standards:** 2,2-Diphenylpicryl-hydroxyl radical (DPPH), Butylated hydroxyl-toluene (BHT), ammonium molybdate, aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ), sodium phosphate, quercetin, vitamin C, rutin, gallic acid, iron III chloride ( $\text{FeCl}_3$ ), potassium ferricyanide ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the other chemicals and solvents used were of analytical grade.

**Plants Materials:** Aerial parts of *Teucrium polium* and *Teucrium aurum* were collected in April 2015 from the region of Kser Lahri, Midelt (Morocco). They were identified by Professor Amina Bari, Botanist at the Department of Biological Sciences (Faculty of Sciences, Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Fez, Morocco).

**Preparation of *Teucrium* Extracts:** The plant material was dried at room temperature, powdered (10 g) and macerated with 100 ml of solvent (water, methanol, ethanol and ethyl acetate). The resultant macerate was filtered and then concentrated to dryness under vacuum at 40 °C using Rotary evaporator. The obtained extracts were kept in sterile sample tubes and stored in a refrigerator at 4 °C.

**Statistical Analysis:** Data statistical analyses of scavenging activity and reducing capacity assays were performed by using One-way ANOVA followed by Tuckey-test. The results statistical analyses of total phenol, flavonoids content and total antioxidant capacity tests were realized by using the Student's t-test. Correlations between antioxidant activity and total phenolic or flavonoid content were realized by a Pearson correlation coefficient (r). The level of significance was set at  $P < 0.05$ .

**Determination of Total Phenolic Content:** Total phenolic content of the extract was determined by the Folin - Ciocalteu method<sup>22</sup>. The 0.5 ml of a known dilution of the extract and 2 ml of 7% sodium carbonate solution were added to 2.5 ml of 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance was read at 760 nm (Jasco v-530) after 2 h of reaction at room temperature in the dark. Gallic acid was used as a standard for the construction of a calibration curve. Total phenols contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram dry weight of extract (mg GAE/g DW).

**Determination of Total Flavonoids Contents:** Total flavonoids contents of extracts were measured by the aluminum chloride colorimetric assay<sup>23</sup>. 1 ml of sample or rutin standard solution was added into a 10 mL volumetric flask containing 4 ml of distilled water. To the flask 0.30 ml 5%  $\text{NaNO}_2$  was added, after five minutes 0.3 ml 10 %  $\text{AlCl}_3$  was added to react for 6 min. After that, 2 ml of NaOH (1M) was added, and the total was made up to 10 ml with distilled water. The solution was mixed, and absorbance was measured against the blank at 510 nm (Jasco v-530). Rutin was used as a standard for the construction of the calibration curve. Total flavonoids contents were expressed as mg Rutin equivalents per gram dry weight of each extract (mg RE/g DW). All samples were analyzed in triplicate.

#### ***In-vitro* Antioxidant Activity:**

**DPPH Radical Scavenging Activity:** The ability of the extracts to scavenge the DPPH radical was measured using the method described by Wu, Chen<sup>24</sup>. 0.1 ml of various concentrations of the extracts or standard was added to 1.5 ml of the ethanolic solution containing 0.1 mmol of DPPH (2, 2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl). The absorbance of the mixture was measured at 517 nm with a spectrophotometer (Jasco V-530) after 30 min of incubation time at room temperature in the dark. The percentage inhibition was calculated by the following equation:

$$I (\%) = (1 - (A_s/A_c)) \times 100$$

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

**Ferric Reducing Antioxidant Power:** The reducing power of the tested extracts was determined by the procedure of Oyaizu<sup>25</sup>. 200  $\mu$ l of the extract was mixed with 500  $\mu$ l of phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) and 500  $\mu$ l of potassium ferricyanide  $[K_3Fe(CN)_6]$  1%. The obtained solution was incubated at 50 °C for 20 min. The mixture was acidified with 500  $\mu$ l of Trichloroacetic (TCA) 10%, which was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The upper layer of the solution (2.5 ml) was mixed with 500  $\mu$ l of distilled water and 100  $\mu$ l of  $FeCl_3$  (0.1%), and the absorbance was measured at 700 nm (Jasco v-530). Quercetin was used as standard. The result was expressed as  $IC_{50}$  (mg/ml). The extract concentration corresponding 0.5 of absorbance ( $IC_{50}$ ) was calculated by plotting absorbance against the corresponding extract concentration. All samples were analyzed in triplicate.

**Total Antioxidant Capacity:** The assay was based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) and subsequent formation of a green phosphate Mo (V) complex in acid pH<sup>26</sup>. A total volume of 25  $\mu$ L extract was added to 1 ml of reagent solution (0.6 mol/L sulphuric acid, 28 mmol/L sodium phosphate and 4 mmol/L ammonium molybdate). The mixtures were incubated at 95 °C for 90 min, then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 695 nm (Jasco v-530). The total antioxidant activity was expressed as the number of equivalence of vitamin C (mg vit C E/g DW).

## RESULTS AND DISCUSSION:

**Total Phenolic Contents:** The distribution of phenolic compounds in *T. polium* and *T. aurum* extracts is shown in Fig. 1. Results demonstrated that the methanol and ethanol extracts from *Teucrium polium* contained the highest amounts 109.26 and 100.94 mg GAE/g dry weight of extract, respectively, and the lowest phenolic content was observed in water *Teucrium aurum* extract (20.61 mg GAE/g dry of extract) Fig. 1. In all extracts, the contents of phenolics were higher in *T. polium* than *T. aurum*. Similarly, based on the results of selected *Teucrium polium* from Serbia<sup>27</sup>, the authors also found that the highest total phenolic concentration of different parts of *T. polium* is noticed with the methanol extract of leaves (157.84 mg of GA/g dry extract). Methanol is therefore the best solvent to extract phenolic compounds from medicinal plants.

