

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFQUE

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
du diplôme de Master

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

Activités anti-inflammatoire et anticancéreuse de l'huile essentielle de
thym (*Thymus vulgaris*)

Soutenu le 11-07-2021

Présenté par :

M^{lle} SAADOUDI Khadidja

M^{lle} SEIAFA Ines

Devant le jury composé de :

Mme Belkhiter.S	MCB	USDB1	Présidente
Mr Boukhatem M.N.	MCA	USDB1	Examineur
Mme Bokreta .S	MAA	USDB1	Promotrice

2020-2021

Remerciement

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Au terme de ce travail il nous est agréable de remercier toutes les personnes, qui ont participé de pré ou de loin, directement ou indirectement.

Tout d'abord, je remercie sincèrement Madame BOKRETA S. (Maître Assistante à l'Université Blida 1) notre promotrice qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance d'avoir accordé sa confiance et guidé dans notre travail tout au long de cette année, ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.

J'exprime mes respectueux remerciements aux jurys pour avoir accepté d'examiner ce travail.

À Madame Belkhitir S. (Maître de Conférences à l'Université Blida 1), nous sommes très honorées que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de nos sincères remerciements.

À Monsieur Boukhatem M.N. (Maître de Conférences à l'Université Blida 1): Vous nous avez honoré d'avoir examiné notre mémoire de fin d'études ; nous sommes très reconnaissantes et nous vous adressons nos sincères remerciements et soyez assurés de notre profonde gratitude.

Dédicaces

A mes chers parents, aucune dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments pour leurs patiences et leurs encouragements illimité durant toutes mes études.

A ma très chère mère

Aucune dédicace ne pourra exprimer les sentiments que j'éprouve pour toi, Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue vie, tu m'as toujours soutenue.

A mon très cher Père

Tu as toujours été pour moi un exemple, du père respectueux, Honnête, de la personne méticuleuse, je tien à honorer l'homme que tu es.

A ma très chère sœur Sanna ainsi que son marie, je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Mes chers frères Raouf et Ramzi que j'aime beaucoup.

A ma petite nièce adorée Aya et mon neveux Abd-Rahim que j'aime trop.

À mes chères amies et toute ma promo BMC

A mon binôme, ma moitié, Khadidja, t'es pour moi une sœur et une amie sur qui je peux compter ce travail n'aurait jamais pu réussir sans ton aide.

*A tous ceux qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin,
Merci...*

Ines

Dédicaces

*Du fond de mon cœur je dédie cet humble travail à mes
chers parents,*

A la mémoire de mon cher père

*Ce travail est dédié à mon chère papa, décédé très tôt, qui
m'a toujours poussé et motivé dans mes études, j'espère, du
monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste
comme preuve de reconnaissance de la part de sa petite fille
qui a toujours prié pour le salut de son âme, puisque dieu,
le tout puissant, de l'avoir en sa sainte miséricorde.*

Je t'aime PAPA

A ma très chère mère

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne
sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que
j'éprouve pour toi. Qu'ALLAH te protège et te donne la
santé, le bonheur et longue vie.*

*À ma chère sœur Hanane ainsi que son marie, et mon cher
frère Nadir et sa femme, je vous souhaite tout le bonheur
du monde.*

*Mon cher frère Walid adoré, et mes petites nièces que
j'aime trop Nourhane, Yasmine et Douaa.*

*À mon binôme, ma chère sœur que j'aime trop Ines, tu es
plus qu'une amie, merci à tous t'était toujours là pour moi,
j'oublierai jamais les merveilleux souvenirs.*

Khadija

Abstract

Thymus vulgaris is a medicinal and culinary plant known for its anti-infectious, anti-inflammatory and immunomodulatory activities. Reported pharmacological activities of *T. vulgaris L.* include antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and anticancer activities.

In this review, based on a meta-analysis of published researches, we proposed to examine and report the available data on the anti-inflammatory and anti-proliferative effect of this plant. The results obtained show that the various extracts and essential oils obtained from thyme have been efficient to treat inflammation and cancer due to its active compounds such as thymol and carvacrol. The review of the literature also indicated that the anti-inflammatory effect of thyme oil prevents the regulation of pro-inflammatory cytokine mRNA synthesis and secretions such as IFN alpha, IL-1, IL-6 and IL-8, decreasing leukocyte migration to sites of inflammation, inhibition of nitric oxide synthase synthesis or its entrapment and reduction of secretion of inflammatory mediators.

In addition, *T. vulgaris* is shown to be a potent inhibitor of proliferation in a concentration and time dependent manner which is concomitant with increased cell death activity by undergoing apoptosis, an increase in caspase 3/7 activity and a decrease of adhesion to fibronectin.

Indeed, on the basis of this research, *T. vulgaris L.* is a potential candidate to develop phytoceutical herbal drug, nutraceuticals, and to evaluate their clinical efficacy and safety.

Keywords: *Thymus vulgaris*, anti-inflammatory, anti-proliferative, Thymol, carvacrol

Résumé

Thymus vulgaris est une plante médicinale et culinaire connue pour ses activités anti-infectieuses, , anti-inflammatoires et immunomodulatrices. Les activités pharmacologiques rapportées de *T. vulgaris* L. comprennent des activités antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antivirales et anticancéreuses.

Dans cette revue articulée sur une méta-analyse d'articles publiés, une approche globale est proposée pour examiner et rapporter les données disponibles sur l'effet anti-inflammatoire et antiproliférative de cette plante. Les résultats obtenus montrent que les différents extraits et huiles essentielles obtenus à partir de thym ont été évalués et rapportés pour traiter l'inflammation et le cancer grâce à ses composés actifs tels que le thymol et le carvacrol. La revue de la littérature a également indiqué que l'effet anti-inflammatoire de l'huile de thym prévient de la régulation de la synthèse d'ARNm et les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires tels que IFN alpha, l'IL-1, IL-6 et Il-8, la diminution de la migration leucocytaire vers les sites d'inflammation, l'inhibition de la synthèse l'oxyde nitrique synthase ou son piégeage et la réduction de la sécrétion de médiateurs de l'inflammation.

De même, En ce qui concerne l'activité anti-tumorale potentielle, Il est prouvé que *T. vulgaris* est un puissant inhibiteur de la prolifération d'une manière dépendante de la concentration et du temps qui est concomitante à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose, une augmentation de l'activité de la caspase3/7 et une diminution de l'adhésion à la fibronectine.

En effet, sur la base de ces recherches, le *T. vulgaris* L. est un potentiel candidat afin de développer des médicaments à base de plantes, des nutraceutiques, et d'évaluer leur efficacité et leur sécurité cliniques.

Mots clés : *Thymus vulgaris*, anti-inflammatoire, anti-proliférative, Thymol, carvacrol

المخلص

الزعيترة، *Thymus vulgaris*، هو نبات طبي معروف بأنشطته المضادة للعدوى والمضادة للالتهابات والمناعة. تشمل الأنشطة الدوائية التي تم الإبلاغ عنها لـ *T. vulgaris* L. الأنشطة المضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة والمضادة للالتهابات والفيروسات والسرطان.

في هذه المراجعة، بناءً على تحليل المقالات المنشورة، تم فحص البيانات المتاحة حول التأثير المضاد للالتهابات والمضاد للتكاثر لهذا النبات. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المستخلصات والزيوت الأساسية المختلفة التي تم الحصول عليها من الزعر قد تم تقييمها والإبلاغ عنها لعلاج الالتهابات والسرطان بفضل مركباته النشطة مثل Thymol و Carvacrol. أشارت مراجعة المقالات أيضاً إلى أن التأثير المضاد للالتهابات لزيت الزعر يمنع تنظيم ARN وإفرازات السيتوكين المسببة للالتهابات مثل IFN alpha و IL-1 و IL-6 و IL-8، ويقلل من هجرة الكريات البيض إلى مواقع الالتهاب، وتثبيط إنتاج أكسيد النيتريك أو انحباسه وتقليل إفرازه. من الوسطاء الالتهابيين.

وبالمثل، فيما يتعلق بالنشاط المضاد للورم، فقد ثبت أن *T. vulgaris* مثبت قوي للتكاثر بطريقة تعتمد على التركيز والوقت والتي تترافق مع زيادة موت الخلايا. انخفاض في الالتصاق بـ Fibronectin بناءً على هذا البحث، يعتبر *T. vulgaris* L. مرشحاً محتملاً لتطوير الأدوية العشبية والمغذيات وتقييم فعاليتها السريرية وسلامتها.

