

***Thymus* essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities**

S. Bouhdid¹, M. Idaomar¹, A. Zhiri², D. Baudoux², N. S. Skali¹ And J. Abrini¹

(1) Laboratoire de Biologie et Santé, Equipe de Microbiologie et de Biotechnologies appliquées, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Abdelmalek Essaâdi, BP 2121 93002, Tétouan. Maroc. E.mail:

abrini@fst.ac.ma

(2) PRANAROM INTERNATIONAL S. A. 37, Avenue Des Artisans. B-7822, Ghislenghien, Belgique.

Résumé

In the last years, there is an increasing concern regarding the safety and potentially adverse effects of synthetic chemicals used for food preservation or in medicine. Therefore, many research groups were interested to the functional role of natural products especially plant extracts. Essential oils extracted by distillation from aromatic plants are appreciated for their bioactive efficacy as fungicides, bacteriostatics, antioxidants, and other biological activities.

In this study, the essential oils obtained from *Thymus satureioides*, *Thymus vulgaris* and *Corydothymus capitatus* by steam distillation were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in order to determine their chemical compositions. The results demonstrated that the major components of these essential oils are borneol, thymol and carvacrol respectively.

The *in vitro* antioxidant activity was investigated with three different methods: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, β -carotene bleaching test and reducing power. Butylated hydroxytoluene (BHT) and ascorbic acid were employed as positive control. The obtained results showed that the oils can act as radical scavengers and displayed a lipid peroxidation inhibitory activity. The oils were also subjected to a screening for their possible antibacterial activity against a panel of Gram⁺ and Gram⁻ bacteria by using well diffusion assay. For all the oils no activity was observed against *Pseudomonas aeruginosa* strains while a good antibacterial effect was showed on other bacteria.

Mots clés : essential oils, chemical composition, antibacterial activity, antioxidant activity, *Thymus*

Introduction

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides produite au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) conduit à des modifications de goût, d'odeur et de couleur et par conséquent à la perte de la qualité et de la sécurité des aliments (Mau *et al.*, 2004). Les antioxydants de synthèse généralement utilisés en industrie alimentaire pour retarder l'oxydation des lipides se sont avérés responsables d'effets indésirables. En effet, l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) sont suspectés avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur (Namiki, 1990). D'un autre côté, l'usage extensif des agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux conduit à la sélection de souches bactériennes résistantes.

Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme

alternative pour le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation.

La famille des lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien et antioxydant. Dans cette famille, le genre *thymus* regroupe plusieurs espèces largement distribuées dans l'aire méditerranéenne et utilisées comme antibactériens et anti-inflammatoires dans la pharmacopée traditionnelle de la région. Ce travail résume les résultats de l'étude de la composition chimique, de l'activité antibactérienne et de l'activité antioxydante *in vitro* des huiles essentielles de *Thymus satureioides*, de *Thymus vulgaris* et de *Corydothymus capitatus*.

Matériel et Méthodes

1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles utilisées dans ce travail sont fournies par la société PRANAROM Internationale (Ghislenghien, Belgique). Elles sont extraites, à partir des sommités fleuries des plantes de *Thymus vulgaris* (France), de *Corydothymus capitatus* (Espagne) et de

Thymus satureioides (Maroc), par entraînement à la vapeur d'eau sous faible pression.

2. Souches bactériennes

Quatorze souches de référence ont été testées : *Echerichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110T, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 118, *Pseudomonas fluorescens* CECT 378, *Staphylococcus aureus* MBLA, *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Staphylococcus aureus* CECT 794, *Listeria innocua* CECT 4030, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Bacillus subtilis* DCM 6633, *Bacillus capsulas*, *Enterococcus faecium* CECT 410,

3. Analyse CPG-SM

Les huiles essentielles sont analysées en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse, HEWLETT PACKARD équipée d'une colonne capillaire (HP INNOWAX 60-0,5-0,25). Le gaz vecteur est l'Hélium (22 psi). La température du four est programmée à 50°C pendant 6mm, augmentée jusqu'à 250°C avec une vitesse de 2°C/mn et finalement 250°C maintenue à 250°C pendant 10mn.