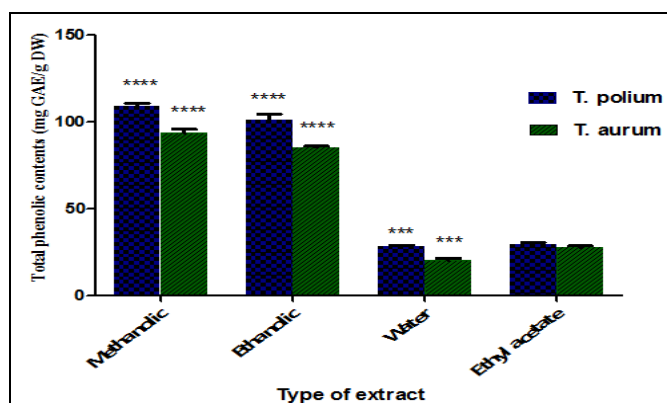


FIG. 1: TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS OF EXTRACTS FROM *T. POLIUM* AND *TEUCRIUM AURUM*. Results were expressed as mg GAE/g dry weight. Each value represents means  $\pm$  SD of three experiments. (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ )

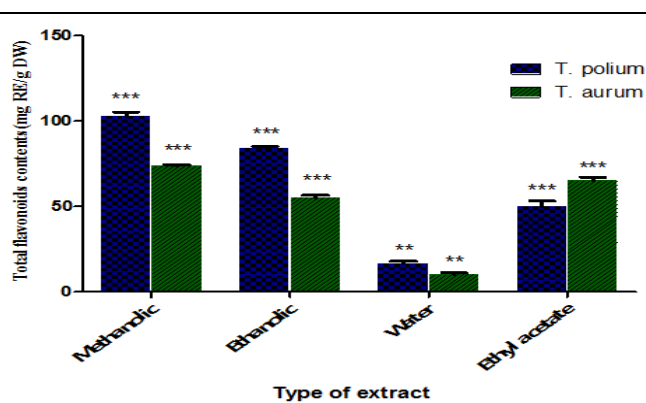


FIG. 2: TOTAL FLAVONOID CONTENT OF EXTRACTS FROM *T. POLIUM* AND *TEUCRIUM AURUM*. Results were expressed as mg RE/g dry weight. Each value represents means  $\pm$  SD of three experiments. (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ )

**Total Flavonoids Contents:** Total flavonoids contents of *T. polium* and *T. aurum* extracts were

determined in comparison with rutin standard and the results were expressed regarding mg RE/g dry

weight extract. As depicted in **Fig. 2**, the total flavonoid content of two species extracts ranged from 102.99 to 10.33 mg RE/g DW. The methanol extract of *T. polium* contained significantly a higher concentration of flavonoids ( $102.99 \pm 2.35$  mg of RE/g DW) than the other tested extract. Comparing the flavonoid concentration of *T. polium* and *T. aurum*, all extracts of *T. polium* (except ethyl acetate) had a significantly greater concentration of flavonoids than *T. aurum* extracts obtained using the same solvent. The total flavonoids content results obtained are higher than the results reported by Bakari et al., (2015)<sup>20</sup>. According to another study, the flavonoids content values ranged from 6.48 to 139.87 mg ER/g in the leaves, flowers and stemmed from *T. polium* extracts with the acetone extract giving a higher amount of flavonoids<sup>27</sup>. Like polyphenols, flavonoids have been confirmed to have a strong antioxidant activity<sup>28</sup>. Chemical studies on the *Teucrium* genus revealed the presence of flavonoids, saponins, polyphenols, sterols and tannins<sup>20</sup>. The *T. polium* species also contains essential oils, iridoids, flavonoids and diterpenoids<sup>10</sup>.

**Antioxidant Activity:** The antioxidant activity of *Teucrium* extracts was investigated by the DPPH radical scavenging assay, the ferric reducing antioxidant power, and the total antioxidant capacity.

**DPPH Radical Scavenging Activity:** DPPH<sup>•</sup> is a stable free radical that can receive hydrogen or electron from an antioxidant to become a stable molecule. Results in **Table 1** show DPPH radical scavenging activity of *Teucrium polium* and *Teucrium arum* extracts. In general, the IC<sub>50</sub> values of all tested samples through the DPPH scavenging activity test ranged from 0.4 to 2.12 mg/ml, and all

extracts inhibited the DPPH radical as follows: methanol > ethanol > ethyl acetate. These results clearly indicate that *T. polium* extracts had higher activity than the *T. aurum* extracts in comparison to the same solvent extracts. We found that, the methanol extract from *T. polium* had the greatest radical scavenging capacity in all samples tested with IC<sub>50</sub> values of  $0.40 \pm 0.03$  mg/ml, followed by ethanol ( $0.41 \pm 0.031$  mg/ml) then water ( $0.48 \pm 0.012$  mg/ml) and ethyl acetate extracts ( $1.60 \pm 0.15$  mg/ml). With *T. aurum*, we found also that the methanol extract had the greatest capacity with an IC<sub>50</sub> value of  $0.49 \pm 0.009$  mg/ml followed by water extract ( $0.51 \pm 0.021$  mg/ml), then ethanolic extract ( $0.53 \pm 0.035$  mg/ml).