الكلمات المفتاحية : الزعيترة، *Thymus vulgaris*، مضاد للالتهابات ، مضاد للتكاثر ، Thymol ، carvacrol

Table de matière

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

<i>Introduction</i>	1
<i>Chapitre I : Rappels bibliographiques</i>	3
I. Généralité sur les huiles essentielles	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Localisation et lieu de synthèse.....	3
I.3. Composition chimique.....	3
I.4. Domaine d'application.....	4
I.5. Toxicité de l'huile essentielle.....	4
I.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	5
❖ Hydrodistillation.....	5
II. Monographie de la plante étudiée : Le Thym commun (<i>Thymus vulgaris L.</i>)	6
II.1. Description morphologique	6
II.2. Dénomination.....	6
II.3. Taxonomie.....	7
II.4. Habitat et répartition géographique.....	7
II.5. Composition et principes actif	8

II.6. Principales utilisations	8
II.7. Propriétés biologiques et pharmacologiques du Thym.....	9
a. Activité antioxydante.....	9
b. Activité anti-inflammatoire	9
c. Activité antimicrobienne	10
d. Activité anti-tumorale	10
III. Inflammation.....	12
III.1. Généralités	12
III.2. Types d'inflammation	14
III.3. Médiateurs de l'inflammation.....	15
IV. Cancer.....	17
IV.1. Généralités sur le cancer	17
IV.2. Genèse des cellules cancéreuses.....	17
IV.3. Importance des produits naturels issus de plantes dans le traitement du cancer.....	20
<i>Chapitre II : Matériel et Méthodes (Protocole Expérimental Prévu).....</i>	21
1. Matériel.....	21
a. Matériel végétale.....	21
b. Matériel animal.....	21

2. Méthodes.....	22
2.1.Extraction de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> par hydrodistillation.....	22
2.2.Étude de l'activité anti-inflammatoire	22
2.3.Étude de l'activité antiproliférative d'huile essentielle de thym.....	23
a. La lignée A549	23
b. Culture et entretien de la lignée cellulaire A549	24
c. Protocole d'évaluation de l'activité antiproliférative d'huile essentielle de thym	25
d. Expression des résultats et détermination des CI ₅₀	25
<i>Chapitre III : Résultats et discussion.....</i>	27
I. La composition chimique de <i>Thymus vulgaris</i>.....	27
II. Étude de l'activité anti-inflammatoire d'huile essentielle de <i>Thymus Vulgaris</i>	29
III. Étude de l'activité antiproliférative de <i>Thymus vulgaris</i>.....	45
1. Étude de la viabilité cellulaire.....	45
2. Effet de <i>T. vulgaris</i> sur l'apoptose.....	48
3. Étude de l'effet de <i>T. vulgaris</i> sur l'adhésion cellulaire et la capacité migratoire.....	49
<i>Conclusion.....</i>	64

Liste des Références

Annexes

Liste des Figures

Figure 1 : Extraction par l'Hydrodistillation	5
Figure 2 : <i>Thymus Vulgaris</i>	6
Figure 3 : Les différents mécanismes anticancéreux attribués au <i>Thymus Vulgaris</i>	11
Figure 4 : Les acteurs moléculaires et cellulaires de l'inflammation.....	13
Figure 5 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse	19
Figure 6 : effet anticancéreux des produits naturels et plantes médicinales ...	20
Figure 7 : Action de la succinate déshydrogénase sur la MTT	23
Figure 8 : Observation microscopique (X 200) de la lignée A549 en croissance normale dans son milieu de culture et fixé sur un support solide	24
Figure 9 : Effets du prétraitement de <i>T. vulgaris</i> sur la production de NO par LPS+/IFN	29
Figure 10 : Piégeage du NO par différentes doses d'extrait de <i>T. vulgaris</i>	30
Figure 11 : Analyse RT-PCR de l'expression de l'ARNm de l'iNOS et de la GAPDH dans les macrophages J774A.1 activés après un prétraitement avec un extrait de <i>T. vulgaris</i>	31
Figure 12 : Effets sur l'activité du promoteur COX-2 par les huiles essentielles dans BAEC	34
Figure 13 : Suppression dose-dépendante de l'activité du promoteur COX-2 par l'huile de thym et effets de la chélérythrine sur l'activité du promoteur	35
Figure 14 : Activation dose-dépendante du PPAR par l'huile de thym.....	36
Figure 15 : Effets sur l'activité du promoteur COX-2 par les composants de l'huile de thym et du thymol	37

Figure 16 : Activation de PPAR α et PPAR γ en réponse au carvacrol et au thymol	38
Figure 17 : Suppression de l'expression de l'ARNm de la COX-2 par le carvacrol dans les cellules U937 différenciées de type macrophage	39
Figure 18 : Suppression de l'expression de la protéine COX-2 en réponse à carvacrol dans des cellules U937 différenciées de type macrophage	39
Figure 19 : .Effets de l'huile essentielle (0,01ug/ml) sur la section des cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS par les cellules TH-P1	40
Figure 20 : Effets des huiles essentielles (0,01ug/ml) sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites par P. acnes par les cellules THP-1	41
Figure 21 : Réduction de la viabilité des cellules THP-1 (A) et des PBMC (B) en réponse à l'augmentation des concentrations des extraits <i>O. syriacum</i> et <i>T. vulgaris</i> et de diméthylsulfoxyde (DMSO)	45
Figure 22 : Effet cytotoxique sur les cellules THP-1 en réponse à l'augmentation des concentrations des extraits et de DMSO	46
Figure 23 : L'extrait de thymus vulgaris (TVE) inhibe la prolifération des cellules HCT116	47
Figure 24 : l'extrait de TVE induit l'apoptose des cellules HCT116	48
Figure 25 : TVE inhibe l'adhésion des cellules HCT116 à la fibronectine	49
Figure 26 : TVE inhibe la migration et l'invasion des cellules HCT116	50
Figure 27 : traitement par TVE de l'ADN sur gel d'agarose	51
Figure 28 : Les cellules colorées PI positives au microscope	52
Figure 29 : L'Effets du thym EOS sur la prolifération des cellules PANC-1 et U2OS	53
Figure 30 : Effets de l'HE de thym sur la distribution des cellules PANC-1 dans le cycle cellulaire et les phases sous-G1 et sur les niveaux de certaines protéines régulatrices pertinentes du cycle cellulaire	55

Figure 31 : Effets cytotoxiques de la viabilité cellulaire avec divers concentrations d'extrait éthanolique aqueux de <i>Thymus vulgaris</i> sur les cellules T47D calculées par dosage MTT	57
Figure 32 : Effets cytotoxiques de la viabilité cellulaire sur le traitement avec divers concentrations de TVAgNPs sur les cellules T47D calculées par Dosage MTT	58
Figure 33 : Test d'induction de l'apoptose par cytométrie en flux	59
Figure 34 : Évaluation immunohistochimique de la caspase-3 (cytoplasmique), Bax, Bcl-2, Ki67, VEGFA, Expression de VEGFR-2 et de MDA dans des cellules de carcinome mammaire de rat après l'administration de <i>T. vulgaris</i> en deux doses	60
Figure 35 : Immunoexpression de marqueurs de cellules souches cancéreuses (A) et d'épigénome (B) dans des cellules de carcinome mammaire de rat après traitement par <i>T. vulgaris</i>	61
Figure 36 : Statut total de méthylation du promoteur de l'ADN des gènes ATM, PITX2, RASSF1A, PTEN et TIMP3 dans les carcinomes mammaires du rat	62
Figure 37 : Expression relative des miARN de miR22, miR34a, miR210 et miR21 dans des carcinomes mammaires de rat	63

Liste des Tableaux

<u>Tableau I</u> : classification botanique de l'espèce <i>Thymus vulgaris</i> L.....	7
<u>Tableau II</u> : Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de thym.....	28
<u>Tableau III</u> : Effets de l'extrait de <i>T. vulgaris</i> sur la production de NO, la viabilité cellulaire et l'extraction de l'extrait végétal uniquement des radicaux NO libérés par PAPA NONOate	30
<u>Tableau IV</u> : Effets de l'administration alimentaire d'huile essentielle de thym sur a) la réaction DTH/CHS chez la souris ; b) œdème de la patte induit par la carraghénine chez la souris (épaisseur de gonflement × 10-2 mm)	33
<u>Tableau V</u> : Effets de l'administration alimentaire d'huile essentielle de thym à 5000 ppm sur la colite induite par le TNBS chez la souris : expression des ARNm de l'IL-1 β et de l'IL-6	34
<u>Tableau VI</u> : Le traitement par TVE sur la viabilité cellulaire	47
<u>Tableau VII</u> : Le traitement par TVE 0,4 mg/mL sur la viabilité cellulaire	48
<u>Tableau VIII</u> : Effet de traitement par TVE sur l'activité de la caspase3/7	49
<u>Tableau IX</u> : Effet de traitement par TVE sur l'adhérence cellulaire	50
<u>Tableau X</u> : Le traitement de la viabilité cellulaire dans les cellules PANC-1 et les cellules U2OSpar HET	53
<u>Tableau XI</u> : Caractéristiques histopathologiques des tumeurs 4T1 dans des souris Balb/c après un traitement avec <i>T. vulgaris</i>	62