4. Activité antibactérienne

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion en puits en utilisant le milieu Muller Hinton Agar comme couche basale et le milieu Luria Bertoni à 0.8% d'agar comme surcouche. L'activité antibactérienne est déterminée en terme du diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits après 24h d'incubation à la température adéquate pour le développement du germe en question.

5. Activité antioxydante

5.1. Technique de décoloration de la β -carotène (Miller, 1971)

5.2. Mesure du pouvoir réducteur (Oyaizu, 1986)

5.3. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (Blois, 1958)

6. Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA à une voie), suivie du test LSD sont réalisés avec le logiciel STATISTICA 6.0 (édition 1997). Le niveau de signification est fixé à 5%.

Résultats et discussion

1. Composition chimique

Les résultats de l'analyse des huiles essentielles de *Thymus satureioides*, *Thymus vulgaris* et *Corydothymus capitatus* par CPG-SM montrent que les composants majeurs sont respectivement le

borneol (26,40%), le thymol (36,58%) et le carvacrol (59,50%) (Tableau I).

Tableau I : Composants majeurs des trois huiles essentielles déterminés par CPG-SM

Huile essentielle	Composants majeurs
<i>Thymus satureioides</i>	Borneol (26,40%), Thymol (11,48%), Carvacrol (8,76%)
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol (36,58%), p-Cymène (16,51%), γ -Terpinène (13,70%)
<i>Corydothymus capitatus</i>	Carvacrol (59,50%), Thymol (7,37%)

2. Activité antibactérienne

Les résultats du test de l'effet antibactérien sont résumés dans le tableau II. Les huiles de *Corydothymus capitatus* et de *Thymus vulgaris thymoliferum* témoignent d'une activité antibactérienne intéressante surtout contre les bactéries Gram positives. En effet, *L. monocytogenes*, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée à ces deux huiles. Cette grande activité peut être reliée à la présence du carvacrol et du thymol qui sont majoritaires dans ces deux huiles. Ces deux composés phénoliques sont en effet connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Ettayebi *et al.*, 1999; Ultee *et al.*, 2000). L'huile essentielle de *Thymus satureioides* paraît moins active. On note aussi que les trois huiles sont inactives face aux trois souches de *Ps. aeruginosa* testées. Cette résistance de *Ps. aeruginosa* n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de sa membrane externe qui lui confère la résistance à la plupart des agents biocides (Mann *et al.*, 2000).

3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par trois méthodes différentes : la technique de décoloration de la β -carotène, le test du DPPH et la mesure du pouvoir réducteur. Pour ce dernier test, les résultats obtenus (Tableau III) montrent que les huiles testées présentent des valeurs élevées par rapport au control négatif ($p < 0.001$). L'huile de *Thymus vulgaris* est la plus active suivie de l'huile de *Corydothymus capitatus* et de celle de *Thymus satureioides* mais ces activités restent significativement inférieures à celle du BHT utilisé comme control positif ($p < 0.001$).

L'aptitude des huiles essentielles à inhiber la peroxydation des lipides, évaluée par la technique de décoloration de la β -carotène (figure 1), montre que l'oxydation de l'acide linoléique est efficacement inhibée par les trois huiles. En effet, l'huile de *Thymus satureioides* montre la plus grande activité avec 74,50% d'inhibition ($p < 0.001$), une activité qui reste significativement inférieure ($p < 0.001$) à celle du

BHT (98,59%). Pour les deux autres huiles, elles présentent des activités similaires ($p>0.05$).

Tableau II: Activité antibactérienne déterminée par la technique de diffusion en puits

	Diamètre de la zone d'inhibition* (mm)		
	<i>Corydothymus capitatus</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Thymus satureioides</i>
<i>Ps. aeruginosa IH</i>	8	8	8
<i>Ps. aeruginosa CECT 110T</i>	8	8	8
<i>Ps. aeruginosa CECT 118</i>	8	8	8
<i>Ps. fluorescens CECT 378</i>	11	12	11
<i>E. coli K12</i>	23	20	13
<i>S. aureus MBLA</i>	21	22	16
<i>S. aureus CECT 976</i>	20	20	15
<i>S. aureus CECT 794</i>	20	24	15
<i>B. subtilis DCM 6633</i>	25	23	19
<i>B. capsulas</i>	25	28	18
<i>E. faecium CECT 410</i>	22	32	13
<i>L. innocua CECT 4030</i>	30	34	21
<i>L. monocytogenes CECT 4032</i>	33	32	19

* : diamètre de la zone d'inhibition produite autour des puits par l'ajout de 50µl d'huile essentielle par puits (diamètre du puit inclus).