However, when compared to the pure reference antioxidant BHT ( $0.11 \pm 0.0001$  mg/ml), all the tested extracts showed a significantly lower antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). An antioxidant agent is considered to be active against free radicals if IC<sub>50</sub> is less than 5 mg/ml<sup>29</sup>. All the extracts studied of two *Teucrium* species have IC<sub>50</sub> < 5 mg/ml, therefore all our extracts are a possible good source of antioxidant compounds. Also, extracts with high scavenging activity should have a low IC<sub>50</sub> value.

Previous studies demonstrated that extracts of *Teucrium* plants have strong antioxidant activity<sup>17, 27</sup>. The *Teucrium polium* extract showed significant free radical scavenging activity<sup>19, 30</sup>. Methanolic extract of *T. polium* exhibited an IC<sub>50</sub> value of 20.1 µg/ml<sup>31</sup>, which is below that found in our study. Another study found that IC<sub>50</sub> of *Teucrium polium* extracts were ranging from 14.50 to 238.25 µg/ml and the higher activity noticed with polar solvent extracts<sup>27</sup>. These differences observed can be attributed to the different extraction types used.

**TABLE 1: DPPH RADICAL SCAVENGING ACTIVITY (mg/ml) OF *T. POLIUM* AND *T. AURUM* EXTRACTS COMPARED TO THAT OF BHT (IC<sub>50</sub> = 0.118 ± 0.0001)**

Type of extract	Methanolic	Ethanolic	Water	Ethyl acetate
<i>Teucrium polium</i>	$0.40 \pm 0.03$	$0.41 \pm 0.031$	$0.48 \pm 0.012$	$1.6 \pm 0.15$
<i>Teucrium aurum</i>	$0.49 \pm 0.009$	$0.53 \pm 0.035$	$0.51 \pm 0.021$	$2.12 \pm 0.87$

Values are given as mean ± SD (n=3). The extracts of the same solvent and BHT are significantly different by the Tuckey-test ( $P < 0.05$ )

**Ferric Reducing Antioxidant Power:** The FRAP assay evaluated the ferric reducing capacity of investigated extracts. The reductive activity is generally associated with the presence of antioxidant agents which exert their effect by breaking the free radical chains via hydrogen atom

donation<sup>32</sup>. Therefore, the ferric reducing power assay is often used to evaluate the capacity of extracts to transform the Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup>; this capacity is compared to that of quercetin. Extracts with high reducing power should have a low IC<sub>50</sub> value. The results in **Table 2** showed that the methanolic

extract of *T. aurum* had the stronger ferric reducing power than all other extracts with an IC<sub>50</sub> value of 0.15 ± 0.003 mg/ml but this was still significantly (p<0.05) lower than that of the synthetic antioxidant quercetin (0.033 ± 0.0004 mg/ml). The ethyl acetate extract from *T. aurum* possessed the lowest ferric reducing power with an IC<sub>50</sub> value of 4.23 ± 0.11 mg/ml.

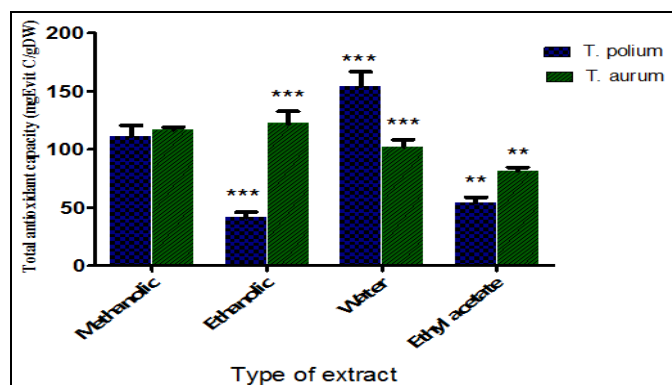
**TABLE 2: FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (mg/ml) OF *T. POLIUM* AND *T. AURUM* EXTRACTS COMPARED TO THAT OF QUERCETIN (IC<sub>50</sub> = 0.033 ± 0.0004)**

Type of extract	Methanolic	Ethanollic	Water	Ethyl acetate
<i>Teucrium polium</i>	0.28 ± 0.014	0.32 ± 0.01	0.48 ± 0.01	3.89 ± 0.081
<i>Teucrium aurum</i>	0.15 ± 0.003	0.36 ± 0.001	0.6 ± 0.041	4.23 ± 0.11

Values are giving as mean ± SD (n=3). The extracts of same solvent and quercetin are significantly different by the Tukey-test (P<0.05).

**Total Antioxidant Capacity:** Total antioxidant capacity of investigated *T. polium* and *T. aurum* extracts were determined by the phosphomolybdenum method, which is based on the reduction of Mo (VI) to Mo (V) by the antioxidant compounds and the subsequent formation of a green phosphate Mo (V) complex at acidic pH<sup>26</sup>. The found results expressed as vitamin C equivalents (Vit C E) are presented in **Fig. 3**. They revealed that the most solvent extraction of antioxidant capacity was water and the highest level of antioxidant capacity was found in the water of *T. aurum* with value of 153.89 ± 12.7 mg vitamin C equivalent to 1 g dry weight.

The antioxidant capacity was significantly higher in *T. aurum* than *T. polium* in methanol, ethyl acetate, and water extracts. According to a study performed by Ljubuncic *et al.*,<sup>33</sup> the aqueous extract of *T. polium* had a substantial antioxidant activity *in-vitro*.