Liste des abréviations

5-LOX :	5-lipoxygénase
AP-1 :	la protéine activatrice-1
CLR :	récepteurs de lectine de type C
COX :	cyclooxygénase
DAMP :	modèles moléculaires associés au danger
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC:	chromatographie à phase gazeuse
HE :	huile essentielle
HET:	huile essentielle de thym
IL :	Interleukine
iNOS :	oxyde nitrique synthase inductible
IRF-3 :	le facteur de régulation de l'interféron 3
LPS:	lipopolysaccharides
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases
MTT :	bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl) -2,5-diphenyl Tetrazolium
MyD88 :	le facteur de différenciation myéloïde 88
NF-κB :	Facteur nucléaire kappa B
NLR :	les récepteurs NOD-like
PAMP :	modèles moléculaires associés aux agents pathogènes
PAPA- NONOate :	propylamine propylamine NONOate
PPAR:	proliférateurs de peroxysomes
PRR :	de récepteurs de reconnaissance de formes
RB :	rétinoblastome

RIG : les récepteurs de type I-like gène inductible par l'acide rétinolique

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

T. vulgaris : *Thymus vulgaris*

TLR : les récepteurs Toll-like

TNBS : Trinitrobenzène Sulfonique

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TPA : Antigène Tissulaire Polypeptidique

TVE : Extrait de *Thymus vulgaris*

VEGF : récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire

Introduction

Introduction

Aujourd'hui, il existe une demande croissante pour l'utilisation d'ingrédients naturels et de leurs dérivés dans le traitement de différents problèmes de santé. Parmi elles, les huiles essentielles sont très appréciées et sont couramment utilisées de nos jours dans les cosmétiques, les soins de santé, la médecine traditionnelle et l'industrie alimentaire (Pirbalouti *et al.*, 2015). En raison de leur large éventail d'activités pharmacologiques, l'application des huiles essentielles est très répandue (Roby *et al.*, 2013). Ils ont un mode d'action complexe en raison de leur composition multiple. La composition des huiles essentielles est variable et l'action physiologique et la caractéristique organoleptique sont dominées par le constituant majeur défini par le « chémotype » (Belmalha *et al.*, 2015).

Les huiles essentielles volatiles peuvent facilement atteindre les parties supérieures et inférieures des voies respiratoires par inhalation. Ils possèdent des effets anti-inflammatoires (Ramalho *et al.*, 2015). Après l'infection, plusieurs événements moléculaires et cellulaires jouent un rôle dans la stimulation de l'inflammation aiguë initiale, ce qui conduit à l'accumulation de leucocytes et de protéines plasmatiques induites par les cytokines dérivées des cellules protectrices comme les cellules dendritiques, les mastocytes, les cellules endothéliales et les macrophages (Bonjardim *et al.*, 2012).

L'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris* L.) est utilisée comme thérapie complémentaire des maladies inflammatoires aiguës et chroniques. Les diverses activités biologiques de l'huile de thym sont liées à ses principaux composés phénoliques, le thymol et le carvacrol (Ismail *et al.*, 2020). L'effet anti-inflammatoire de l'huile de thym et de certains de ses principaux composants a été largement étudié et prouvé. L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a eu un effet sur les synthèses d'ARNm et les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires. Il a été révélé à plusieurs reprises que la synthèse d'ARNm et la libération de cytokines ne changent pas toujours parallèlement (Schmidt *et al.*, 2012). La synthèse des protéines et les modifications post-traductionnelles peuvent avoir des signaux régulateurs différents de ceux de la transcription ou il est possible que les premiers processus aient besoin de plus de temps que la synthèse de l'ARNm (Wang *et al.*, 2016).

Bien que l'apoptose soit l'un des mécanismes majeurs de la mort cellulaire induite par la chimiothérapie dans le cancer, les effets cytotoxiques des agents chimio thérapeutiques dans les cellules normales sont indésirables et très préoccupants (Zu *et al.*, 2010). Ainsi, il est

devenu nécessaire de rechercher de nouveaux agents chimio préventifs et antitumoraux pour explorer les stratégies de traitement qui augmentent spécifiquement la mort cellulaire par apoptose dans les cellules cancéreuses avec des effets minimes sur les cellules normales (Hussain *et al.*, 2013).

En ce qui concerne l'activité anti-tumorale potentielle, des applications possibles de médicaments pour la prévention du cancer ont été décrites (Ait M'Break *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que *T. vulgaris* a été signalé comme inhibant la prolifération d'une manière dépendante de la concentration et du temps (Çetinus *et al.*, 2013). Cette diminution de la prolifération était concomitante à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose, comme en témoigne l'augmentation de l'activité de la caspase3/7. De plus, il participe également à la diminution de l'adhésion à la fibronectine d'une manière dépendante de la concentration.

Ce travail se veut une revue de la littérature des propriétés anti-inflammatoire et anticancéreuse de huile essentielle de thym commun (*Thymus vulgaris*) afin de bien cerner les potentielles d'utilisation de cette plante thérapeutique en phytothérapie. À travers cette étude, nous essayons de mettre en évidence les mécanismes moléculaires et cellulaires anti-inflammatoire et antiprolifératives médie par l'huile essentielle de *T. vulgaris* et de souligner l'importance de sa consommation et son ajout réglementaire dans le régime alimentaire.

Rappels
Bibliographiques

I. Généralité sur les huiles essentielles

I.1. Définition

Selon la norme AFNOR NF'T 75-006, « l'huile essentielle désigne le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe, soit par distillation « sèche ». Elle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (AFNOR, 2000).

Une huile essentielle (HE) est un mélange naturel complexe de métabolites secondaires volatils, odorants et souvent liquides contenus dans des tissus végétaux spécialisés (Bruneton, 1993 ; Kalemba et Kunicka, 2003). Le terme "**huile**" désigne le lipophile (c'est-à-dire hydrophobe) et la nature visqueuse de ces substances alors que le terme "**essentiel**" signifie leur préciosité et leur parfum typique de **plantes** (Ben miri, 2019).

I.2. Localisation et lieu de synthèse

Parmi les 1.500.000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique. Il se trouve dans des cellules sécrétrices spécifiques. Ce sont des structures histologiques spécialisées servant à leur synthèse et à leur stockage. Les cellules sécrétrices sont rarement à l'état isolé, mais le plus souvent regroupées dans des poches (myrtacées, rutacées), dans des canaux sécréteurs (Apiacées) ou dans des poils sécréteurs (Lamiacées) (bouguerra, 2012 ; Boutarfaia, 2016).

Plusieurs plantes contiennent des huiles essentielles, cependant, des parties de plantes, qui constituent la principale source d'huile essentielle peuvent être différentes. Ceux-ci incluent fleurs (rose), les racines (iris), les feuilles (citronnelle), les graines (muscade), les fruits (vanillier), les écorces (cannelier)... etc. Pour certaines HE comme celles de lavande ou de sauge, c'est la plante entière qui est utilisée (Chen et al, 2003 ; Chwilet al, 2011 ; Boukhatem et al., 2019).

I.3. Composition chimique

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité de leur composition, tant en termes qualitatifs que quantitatifs. Ces huiles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Vainstein *et al.*, 2001 ; Pophof *et al.*, 2005 ; Sell, 2006).

Ces constituants appartiennent à deux groupes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane d'autre part (Dorosso Sonate, 2002).

Les facteurs qui déterminent le rendement et la composition des huiles essentielles sont nombreux. Ces paramètres comprennent les variations saisonnières, l'organe de la plante et le degré de maturité de la plante, l'origine géographique et la génétique (Anwar *et al.*, 2009).

Chaque huile essentielle est caractérisée par certains composés majeurs qui peuvent atteindre des niveaux élevés, par rapport à d'autres composés présents à l'état de traces, appelé chémotype (Zouari, 2013).

I.4. Domaine d'application

La composition chimique des HE confère à ces extraits aussi bien des propriétés odorantes et aromatiques que des activités biologiques et pharmacologiques diverses. Ces caractéristiques offrent des débouchés importants dans des nombreux domaines, y compris : l'industrie agroalimentaire, l'industrie pharmaceutique, la parfumerie et la cosmétologie, la médecine dentaire ainsi que la désinfection de l'air des systèmes de climatisation, notamment, dans le milieu hospitalier (Hajhashemi *et al.*, 2003 ; Burt, 2004). Elles sont largement utilisées dans la médecine alternative grâce à leurs propriétés antiseptiques, antispasmodiques, antioxydantes et antimicrobiennes (El Ajjouri *et al.*, 2008).

I.5. Toxicité de l'huile essentielle

Une utilisation inappropriée des huiles essentielles peut avoir des effets néfastes sur l'homme, tels qu'une irritation cutanée, des maux de tête et des nausées. La prudence est généralement requise si les huiles essentielles doivent être prises en interne ou utilisées sur des denrées alimentaires en raison des effets cancérigènes possibles de certaines d'entre elles. Appliquées à des doses non recommandées, les huiles essentielles peuvent provoquer des lésions fonctionnelles d'organes tels que l'estomac et le foie chez l'animal et probablement chez l'homme (Ngahang *et al.*, 2018).

I.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles est l'un des points critiques pouvant affecter le profil chimique de l'huile essentielle. De nombreuses techniques ont été développées pour obtenir des huiles essentielles telles que l'extraction assistée par micro-ondes, la distillation à la vapeur, l'hydrodistillation, l'enfleurage et l'extraction par solvant (Rassem *et al.*, 2016 ; Khan *et al.*, 2018).