Les valeurs sont la moyenne de deux répétitions.

La densité cellulaire initiale est de 10⁶ UFC/ml.

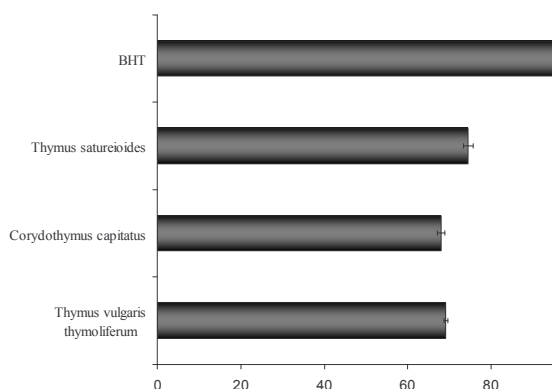


Figure 1 : Activité d'inhibition de la décoloration de la β-carotène.

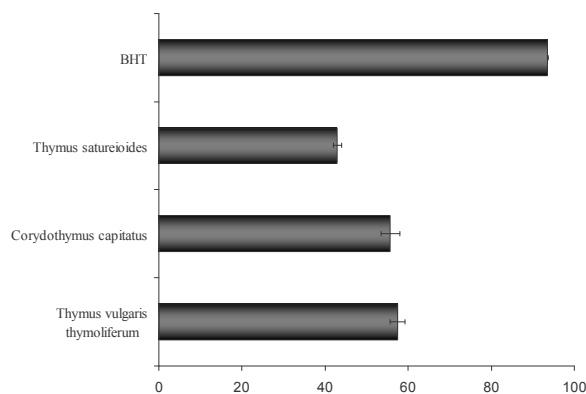


Figure 2 : Activité de piégeage du radical DPPH.

Tableau III: Pouvoir réducteur des trois huiles essentielles et du control positif (BHT)

Echantillon	Absorbance (700 nm)*
Control	0.046 ± 0.002
<i>Corydothymus capitatus</i>	0,651 ± 0,039
<i>Thymus vulgaris</i>	0,730 ± 0,010
<i>Thymus satureioides</i>	0,507 ± 0,019
BHT	1,568 ± 0,002

* Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

En ce qui concerne l'activité de piégeage du radical DPPH des huiles essentielles mesurée par le test du DPPH (figure 2), nous remarquons que les trois huiles réduisent la concentration de ce radical libre. L'activité de l'huile de *Thymus vulgaris* (57,46%) est similaire à celle de l'huile de *Corydothymus capitatus* (55,73%) ($p>0.05$) mais supérieure à celle de l'huile de *Thymus satureioides* (42,99%) ($p<0.001$). Cependant, cette activité est inférieure à celle du control positif (BHT) ($p<0.001$).

En conclusion, ces résultats préliminaires montrent que les trois huiles testées témoignent d'activités antibactériennes et antioxydantes *in vitro*. D'autres études sont nécessaires pour évaluer le potentiel *in vivo* de ces huiles sur des modèles animales.

Bibliographie

- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*: 26, 1199-1200.
- Ettayebi K. El Yamani J. et Rossi-Hassani B.D. 1999. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 183,191-195.
- Mann C.M. Cox S.D. et Markham J.L. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 294-297.
- Mann C.M. Cox S.D. et Markham, J.L. (2000). *Letters in appl. Microbiol.* 30, 294-297.
- Mau J-L. Huang P-N. Huang S-J. and Chen C-C. 2004. Antioxidant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry*. 86, 25-31.
- Miller HEA. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *J Am Chem Soc.* 45, 91-98.
- Namki. M. 1990. Antioxidants/ antimutagens in food. *Critical reviews in Food Science et nutrition.* 29, 273-300.
- Oyaizu, M. 1986. Studies of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition.* 44, 307-315.
- Ultee A. Slump R.A. Steging G. et Smid E.J. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J of Food Protection.* 620-624.