**FIG. 3: TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITIES OF DIFFERENT EXTRACTS FROM *T. POLIUM* AND *T. AURUM*.** Results were expressed as mg vit C E/g dry weight. Each value represents the means ± SD of three experiments. (\*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001).

Previously published papers demonstrated that *Teucrium* genus possesses a high ferric reducing power<sup>19,30</sup>. In this study, we found that methanolic extract of *T. aurum* showed the highest ferric reducing power propriety. Several studies reported the reducing power of the extracts of *T. polium* and that the activity increased with concentration<sup>19,20</sup>.

**Correlations of Antioxidant Activities with Phenolic and Flavonoids Contents:** To find the influence of polyphenols on the antioxidant activity of *Teucrium* extracts, we studied the correlation between the results of three antioxidant tests and the contents of total phenols and flavonoids. As illustrated in **Table 3**, a significant and negative correlation was found between DPPH and total phenols (r<sup>2</sup> = -0.78). As a consequence, DPPH was also significantly correlated with total flavonoids (r<sup>2</sup> = -0.7). For the ferric reducing power, the IC<sub>50</sub> values were significantly and negatively correlated with total phenols (r<sup>2</sup> = -0.81) and with total flavonoids (r<sup>2</sup> = -0.73). Weak and non-significant correlation between total antioxidant capacity and total phenols could be detected as well for total flavonoids.

Similar to our results, a high relationship between the total phenol and flavonoids contents with two of the antioxidant assays, like free radical scavenging activity and ferric reducing power of *Teucrium* extract has been reported<sup>34</sup>. The weak and non-significant correlation was found between the total antioxidant capacity and polyphenols and flavonoids contents of two *Teucrium* species extracts, indicating that total antioxidant capacity, in these extracts, measures the activity of some other phytochemicals than the polyphenols, a similar result was also observed by Brantner<sup>35</sup> with *Lavandula* extracts. The free radical scavenging activity of the extracts, in our case, could be attributed to the phenolic content. According to the literature, phenol compounds can contribute to the antioxidant potent<sup>9,36,37</sup> and they are considered as anti-cancer, anti-inflammatory, antiviral, and anti-

bacterial agents due to their antioxidant and free radical scavenging properties<sup>38</sup>.

**TABLE 3: CORRELATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES WITH PHENOLS AND FLAVONOIDS CONTENT OF EXTRACTS FROM *T. POLIUM* AND *T. AURUM***

Compounds	DPPH	Ferric Reducing power	Total antioxidant capacity
Phenols contents	-0.78	-0.81**	0.44
Flavonoids contents	-0.7*	-0.73*	0.34

\* Correlation is significant at the P<0.05 level

\*\* Correlation is significant at the P<0.01 level

**CONCLUSION:** Based on the findings from this study, methanolic extracts of *T. polium* and *T. aurum* displayed significant antioxidant effect and a remarkable levels of total phenols and flavonoids content. The highest antioxidant propriety is noticed with polar solvent extracts. Significant correlations were found between the total phenol and flavonoids contents and two of the antioxidant tests, such as free radical scavenging activity and ferric reducing power.

The Moroccan Germander (*T. polium* and *T. aurum*) is a rich source of phenols and natural antioxidant compounds which can be used as a natural food preservative agent. To the best of our knowledge, this is the first report on the antioxidant activities of Moroccan Germander extracts.

**ACKNOWLEDGEMENT:** The authors wish to thank Professor Amina Bari (Sidi Mohammed Ben Abdellah University, Morocco) for the identification of the plants.

**CONFLICT OF INTEREST:** There is no conflict of interest.

## REFERENCES:

- Chahmi N, Anissi J, Jennan S, Farah A, Sendide K and El-Hassouni M: Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015; 5: 228-33.
- Mota SI, Costa RO and Ferreira IL: Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2015; 1852: 1428-41.
- Ma X, Cui X, Li J, Li C and Wang Z: Peptides from sesame cake reduce oxidative stress and amyloid- $\beta$ -induced toxicity by upregulation of SKN-1 in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Journal of Functional Foods* 2017; 39: 287-298.
- Fuentes F, Palomo I and Fuentes E: Platelet oxidative stress as a novel target of cardiovascular risk in frail older people. *Vascular Pharmacology* 2017; 93: 14-19.
- Feng JF, Lu L and Dai CM: Analysis of the diagnostic efficiency of serum oxidative stress parameters in patients with breast cancer at various clinical stages. *Clinical Biochemistry* 2016; 49: 692-98.
- Zhuang T, Han H and Yang Z: Iron, Oxidative Stress and Gestational Diabetes. *Nutrients* 2014; 6: 3968-80.
- Tabatabaie PS and Yazdanparast R: *Teucrium polium* extract reverses symptoms of streptozotocin-induced diabetes in rats *via* rebalancing the Pdx1 and FoxO1 expressions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 93: 1033-39.
- Khouya T, Ramchoun M and Hmidani A: Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015; 5: 636-44.
- Sagbo IJ, Afolayan AJ and Bradley G: Antioxidant, antibacterial and phytochemical properties of two medicinal plants against the wound infecting bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2017; 7: 817-25.
- Ruiters AK, Tilney PM, Van Vuuren SF, Viljoen AM, Kamatou GPP and Van Wyk BE: The anatomy, ethnobotany, antimicrobial activity and essential oil composition of southern African species of *Teucrium* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany* 2016; 102: 175-85.
- Al-Ghamdi AG and FA: Analysis of the essential oil of the germander (*Teucrium polium*) aerial parts from the northern region of Saudi Arabia. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* Available online at 2014; 5: 128-35.
- Fakchich J and Elachouri M: Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 154: 76-87.
- Elmasri WA, Hegazy MEF and Aziz M: Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry* 2014; 103: 107-13.
- Guesmi F, Prasad S, Tyagi AK and Landoulsi A: Antiinflammatory and anticancer effects of terpenes from oily fractions of *Teucrium alopecurus*, blocker of I $\kappa$ B $\alpha$  kinase, through downregulation of NF- $\kappa$ B activation, potentiation of apoptosis and suppression of NF- $\kappa$ B-regulated gene expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 95: 1876-85.
- Elmasri WA, Hegazy M-EF, Mechref Y and Paré PW: Structure-antioxidant and anti-tumor activity of *Teucrium polium* phytochemicals. *Phytochemistry Letters* 2016; 15: 81-87.
- Sargin SA: Ethnobotanical survey of medicinal plants in Bozyazi district of Mersin, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 173: 105-26.
- Fertout-Mouri N, Latrèche A, Mehdadi Z, Toumi-Bénali F and Khaled MB: Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytotherapie* 2017; 15: 346-53.
- Shah SMM and Shah SMH: Phytochemicals, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory potential of the aqueous extract of *Teucrium stocksianum* bioss. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2015; 15: 351.
- Khaled-Khodja N, Boulekbache-Makhlouf L and Madani K: Phytochemical screening of antioxidant and

- antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products* 2014; 61: 41-48.
20. Bakari S, Ncir M and Felhi S: Chemical composition and *in vitro* evaluation of total phenolic, flavonoid, and antioxidant properties of essential oil and solvent extract from the aerial parts of *Teucrium polium* grown in Tunisia. *Food Science and Biotechnology* 2015; 24: 1943-49.
  21. Suboh SM, Bilto YY and Aburjai TA: Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research* 2004; 18: 280-84.
  22. Slinkard K and Singleton VL: Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977; 28: 49-55.
  23. Zhishen JMT and WJ: The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on Superoxide radicals. *Food chem* 1999; 64: 555-59.
  24. Wu HC, Chen HM and Shiau CY: Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International* 2003; 36: 949-57.
  25. Oyaizu M: Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 1986; 44: 307-15.
  26. Prieto P, Pineda M and Aguilar M: Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 1999; 269: 337-41.
  27. Stankovic MS, Niciforovic N, Mihailovic V, Topuzovic M and Solujic S: Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 2012; 81: 117-22.
  28. Aouam I, El Atki Y, Taroq A, El Kamari F, Lyoussi B, Abdellaoui A: Phenolic contents and antioxidant capacities of various extracts of *Thymus riatarum* from Morocco. *J Pharm Sci & Res* 2018; 10: 2689-92.
  29. Abdillah S, Tambunan RM, Farida Y, Sandhiutami NMD and Dewi RM: Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. *Asian Pacific Jou of Tropical Disease* 2015; 5: 454-57.
  30. Khanavi M, Laghaei P, Mirnezami T, Yousefbeyk F, Golfakhrabadi F and Hajimahmoodi M: Antioxidant and antiacetylcholinesterase activity of *Teucrium hyrcanicum*. *Pharmacognosy Research* 2015; 7: 15.
  31. De Marino S, Festa C and Zollo F: Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry* 2012; 133: 21-28.
  32. Al-Abd NM, Nor ZM and Mansor M: Phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ardisia elliptical*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2017; 7: 569-76.
  33. Ljubuncic P, Dakwar S, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H and Bomzon A: Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity *in-vitro*. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2006; 3: 329-38.
  34. Boulanouar B, Abdelaziz G, Aazza S, Gago C and Grac M: Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils 2013; 46: 85-96.
  35. Brantner A: Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula X intermedia* Emeric ex Loisel. "Budrovka": A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules* 2010; 15: 5971-87.
  36. Jaiswal P and Thakur MK: The investigation on total phenolic content and *in-vitro* antioxidant potential of different plant parts of *Nyctanthes arbortristis* (night jasmine). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2017; 8: 3547-51.
  37. Taroq A, EL Kamari F, Aouam I, EL Atki Y and Lyoussi B: Antioxidant activities and total phenolic and flavonoid content variations of leaf extracts of *Laurus nobilis* L. from Morocco. *Asian J Pharm Clin Res* 2018; 11: 1-4.
  38. Martelli G and Giacomini D: Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018; 158: 91-05.

**How to cite this article:**

El Atki Y, Aouam I, E kamari F, Taroq A, Lyoussi B and Abdellaoui A: Antioxidant activity of two wild *Teucrium* species from Morocco. *Int J Pharm Sci & Res* 2019; 10(6): 2723-29. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(6).2723-29.

All © 2013 are reserved by International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. This Journal licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License.

This article can be downloaded to **Android OS** based mobile. Scan QR Code using Code/Bar Scanner from your mobile. (Scanners are available on Google Play store)

# Antibacterial efficacy of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria

Yassine El Atki, Imane Aouam, Fatima El kamari, Amal taroq, Abdelkader Gouch, Badiaa Lyoussi, Abdelfattah Abdellaoui

Laboratory of Physiology Pharmacology and Environmental Health, Department of Biology, Faculty of Sciences Dhar Mehraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco.