❖ Hydrodistillation

C'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE. Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition (Boukhatem *et al.* 2019). Le matériel végétal à distiller se trouve en contact direct avec l'eau bouillante. Les vapeurs d'eau et d'huile essentielle se condensent dans le réfrigérant et séparées de l'eau aromatique par différence de densité (Figure 1).

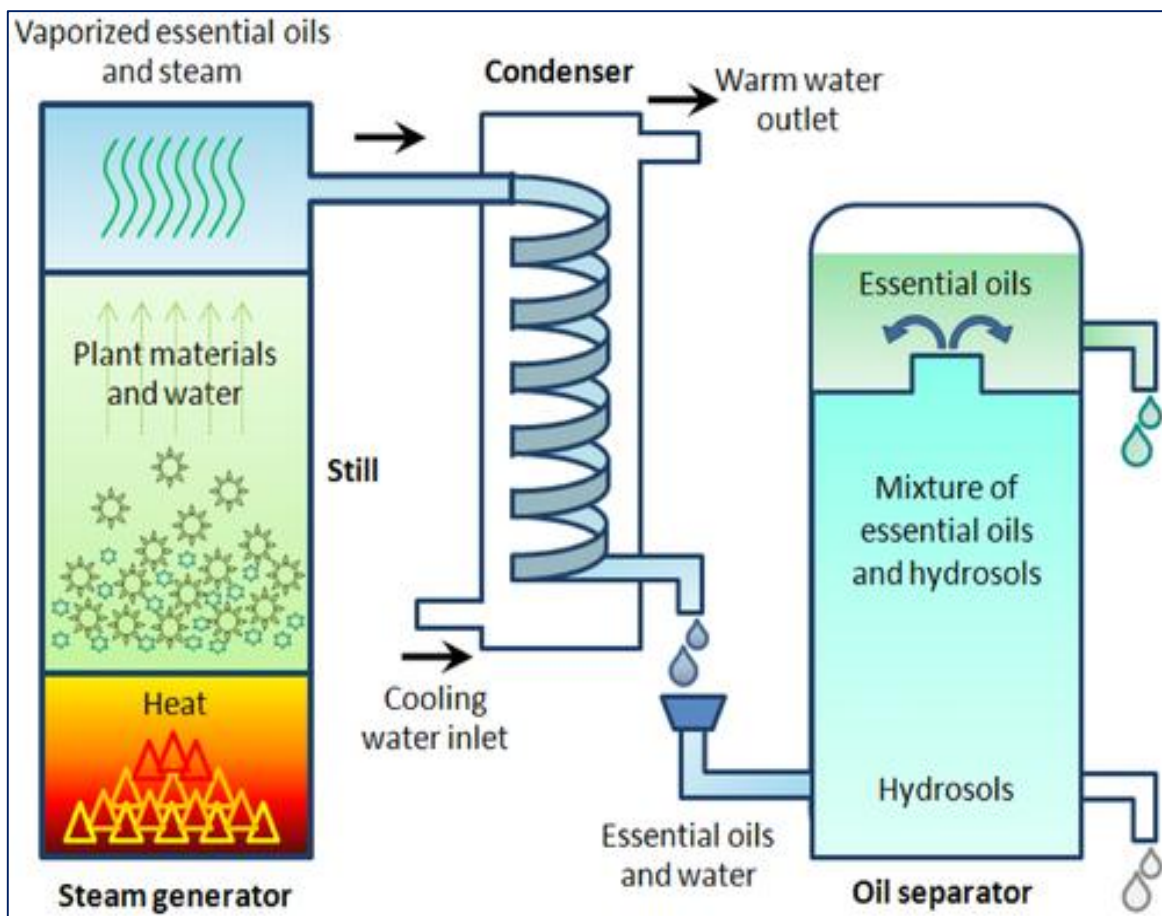


Figure 1 : Extraction par l'Hydrodistillation (Tongnuanchan *et al.*, 2014)

II. Monographie de la plante étudiée : Le Thym commun (*Thymus vulgaris* L.)

II.1. Description morphologique

Thymus vulgaris (Thym) est une petite herbe médicinale perpétuelle qui appartient à la famille des *Lamiacées* (Jamzad, 2009) ; l'une des plus grandes familles et des plantes à floraison, avec environ 220 genres et pratiquement 4000 espèces dans le monde.

Thymus vulgaris est une plante aromatique, sous-arbrisseau vivace, à croissance droite qui mesure 10–30 cm de hauteur avec une base ligneuse. D'une couleur vert blanchâtre ou grisâtre, très aromatique, avec des tiges ligneuses, dressées ou ascendantes, non radicales, tortueuses, ce qui forment un petit buisson très serré. Les feuilles sont de couleur gris verdâtre à bord étroit. Il a de nombreuses tiges dures et ramifiées (10 à 20 cm de hauteur) et des fleurs qui fleurissent de mai à septembre, au parfum distinctif, peuvent être de couleur blanche ou violette (Figure 2). En raison de son fort arôme dû au thymol, il est largement cultivé comme herbe culinaire (Pirbalouti *et al.*, 2015).



Figure 2 : *Thymus Vulgaris* (Almanea *et al.*, 2019)

II.2. Dénomination

les espèces du genre *Thymus* possèdent plusieurs dénominations ; en Amazigh : Azukni, Tazuknite, en Arabe : Ziitra, zaatar (Belmalha *et al.*, 2015). Son nom dérive du mot grec « thymos » qui signifie parfumer à cause de l'odeur agréable que la plante dégage ou thymos qui signifie force : plante aromatique et stimulante. Il a d'autres noms vernaculaires arabe comme : djertil, hamria, hamzoucha, khieta et mazouqach (Beloued , 2001).

II.3. Taxonomie

La classification botanique de l'espèce *Thymus vulgaris* L. est donnée ci-dessous (Tableau I):

Tableau I : classification botanique de l'espèce *Thymus vulgaris* L.

Régne	<i>Plantaea</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes (Phanérogames)</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous Classe	<i>Astériidae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae (labiées)</i>
Genre	<i>Thymus</i>

II.4. Habitat et répartition géographique

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales en regard de sa superficie et sa diversité bioclimatique. Le thym comprend plusieurs espèces réparties sur tout le littoral (Saidj, 2006). Il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée (Dob *et al.*, 2006 ; Hazzit *et al.*, 2009).

C'est un genre très répandu dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest. On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya.

La plante pousse bien dans un climat aride et dans des zones non ombragées dans un sol grossier, rugueux et bien drainé qui ne convient généralement pas à de nombreuses plantes (Javed *et al.*, 2013).

II.5. Composition et principes actif

Plusieurs études ont rapporté que le thym est une source riche en composés bioactifs. Parmi les composants phénoliques de l'huile essentielle (HE) de thym figurent le thymol et le carvacrol, ce dernier étant un isomère du premier. Le thymol apporte à HE de thym ses particularités olfactives. Selon le lieu d'origine et les espèces de thym, cette huile offre des pourcentages de teneur en phénol allant de 40 à 80 % de thymol et jusqu'à 55 % de carvacrol (Rota *et al.*, 2008 ; Fachini-Queiroz *et al.*, 2012).

Le thym contient des phénols monoterpéniques, dont le carvacrol (0,4 à 20,6%), le thymol (10 à 64%) et le p-cymène (9,1–22,2%) et d'autres monoterpènes, tels que l' α -pinène (0,9–6,6%), le 1,8-cinéole (0,2–14,2%), le camphre (0–7,3%), le linalol (2,2–4,8%) et bornéol (0,6–7,5%) (Burt *et al.*, 2004). L'huile essentielle de thym est également une source de linalol, d' α -terpinéol, de camphre, de caryophyllène et de γ -terpinène (Tepe *et al.*, 2005).

En outre, il a été rapporté que les extraits méthanoliques de thym sont des sources de **flavonols**, tels que la quercétine-7-O-glucoside, et d'acides phénoliques (acides p-coumarique, caféique, rosmarinique, cinnamique, carnosique, férulique, quinique et caféoylquinique) , ainsi que les **flavanones** (naringénine, apigénine). En utilisant d'autres solvants, tels que le butanol, l'acétate d'éthyle et l'hexane, d'autres composés peuvent être extraits du thym, notamment les saponines, les stéroïdes, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tanins (Roby *et al.*, 2013).

II.6. Principales utilisations

Le Thym est utilisé pour ses effets expectorants, antihelminthiques, antispasmodiques, antioxydants, sédatifs, antiseptiques, antirhumatismaux, antibactériens, carminatifs, antifongiques, antiviraux, diaphorétiques, antimicrobiens, antihypertenseurs et autres effets bénéfiques (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012).

L'importance du thym est également reportée par plusieurs études. Il aide à guérir les plaies, à traiter les nausées, la fatigue, la rétention d'eau, les problèmes du système respiratoire, les rhumes et la toux (Palaniappan and Holley, 2010 ; Kifer *et al.*, 2016 ; Pérez-Recalde *et al.*, 2018). Il est également bénéfique pendant les périodes menstruelles et dans le traitement des problèmes de ménopause. La peau grasse et les cicatrices et même la dépression peuvent être gérées par une consommation régulière de thym. Il aide à prévenir la

chute des cheveux ; à traiter l'acné et à renforcer également la mémoire (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

L'huile essentielle de thym contribue à améliorer les infections buccales. De nombreux insectes tels que les puces, les poux, les moustiques et les papillons de nuit peuvent être éloignés avec HE de thym. De plus, Il est utilisée dans les industries commerciales comme conservateur et antioxydant (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012 ; Sharifi-Rad *et al.*, 2016).