## Abstract

Resistance of infection nosocomial-bacteria to common antibiotics has been developed in different parts of the world and continues to increase. It is important to investigate the novel and efficient antibacterial agents, among which, the major compounds of essential oils would be suitable sources. In the current study, we evaluated the antibacterial activity of thymol, carvacrol, eugenol and menthol against four bacterial strains responsible for nosocomial infections such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* and *Staphylococcus aureus*. This activity was assessed using disc diffusion method and micro-dilution assay for determinate minimum inhibitory concentration (MIC).

The results showed that thymol, carvacrol and eugenol expressed a significant antibacterial activity against the four strains studied. Thymol showed the high antibacterial activity against *S.aureus* and *E. coli* with MIC value of 0.35 mg/ml. Menthol demonstrated a low activity against all tested bacterial with a MIC value greater than 6 mg/ml. These compounds, especially thymol and carvacrol, can be used as antibacterial agents for the treatment of various infectious diseases caused by these germs, which have developed resistance to antibiotics in Centre Hospital University of Fez, Morocco.

**Keywords:** Antibacterial effect; major compounds; nosocomial infections.

## INTRODUCTION

Nosocomial infections are known as a serious threat to global health in the 21st century. and they are characterized by high morbidity and mortality rates [1]. In 2007, About 1.4 million people suffer from nosocomial infections [2]. In Morocco, The incidence of nosocomial infections in the reanimation units is high and dominated bacteria that are increasingly resistant to antibiotics [3]. The solution to this problem is therefore crucial and requires the search of new alternatives. Essential oils (EOs) are aromatic complex mixtures of volatile compounds extracted from different parts of plants such as flowers, buds, seeds, leaves, twigs, bark, herbs, wood, fruits, and roots [4]. several studies have shown significant antibacterial activity of essential oils (EOs) from some medicinal and aromatic plants against resistant microbial strains [5–7]. It reported that the antibacterial effect of EOs is related to the presence of phenolic compounds, such as thymol, carvacrol, and eugenol, which are recognized as the main components of some EOs [8].

Thymol and carvacrol are mainly present in the essential oils of thyme and origano [9,10], many studies showed their antimicrobial properties against both Gram-positive and Gram-negative bacteria species [10-12]. Eugenol is a major component (approximately 87%) of leaves and buds from clove [7]. This component is largely used perfumes and in mouthwashes as dental analgesic and has been well recognized, for its antimicrobial activities [13]. Menthol is a terpenoid and the active principle of essential oils from the mentha species, such as peppermint and horse mint [14]. However, to the best of our knowledge, there are no available data about the antibacterial activity of these compounds against nosocomial infection-bacteria. Therefore, the objective of the present work was to

investigate the antibacterial activity of thymol, carvacrol, eugenol, and menthol against four nosocomial infection-bacteria.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains

In this study the antibacterial activity of thymol, carvacrol, eugenol, and menthol was tested against, Gram-positive *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and Gram-negative bacteria included *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). All strains tested were isolated in a hospital environment from clinical patients in reanimation service (CHU Fez, Morocco). The inoculum suspension was obtained by taking colonies from 24 H cultures. The colonies were suspended in sterile 0.9% aqueous solution of NaCl and shaken for 20 seconds. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard ( $10^8$  CFU/ml) [15].

### Agar disc diffusion Assay

The agar disc diffusion assay was determined in triplicate according to the experiment described by Furtado and Medeiros (1980) [16]. The suspensions of microorganisms ( $1-5 \times 10^8$  CFU/ml) were flood inoculated onto the surface of Mueller Hinton (MH) agar plates. Sterile 6 mm diameter filter discs (Whatman paper N° 3) were impregnated with 10µg/disc of the compound and were put on to the surface of the inoculated Mueller Hinton agar. The plates were incubated at 37°C for 18 h. Antibacterial effect was evaluated by measuring the inhibition zones against the tested bacterial strains. The standard drugs for comparison were the antibiogram discs of Imipenem (IMP)

Vancomycin (VA), Cefaclor (CEC), Nifrofurantoin (F), Kanamycin (K).

### Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was performed using a microdilution assay in 96-well plates according to the experiment of the *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1999)[17] with some modifications; the different concentrations of compounds are prepared in a suspension containing 0.2% agar in sterile distilled water in order to disperse the compounds without adding solvent or detergent [18]. They are carried out by successive dilutions 1/2 ranging from 45 to 0.351 mg/ml. The concentrations obtained in the well were between 11.25 and 0.087 mg/ml. Bacterial suspensions were prepared in the same manner described previously and diluted in MH broth and plated in 96 well plates at a density of  $1-5 \times 10^6$  CFU/ml. Compounds were added at different concentrations at the corresponding wells to determine MIC values. Finally the plates were incubated at 37°C for 18-24 h, bacterial growth was visually by adding to each well 20µl of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) aqueous solution (1% ), with additional incubation for 1 h. MIC was defined as the lowest concentration that does not produce a red color [15].