Selon la Food and Drug Administration, il est également reconnu comme étant sans danger pour être utilisé comme additif alimentaire, utile dans la conservation des aliments et comme agent aromatisant (Zhang *et al.*, 2014). Il est responsable de la désinfection des pesticides et peut être utilisé sans danger comme désinfectant de surface, réactifs de laboratoire, microscopie et parfumerie. Bénéfique à utiliser dans les bains de bouche pour tuer les bactéries lorsqu'il est combiné avec de l'alcool, des substances volatiles et de la glycérine (Komaki *et al.*, 2016).

II.7. Propriétés biologiques et pharmacologiques du Thym

Thymus vulgaris est utilisé depuis l'Antiquité pour le traitement de différents problèmes de santé. La plante possède une variété de propriétés biologiques et pharmacologiques (Patil *et al.*, 2021).

a. Activité antioxydante

Les antioxydants naturels inhibent la propagation des réactions des radicaux libres, protégeant ainsi le corps humain des maladies et ralentissant le rancissement oxydatif des lipides dans les aliments, remplaçant les additifs synthétiques potentiellement nocifs. Le thym possède une activité anti-oxydante très puissante (Tepeet *et al.*, 2007 ; Llana-Ruiz-Cabello *et al.*, 2015 ; Deng *et al.*, 2016 ; SedaghatDoost *et al.*, 2019).

b. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des HE de *T. vulgaris* peut être principalement attribuée à son composé principal, le thymol. En effet, des études antérieures pourraient démontrer des propriétés anti-inflammatoires pour ce composé (Fachini-Queiroz *et al.*, 2012 ; Riella *et al.*, 2012). Le thymol semble interférer avec l'activité de l'élastase, un marqueur de la maladie inflammatoire produite par les neutrophiles activés (Braga *et al.*, 2009), et inhibe la COX (Veras *et al.*, 2013). Comme déjà souligné, la forte activité antioxydante du thymol contribue également à l'activité anti-inflammatoire (Tsai *et al.*, 2011).

De plus, il a été démontré que l'HE de thym réduisait la sécrétion de médiateurs de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-8 (Tsai *et al.*, 2011). De plus, des composés mineurs, comme le p-cymène et le linalol, peuvent également contribuer à l'activité anti-inflammatoire : le p-cymène s'est avéré bloquer les voies de signalisation NF- κ B et MAPK, réduisant ainsi la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β (Zhong *et al.*, 2012). Le linalol inhibe l'oxyde nitrique synthase inductible et donc les effets pro-inflammatoires du NO (Peana *et al.*, 2006). En conclusion, il a pu être démontré que les HE de *T. vulgaris* possèdent une activité anti-inflammatoire considérable à des doses très inférieures aux concentrations toxiques.

c. Activité antimicrobienne

Il est reporté des activités antibactériennes et antifongiques *in vitro* de cette huile essentielle sur certains agents pathogènes humains, notamment *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus mirabilis*, *Propionibacterium acnes* et *Salmonella*. Les principaux constituants de l'huile essentielle de feuilles de *Thymus vulgaris* sont 2 composés phénoliques, le thymol (2-isopropyl-5-méthylphénol) et son isomère de conformation, le carvacrol (5-isopropyl-2-méthylphénol). Les autres composants de l'huile essentielle sont l'éther méthylique de thymol, le cinéol, le cymène, le α -pinène et le bornéol. On pense principalement que les activités antimicrobiennes de l'huile de *Thymus vulgaris* sont liées à la teneur en thymol et en carvacrol de l'huile, notamment par l'altération de la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique, de l'interaction avec l'ADN génomique bactérien et en entraînant la libération incontrôlée de matériaux intracellulaires tels que les ions potassium nécessaires au métabolisme normal et à la survie des bactéries (Michalska-Sionkowska *et al.*, 2017 ; Ferreira *et al.*, 2019 ; Kavooosi *et al.*, 2013 ; Moeini *et al.*, 2020 ; Walczak *et al.*, 2020).

d. Activité anti-tumorale

T. vulgaris a démontré des activités chimiopréventives et thérapeutiques significatives contre le carcinome expérimental. Les mécanismes anti-tumoraux de *Thymus vulgaris* sont présentés dans la figure suivante (Figure 3).

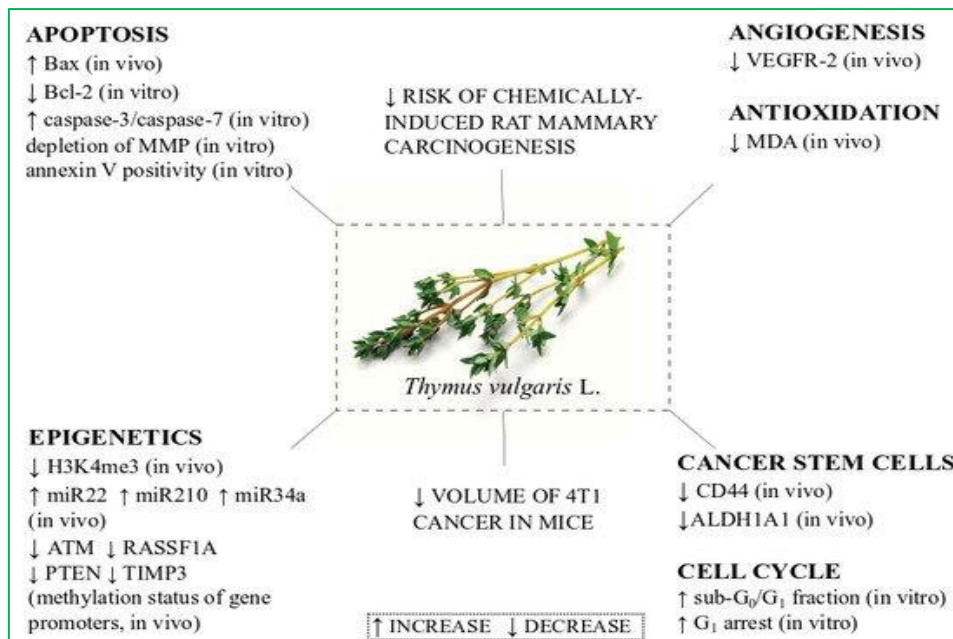


Figure 3 : Les différents mécanismes anticancéreux attribués au *Thymus Vulgaris* (Kubatka *et al.*, 2019)

III. Inflammation

III.1. Généralités

La réponse inflammatoire est l'activation coordonnée des voies de signalisation qui régulent les niveaux de médiateurs inflammatoires dans les cellules tissulaires résidentes et les cellules inflammatoires recrutées dans le sang suite à une agression (Lawrence, 2009). Bien que les processus de réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et de son emplacement dans le corps, ils partagent tous un mécanisme commun, qui peuvent être résumé comme suit :

- 1) les récepteurs de la surface cellulaire reconnaissent les stimuli nuisibles ;
- 2) les voies inflammatoires sont activées ;
- 3) des marqueurs inflammatoires sont libérés ;
- 4) des cellules inflammatoires sont recrutées.

Les structures microbiennes connues sous le nom de modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) peuvent déclencher la réponse inflammatoire par l'activation de récepteurs de reconnaissance de formes (PRR) codés par la lignée germinale exprimés dans les cellules immunitaires et non immunes. Certains PRR reconnaissent également divers signaux endogènes activés lors de lésions tissulaires ou cellulaires et sont connus sous le nom de modèles moléculaires associés au danger (DAMP) (Brusselle et Bracke, 2014) (Figure 4.a).

Les classes de familles de PRR comprennent les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs de lectine de type C (CLR), les récepteurs de type I-like gène inductible par l'acide rétinoïque (RIG) et les récepteurs NOD-like (NLR) (Gudkov et Komarova, 2016). Les TLR sont une famille de PRR de mammifères hautement conservés qui participent à l'activation de la réponse inflammatoire. Plus de dix membres de la famille TLR ont été identifiés et les TLR sont les plus étudiés des PRR connus (Janeway *et al.*, 2002 ; Seong et Matzinger, 2004) (Figure 4.b). La transmission des PAMP et des DAMP est médiée par le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88) avec les TLR (Ozinsky *et al.*, 2000). La signalisation par TLR active une cascade de signalisation intracellulaire qui conduit à la translocation nucléaire de facteurs de transcription, tels que la protéine activatrice-1 (AP-1) et le NF- κ B ou le facteur de régulation de l'interféron 3 (IRF3) (Yamamoto et Takeda, 2010 ; Czerkies et Kwiatkowska, 2014) (Figure 4.c).

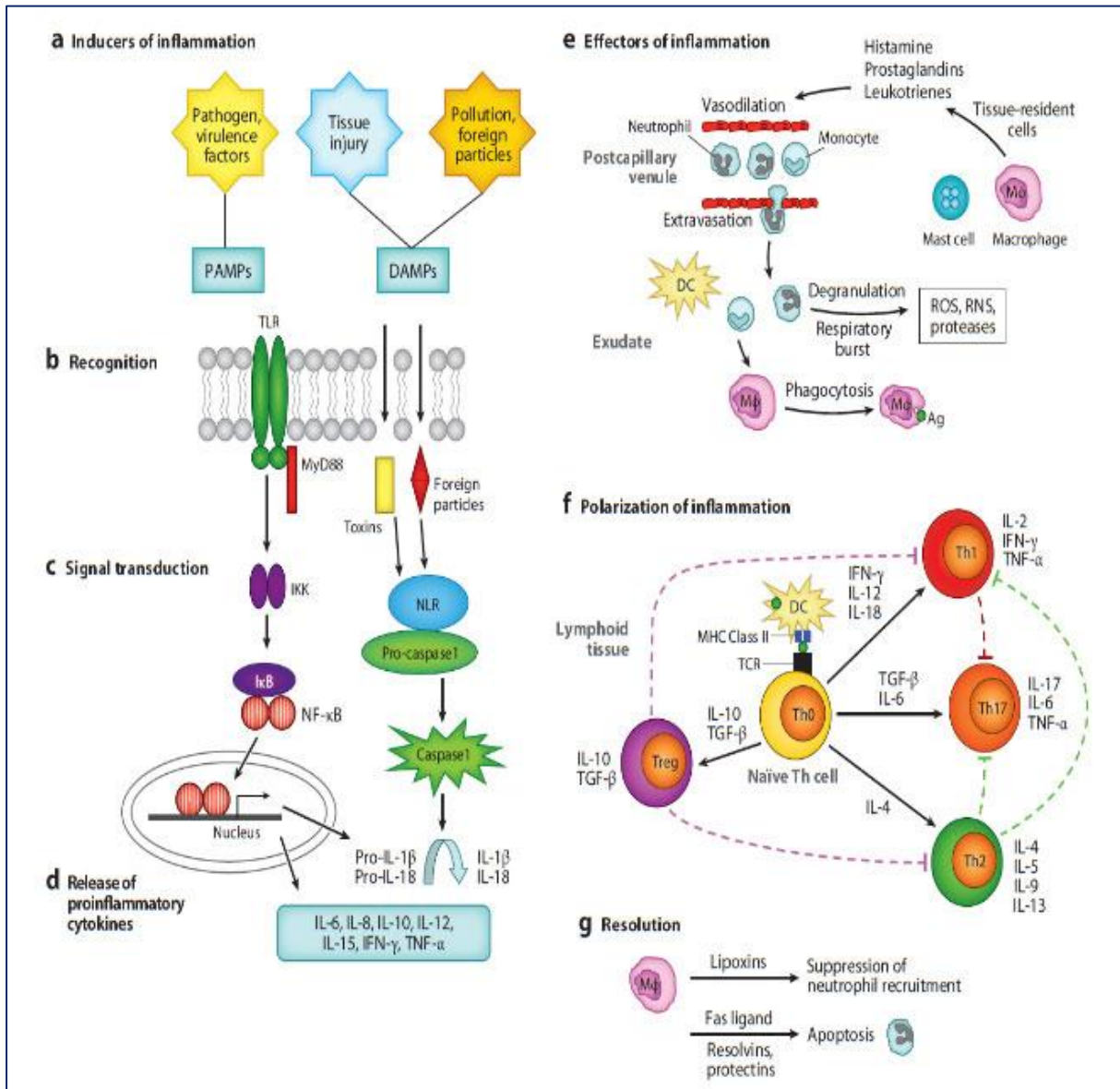


Figure 4 : Les acteurs moléculaires et cellulaires de l'inflammation (Patel et Patel, 2015)

La dérégulation de l'activité NF- κ B, MAPK ou JAK-STAT est associée à des maladies inflammatoires, auto-immunes et métaboliques et au cancer (Oeckinghaus *et al.*, 2011 ; Park *et al.*, 2015). La signalisation par des facteurs de transcription entraîne la sécrétion de cytokines (Opitz *et al.*, 2010). De multiples facteurs de transcription régulent une variété de gènes inflammatoires, tels que l'IL-1, le TNF- α , l'IL-6, le facteur de stimulation des colonies (CSF), les interférons, le facteur de croissance transformant (TGF) et les chimiokines (Figure 4.d).

III.2. Types d'inflammation

L'inflammation peut être de nature aiguë ou chronique. L'inflammation aiguë est de durée relativement courte. Elle est associée à un œdème et à une infiltration de neutrophiles. La résolution de l'inflammation aiguë implique la destruction, la dilution ou la ségrégation de l'agent nocif (Opitz *et al.*, 2010). Une caractéristique de l'inflammation aiguë sont des changements dans le débit et le calibre vasculaires qui se produisent dans une séquence ordonnée d'événements et entraînent éventuellement une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'exsudation de fluide contenant des protéines plasmatiques (œdème). Initialement, une vasoconstriction transitoire des artérioles se produit, suivie d'une vasodilatation dans l'artériole entraînant la création de nouveaux lits microvasculaires dans la zone touchée (Headland *et al.*, 2015).

La vasodilatation est importante car elle provoque une augmentation du flux sanguin, une caractéristique des changements hémodynamiques précoces de l'inflammation aiguë. Une perméabilité accrue de la microvascularisation induit un ralentissement de la circulation et une stase (Diapédèse leucocytaire). Une fois que la stase commence, les leucocytes, principalement les neutrophiles, adhèrent à l'endothélium vasculaire (margeage et adhésion des leucocytes). Certains des leucocytes adhérents finissent par migrer à travers la paroi vasculaire dans le tissu interstitiel et émigrer vers les chimioattractants produits par le tissu blessé (émigration). Ces leucocytes phagocytent et dégradent les bactéries, les complexes immuns et les débris cellulaires par des mécanismes dépendants et indépendants de l'oxygène. La génération de métabolites d'oxygène est attribuée à l'activation de la NADPH oxydase qui oxyde la NADPH et réduit ainsi l'oxygène en ion superoxyde (O_2^\ominus) qui est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Oeckinghaus *et al.*, 2011 ; Park *et al.*, 2015). Les substances actives stockées dans les granules leucocytaires, comme le lysozyme, sont responsables de mécanismes indépendants de l'oxygène (Reville *et al.*, 2006).

Contrairement à l'inflammation aiguë, l'inflammation chronique est moins uniforme et de plus longue durée, entraînant finalement une destruction supplémentaire des tissus et une augmentation du tissu conjonctif (fibrose). L'inflammation chronique peut résulter d'épisodes répétés d'inflammation aiguë ou lorsque le stimulus déclencheur est persistant, provoquant une réponse couvante de faible intensité. Ce dernier est observé avec certains micro-organismes intracellulaires (par exemple les bacilles tuberculeux), les maladies auto-immunes (par exemple la polyarthrite rhumatoïde) ou les fibres ou cristaux pulmonaires toxiques. Histologiquement, l'inflammation chronique est associée à l'infiltration de cellules nucléaires

mononucléées (c'est-à-dire de macrophages et de lymphocytes plutôt que de neutrophiles) et à la prolifération de cellules endothéliales et de fibroblastes qui conduit à la formation d'une néovascularisation.

L'activation des macrophages locaux et le recrutement et l'activation continus des cellules mononucléées de la périphérie jouent un rôle majeur dans l'inflammation chronique par la libération de produits sécrétoires. Certains agents induisent un schéma caractéristique d'inflammation chronique appelé granulomes entraînant une maladie granulomateuse. Les granulomes consistent en un ensemble de macrophages modifiés, appelés cellules épithélioïdes, entourés d'un bord de lymphocytes. La fusion de ces cellules épithélioïdes forme des cellules géantes multinucléées et éventuellement des granulomes.

III.3. Médiateurs de l'inflammation

Une variété de médiateurs chimiques provenant du système de circulation, des cellules inflammatoires et des tissus lésés contribuent activement à ajuster la réponse inflammatoire (Figure 4.e).

Les médiateurs chimiques libérés comprennent :

- (1) des amines vasoactives telles que l'histamine et la sérotonine,
- (2) des peptides (par exemple, la bradykinine)
- (3) des eicosanoïdes (par exemple, des thromboxanes, des leucotriènes et des prostaglandines) (Halliwell et Gutteridge, 2015).

Les marqueurs inflammatoires peuvent être prédictifs de maladies inflammatoires et être en corrélation avec les causes et les conséquences de diverses maladies inflammatoires, telles que les maladies cardiovasculaires, les dysfonctionnements endothéliaux et les infections (Cesari *et al.*, 2003 ; Ross, 2009 ; Machowska *et al.*, 2016 ; Cheng *et al.*, 2017). Les stimuli activent les cellules inflammatoires, telles que les macrophages et les adipocytes, et induisent la production de cytokines inflammatoires et la polarisation de l'inflammation (Figure 4 f), telles que IL-1 β , IL-6, TNF- α , et des protéines et enzymes inflammatoires (Gupta *et al.*, 2012 ; Czaja, 2014 ; Turner *et al.*, 2014).