### RESULTS AND DISCUSSIONS

In this work, the antibacterial activity of the thymol, carvacrol, eugenol and menthol has been evaluated in vitro against four bacterial species responsible for nosocomial infections contracted at the University Hospital Center of Fez, Morocco. Several publications from our laboratory have previously reported the antibacterial activity of some essential oils against bacterial strains under consideration in the present study [6,7,10,12,19]. To the best of our knowledge, there are no available data about the antibacterial effect of some major compounds from EOs (thymol, carvacrol, eugenol and menthol) against nosocomial infection bacteria. Table 1 summarized the inhibition zone diameter of these compounds, thymol, carvacrol and eugenol showed a wide antibacterial spectrum, against tested strains with the inhibition zone diameters varying from 12 to 34 mm. Moreover, the thymol had the highest inhibitory activity against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* with inhibition diameters values of 34.5, 28, 17 and 22 mm respectively. Interestingly, these diameters were sometimes higher than those obtained with standard antibiotics used as controls. The present data indicated that the *E. coli* was the most sensitive of the strains tested to the components. However, all compounds, especially menthol, showed a low activity against *P. aeruginosa*. Table 2 summarized the MIC values of these compounds against the tested strains. Thymol exhibited a significant antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* with the same MIC value of 0.351 mg/ml. Carvacrol had the same MIC against *E. coli*, *S. aureus* and *K. pneumoniae* (0.703 mg/ml). Thymol and carvacrol possess the same MIC and present a low activity against *P. aeruginosa*, which was only inhibited at a

concentration of 1.06 mg/ml. The antibacterial effect of eugenol was higher than that of menthol. However, both eugenol and menthol showed a lower antibacterial effect against all tested strains (Table 2). Otherwise, Didry *et al* tested the antimicrobial activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on seven oral bacteria. These components showed an inhibitory activity against all tested microorganisms [20]. Abbaszadeh *et al* founded that thymol, carvacrol, eugenol and menthol are a good alternative agents to control the growth of food-fungi [21]. Another study demonstrated antibacterial effect of eugenol, carvacrol, and thymol against *Salmonella Enteritidis* and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal [22]. In 2015 Falsafi *et al.*, evaluated the antibacterial activity of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil and its constituents against ten *helicobacter pylori* clinical isolates. The results showed that thymol antibacterial activity was lower than those of carvacrol [23]. In order to examine the antimicrobial effect against foodborne pathogens (*E. coli* O157:H7, *S. thyphimurium* and *L. monocytogenes*), recently, Moon and Rhee (2016) combined soy sauce with carvacrol, thymol, eugenol, trans-cinnamaldehyde,  $\beta$ -resorcylic acid and vanillin, The authors concluded that thymol and carvacrol inhibited all the tested bacteria and acted in a synergistic interaction with soy sauce to increase the antimicrobial effect [24]. Karapmar, *et al* (1987) evaluated the antibacterial property of thymol, eugenol, menthol and anethole against foodborne bacteria (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*), the results showed that thymol and eugenol were more effective than anethole and menthol [25]. A study conducted by Pemmaraju *et al*, investigated the activity of thymol, eugenol and menthol against *C. albicans* MTCC 227. Thymol and eugenol showed antimicrobial effect at a concentration of 0.12 %, while menthol showed it at a concentration of 0.25% [26]. On the other hand, Gram-negative bacteria were more resistant than Gram-positive thanks to the structure of their outer membrane. Thus, the outer membrane of Gram-negative is richer in lipo-polysaccharides and proteins than those of Gram-positive that make it more hydrophilic, which prevents the hydrophobic terpenes from adhering to these bacteria [27,28]. Nevertheless, some low molecular weight phenolic compounds can adhere to these microorganisms thanks to their functional groups. The mechanisms by which the Aromatic and phenolic compounds can inhibit the microorganisms involve different mechanisms. Thymol and Carvacrol have a hydroxyl group, which play a major role in their antibacterial activities [29]. They able to alter the cell outer membrane [30] and combine with the charged groups of membrane, via increasing its permeability [31]. In addition, carvacrol had ATPase inhibitory propriety which causes dissipation of the motive force of the proton, and can subsequently inhibit other enzymes [32]. Eugenol, by its hydrophobic structure, is able to penetrate lipopoly-saccharides of Gram-negative bacteria outer membrane, insert into phospholipid bilayer and alter the structure and permeability of cell membrane.

**Table 1: Inhibition zone diameter (mm) of thymol, carvacrol, eugenol and menthol**

Bacterial strains		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Major compounds	Thymol	34.5 ± 1	28 ± 0.6	17 ± 0.5	22 ± 0.3
	Carvacrol	27 ± 1	24 ± 0.4	15 ± 0.3	21 ± 1
	Eugenol	15 ± 0.0	15 ± 0.1	12 ± 0.3	16 ± 0.4
	Menthol	8 ± 0.5	8.5 ± 0.1	NI	8 ± 0.2
Antibiotics	F	19	20	20	22
	CE	NI	14	NT	NI
	IMP	28	39	12	25
	K	17	17	NT	24
	VA	NI	14	13	NI

Inhibition zone includes diameter of disk (6 mm); NI: No inhibition; NT: Not tested; IMP: Imipenem; VA: Vancomycin; CEF: Cefaclor; F: Nifurofuranol; K: Kanamycin.

**Table 2 Minimal inhibitory concentration (mg/ml) of thymol, carvacrol, eugenol and menthol**

Bacterial species	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Thymol	0.351	0.351	1.406	0.703
Carvacrol	0.703	0.703	1.406	0.703
Eugenol	5.625	5.625	>6	5.625
Menthol	>6	>6	NT	>6

NT: Not tested

Moreover, the hydroxyl group of eugenol binds to membrane proteins, affects the membrane features and disorders the of cytoplasmic membrane function [33]. In addition, Alteration of membrane structure and function may make macromolecules easy to transport through membrane. Therefore, the ability of permeabilizing cell membrane makes thymol, carvacrol and eugenol a potential synergistic agents against antibiotic resistance bacteria, because they can be able to facilitate the absorption of antibiotics.