Ces molécules peuvent potentiellement servir de biomarqueurs pour le diagnostic des maladies, le pronostic et la prise de décision thérapeutique (Eckersall et Bell, 2010 ; Huang *et al.*, 2010 ; Lopresti *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2016).

Les réponses inflammatoires aiguës et chroniques sont initiées, propagées et arrêtées par des médiateurs provenant du plasma, des cellules endommagées, des cellules témoins ou des cellules infiltrantes. Bien que les médiateurs inflammatoires soient libérés dans une certaine mesure de manière séquentielle, il est plus approprié de les considérer comme agissant de concert (Gudkov et Komarova, 2016). Les médiateurs synthétisés par le foie et retrouvés dans le plasma comprennent les protéines composant le complément, la kinine et les systèmes de coagulation/fibrinolytique. Les produits préformés libérés par les cellules comprennent des amines vasoactives, telles que l'histamine et la sérotonine ainsi que des enzymes lysosomales (Serhan *et al.*, 2005). Des exemples de substances nouvellement synthétisées libérées par les cellules comprennent les prostaglandines et les leucotriènes. Les produits sécrétés par les leucocytes, en particulier les macrophages, jouent un rôle majeur dans l'inflammation chronique. Ces produits comprennent des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, des enzymes telles que des protéases, des collagénases et des élastases, des lipides bioactifs et des cytokines (Lintermans *et al.*, 2014).

Les cytokines ont de nombreux rôles dans l'inflammation, y compris la croissance cellulaire et la chimiotaxie et, lorsqu'elles sont produites localement, affectent l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, la croissance des hépatocytes, les réponses métaboliques hépatiques, le système cardiovasculaire, le catabolisme musculaire et adipocytaire et les réactions hématopoïétiques-lymphoïdes (Sugimoto *et al.*, 2016).

IV. Cancer

IV.1. Généralités sur le cancer

Le domaine de l'oncologie a rapidement évolué, notamment depuis la révolution de la biologie moléculaire dans les années 1970. L'exposition chimique, le métabolisme et les dommages causés à l'acide désoxyribonucléique (ADN) offrant une compréhension plus complète de l'étiologie de la cancérogenèse (Loeb et Harris, 2008). Il est maintenant bien admis que la cancérogenèse implique de multiples facteurs qui vont des expositions à des produits chimiques, des mutations des proto-oncogènes et des suppresseurs de tumeurs dues à des étiologies exogènes et endogènes, et une régulation ou des activités discordantes de nombreuses voies de signalisation critiques nécessaires à l'homéostasie cellulaire normale (Amjad *et al.*, 2015).

IV.2. Genèse des cellules cancéreuses

De nombreux produits chimiques peuvent former des liaisons covalentes avec des régions nucléophiles sur des nucléotides dans l'ADN, en particulier des proto-oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs. En absence d'une réparation précise des adduits de l'ADN, ces modifications chimiques peuvent entraîner des changements dans les gènes codés, ce qui peut à son tour amorcer la transition de la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse (Amjad *et al.*, 2015; Leone *et al.*, 2017; Tortorella *et al.*, 2015). En effet, un certain nombre de « points chauds » d'ADN ont été identifiés dans certains gènes tels que le rétinoblastome (RB) ou p53 (TP53) qui sont particulièrement sensibles aux dommages de l'ADN par les intermédiaires électrophiles générés par le métabolisme des produits chimiques auxquels les humains sont exposés dans l'environnement (Coussens *et al.*, 1985; Mitri *et al.*, 2012).

Le cancer est clairement une maladie complexe qui est médiée par de nombreuses voies moléculaires et cellulaires (Pardoll, 2012). Le schéma général des événements causant le cancer est que les cellules acquièrent d'abord des mutations conductrices dans des gènes critiques qui conduisent à une expression altérée de protéines avec différentes activités qui conduisent collectivement à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. En raison de la signalisation chronique pour augmenter la prolifération et/ou diminuer l'apoptose, ces cellules se développent de manière clonale dans les tumeurs (Frohlich and Wahl, 2015; Glass and Saijo, 2010; Mueller *et al.*, 1998; Ninomiya *et al.*, 2014; Wan *et al.*, 2011).

Au fur et à mesure que la tumeur continue de croître, des changements dans le métabolisme cellulaire se produisent, qui peuvent inclure une utilisation accrue de différents substrats d'énergie pour « nourrir » la tumeur et priver les cellules normales environnantes de nutriments essentiels. De nouveaux vaisseaux sanguins peuvent se former (angiogenèse) en raison de l'état anoxique d'une tumeur qui fournit plus d'oxygène à la tumeur. Ceci est médié par les récepteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire [VEGF] (Glodkowska-Mrowka *et al.*, 2016; Prost *et al.*, 2015).

Au fur et à mesure que la tumeur continue de croître et d'obtenir différentes mutations, les tumeurs peuvent devenir agressives et commencer à migrer et à envahir les membranes cellulaires, conduisant finalement à des métastases vers d'autres tissus. Une fois que les tumeurs ont métastasé, le processus peut se poursuivre et finalement conduire à la mort (Glodkowska-Mrowka *et al.*, 2016).

Tous ces événements sont régulés par de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires. Ainsi, un bon nombre des voies qui modulent les processus associés à différents cancers sont conservées dans le sens où il existe un chevauchement considérable entre les différents cancers) (Amjad *et al.*, 2015).

Par exemple, une expression/activité différentielle de protéines oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs tels que MYC ou PTEN, respectivement, est souvent observée dans de nombreux types cellulaires différents. De plus, des mutations similaires dans les gènes oncogènes ou suppresseurs de tumeurs sont souvent observées dans plusieurs cancers (Kandoth *et al.*, 2013). Ceci est probablement lié aux changements observés dans les voies de signalisation cellulaire médiées par RAS, ERK, PDPK1, TP53 et bien d'autres, car ils convergent généralement vers la régulation de la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation, l'angiogenèse, la migration et l'invasion cellulaires, les activités immunologiques, et l'inflammation. Malgré le chevauchement significatif de ces voies de signalisation, il existe clairement des signatures de signalisation moléculaires et cellulaires uniques pour de nombreux cancers différents (Gong *et al.*, 2018; Grigor *et al.*, 2017) (Figure 5).

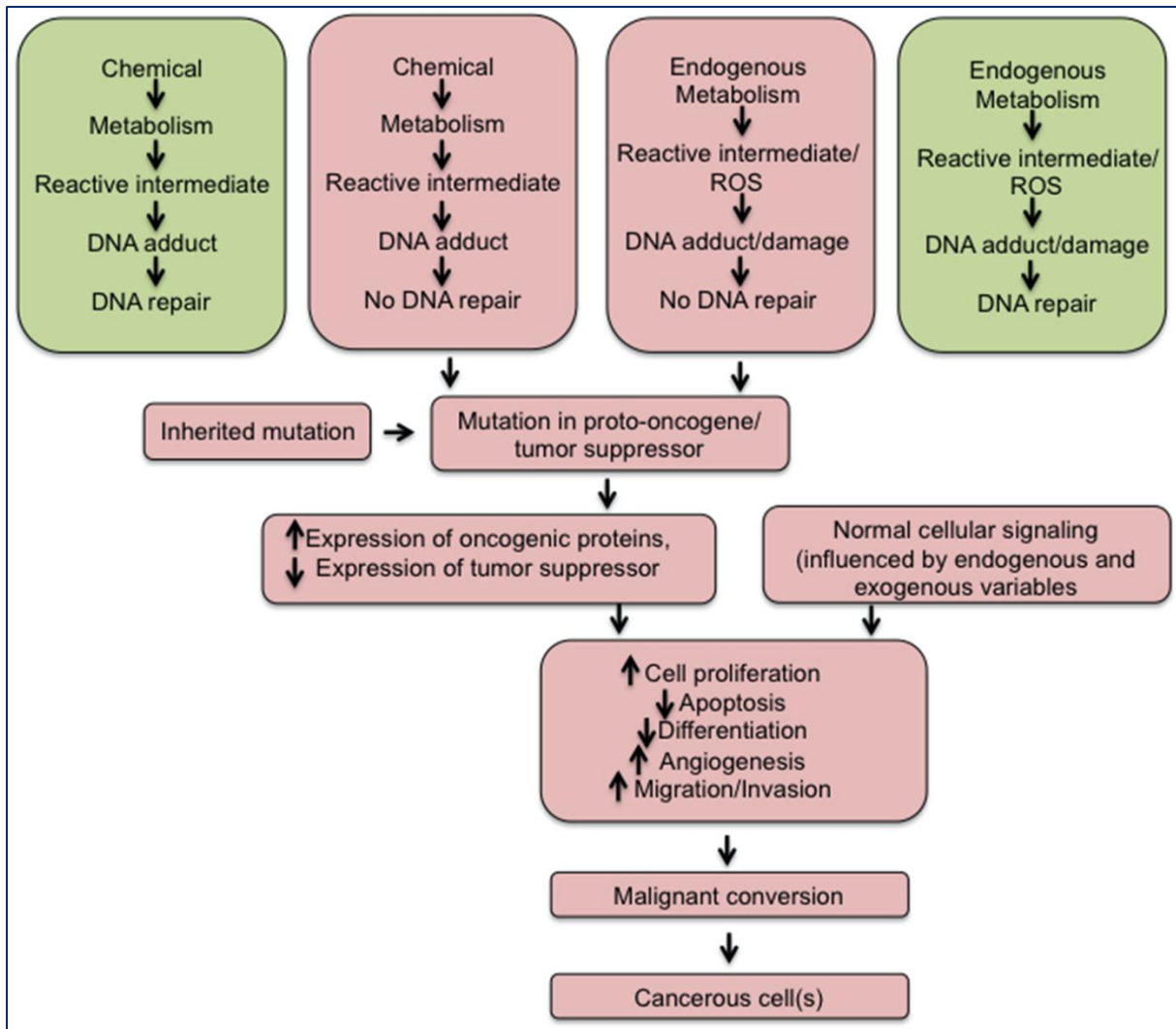


Figure 5 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse (Patterson *et al.*, 2018)