### CONCLUSION

The objective of this work was to evaluate the antibacterial activity of thymol, carvacrol, eugenol and menthol against nosocomial infection-bacteria. Thymol, carvacrol and eugenol showed an important antibacterial activity against all tested bacteria. The diameters of the inhibition zones and minimal inhibitory concentration varied between samples and between bacterial strains. Thymol and carvacrol gave significant results expressed by the lowest MIC. Therefore, these compounds, can be used as alternative agents for the treatment of various infectious diseases caused by these germs, which have developed resistance to antibiotics in Centre Hospital University of Fez Morocco.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the Centre Hospital University of Fez, Morocco, for the providing of nosocomial infection-bacteria.

### REFERENCES

- Jenkins, D.R. *Medicn.* 2017, 45, 629–633.
- Abdellatif, A., Bagian, J. *Jot Coms J. Qual.Pat Saf.* 2007, 33, 460–463.
- Maoulainine, F.M.R., Elidrissi, N.S., Chkil, G., Abba, F., Soraa, N., Chabaa, L., Amine, M., Aboussad, A. *Arch. Pédr.* 2014, 21, 938–943.
- Valderrama, F., Ruiz, F. *Comp. Chem. Eng.* 2018, 117, 25–31.
- Kaskatepe, B., Kiyamaci, M. E., Suzuk, S., Erdem, S. A., Cesur, S., & Yildiz, S. *Inds. Crps. Prdc.* 2016, 81, 191-194.
- Kamari, F. El, Tarog, A., El Atki, Y., Aouam, I., Lyoussi, B., Abdellaoui, A. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2018, 11, 365–368.
- Tarog, A., El Kamari, F., Oumokhtar, B., Aouam, I., El Atki, Y., Lyoussi, B., Abdellaoui, A., Mohamed, S., Abdellah, B., Harazem, R.D.S. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* 2018, 48, 58–61.
- López-Malo, A., Alzamora, S.M., Palou, E. *Int. J. Food Microb.* 2002, 73, 213–218.
- Gendy, A.N., Leonardi, M., Mugnaini, L., Bertelloni, F., Ebani, V. V., Nardoni, S., Mancianti, F., Hendawy, S., Omer, E., Pistelli, L. *Inds. Crps.Prdc.* 2015, 67, 201–207.
- Aouam, I., El Atki, Y., Tarog, A., El Kamari, F., Abdellaoui, A. *Asian J Pharm Clin Res* 2019, 12, 447–451.
- Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.E., Pags, J.M., Hassani, L. *Phytomed.* 2012, 19, 464–471.
- Aouam, I., El Atki, Y., Tarog, A., El Kamari, F., Oumokhtar, B., Lyoussi, B., Abdellaoui, A. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* 2018, 51, 72–75.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A., Food, G.B.-I.J. of, 2008, U. *Int. J. Food Microb.* 2008, 126, 13–19.
- Mickienė, R., Ragažinskienė, O., *Biologija*, B.B.-, 2011, U. *biologija* 2011, 57, 92–97.
- Mello, S., Bittencourt, F., Fronza, N., Cunha, A., Neud, G., Rosana, C., Vieira, W. *LWT - Food Sc. Techg.* 2014, 59, 86–93.
- L. Gary and A. FURTADO *J. Clin. Microb.* 1980, 14, 550–553.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) 1999.
- Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K. *J. Essent. Oil Res* 1993, 5, 179–184.
- Jalal, Z., El Atki, Y., Lyoussi, B., Abdellaoui, A. *sian Pac J Trop Biomed.* 2015, 5, 458–461.
- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M. *Pharmac. Acta Helv.* 1994, 69, 25–28.
- Mastelić, J., Jerković, I., Blažević, I., Poljak-Blaži, M., Borović, S., Ivančić-Baće, I., Smrečki, V., Žarković, N., Brčić-Kostic, K., Vikić-Topić, D., et al. *J.Agr. Fd Chem.* 2008, 56, 3989–3996.
- Kollanoor Johny, A., Darre, M.J., Donoghue, A.M., Donoghue, D.J., Venkitanarayanan, K. *J. Appl.Poultry Res.* 2010, 19, 237–244.
- Falsafi, T., Moradi, P., Mahboubi, M., Rahimi, E. *Phytomed.* 2015, 51, 1032–1037.
- Moon, H., Rhee, M.S. *Int. J. Food Microb.* 2016, 217, 35–41.
- Karapinar, M., Esen Aktuğ, Ş. *Int. J. Food Microb.* 1987, 4, 161–166.
- Pemmaraju, S., Pruthi, P., Prasad, R., Pruthi, V. *Ind. J. Exper. Biolg.* 2013, 51, 1032–1037.
- Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F. *Food. Chem. Toxicol.* 2011, 49, 238–243.

- [28] Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J. *Food Contr.* 2012, 27, 294–299.
- [29] Saad, N.Y., Muller, C.D., Lobstein, A. *Flav. Fragrance J.* 2013, 28, 269–279.
- [30] Burt, S. *Int. J. Food Microb.* 2004, 223–253.
- [31] Cristani, M., d'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 6300–6308.
- [32] Gill, A.O., Holley, R.A. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 361–379.
- [33] Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S., Lu, Y. *Microb.Pathogs.* 2017, 113, 396–402.