IV.3. Importance des produits naturels issus de plantes dans le traitement du cancer

L'utilisation de produits phytochimiques à base de plantes et alimentaires comme agents chimiopréventifs contre divers cancers a présenté une activité antiproliférative par le biais de divers mécanismes d'action, notamment la suppression du PEG-2, l'inhibition de la COX-2, l'activation des JNK et des MAPK, l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation des oncogènes, la réduction de la potentiel membranaire mitochondrial, augmentation des ROS, etc (Efferth *et al.*, 2019). Ces composés phytochimiques à base de plantes et alimentaires dérivés de diverses sources ont montré leur activité anticancéreuse, seuls ou en combinaison et ont considérablement amélioré l'activité chimiopréventive contre les cellules cancéreuses (Özenver *et al.*, 2020) (Figure 6).

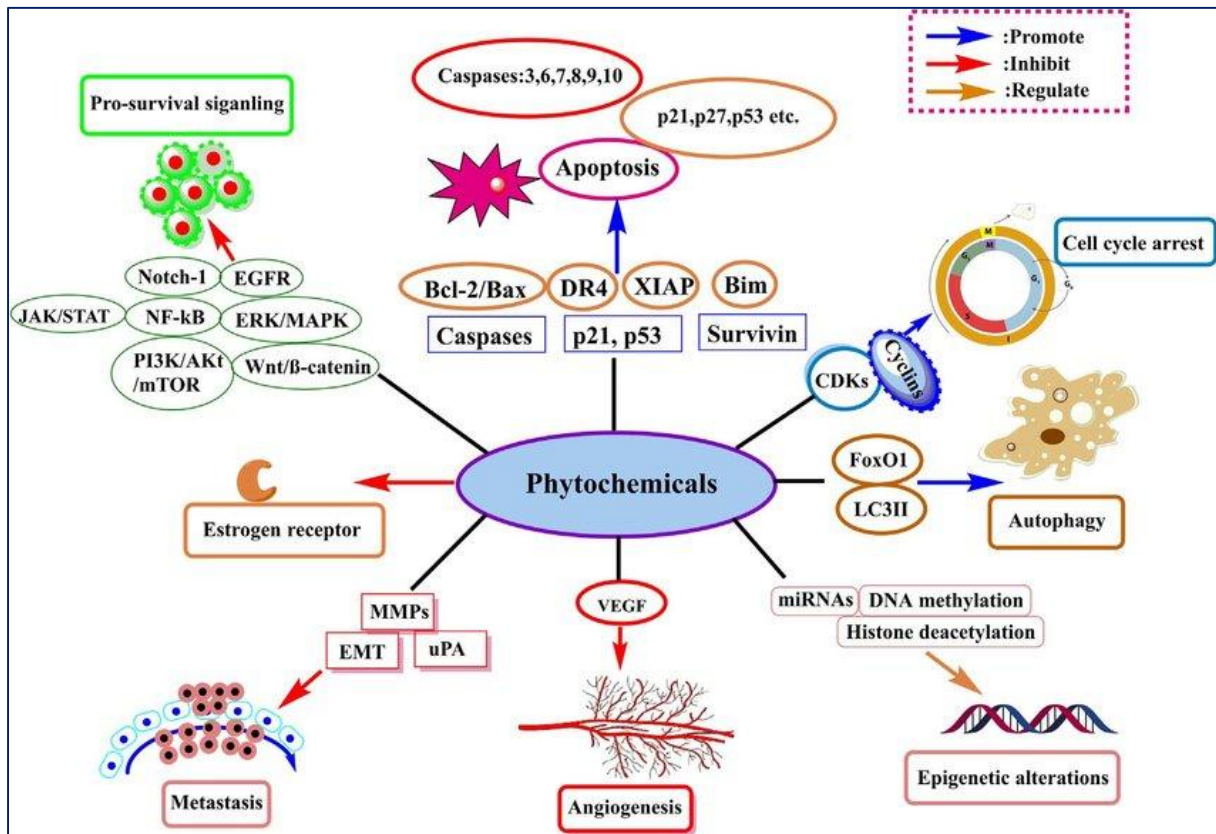


Figure 6 : effet anticancéreux des produits naturels et plantes médicinales (Iqbal *et al.*, 2018)

*Matériel
et Méthodes*

II. Matériel et Méthodes (Protocole Expérimental Prévu)

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de master en Biologie Moléculaire et Cellulaire, notre recherche s'articule sur :

Premièrement, l'extraction et la détermination de la composition chimique de *Thymus vulgaris*.

Puis, la mise en évidence de l'effet bénéfique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* dans la prévention et la diminution de l'inflammation (effet anti-inflammatoire).

Et en fin, nous investiguons les différents mécanismes affectés par le thym et qui contribuent à son effet antiprolifératif.

En effet, suite à la propagation de la pandémie liée au COVID-19 dans le monde entier et en Algérie, c'était difficile de trouver un lieu de stage pour faire la pratique, ce qui a répercuté négativement sur notre projet de fin d'études. Nous étions dans l'obligation donc de présenter un mémoire bibliographique basée sur une analyse des articles dont le chapitre matériel et méthodes est théorique (protocole expérimental prévu).

1. Matériel

a. Matériel végétale

Le matériel végétal *Thymus Vulgaris* a été prévu récoltées à partir de la région de Blida. La partie aérienne de la plante (tiges, feuilles et fleurs) sont séchés à l'air à l'ombre à température ambiante pendant deux semaines.

b. Matériel animal

Des rats Wistar mâles adultes (150-200 g) de l'animalerie étant prévus être utilisés. Les rats sont ensuite été maintenus dans des cages en plastique et maintenus dans un cycle lumière-obscurité de 12 heures à 25 ± 2 °C de la température ambiante deux semaines avant que les rats ne commencent à être placés en observation. L'animal est prévu être manipulé conformément au comité d'éthique et des recommandations formulées concernant les soins et la manipulation appropriés des animaux.

2. Méthodes

Dans le cadre de cette analyse de revue, pour identifier les études pertinentes (Annexe), nous avons effectué une revue systématique de la littérature à l'aide d'EMBASE, PubMed, OVID, Cochrane Library, Clinicaltrials.gov et Google Scholar jusqu'au juin 2021. Les termes de recherche étant en anglais et en français et comprenaient une combinaison des mots clés suivants : *Thymus vulgaris*, thym, huile essentiel, extrait, inflammation, effet anti-inflammatoire, cancer, antiproliférative, apoptose.

2.1.Extraction de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* par hydrodistillation

Une quantité de 200 g de feuilles fraîches de Thym était prévu être hachée grossièrement et immergée dans 1,5 L d'eau distillée contenue dans un flacon de 3 L. La distillation doit être effectuée à l'aide d'un appareil en verre de Clevenger modifié. Le processus d'extraction sera effectué pendant 3 h après la première goutte de distillat jusqu'à épuisement complet de l'installation.

La distillation commence après un temps de chauffage de 40 min. La condensation s'effectue en continu avec de l'eau refroidie à 5°C. Les huiles essentielles extraites seront récupérées, séchées avec du sulfate de sodium anhydre, conservées au réfrigérateur à 4°C dans des flacons ambrés hermétiquement fermés, à l'abri des sources de contamination et collectées avant utilisation.

2.2.Étude de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été prévue mesurée en tant qu'inhibition de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. Une inflammation de la peau sera induite à la surface interne de l'oreille droite de souris (surface : environ 1 cm²) en appliquant 240 mg d'huile de croton dissous (5%). L'oreille gauche est restée non traitée. L'évolution de l'œdème de l'oreille droite a été déterminée au cours du temps. De même, différentes concentrations de l'huile essentielle de thym étant prévu d'être appliqués avant et après l'induction de l'inflammation.

À la fin de l'expérience, les souris seront sacrifiées et des pièces circulaires doivent être prises des oreilles traitées et non traitées et conservé dans le formol 10% pour une durée de 6 à 24h pour une étude histopathologique. La fixation est suivie par une étape de déshydratation comme la cire de paraffine est hydrophobe. Les blocs de paraffine sont ensuite

coupés par un microtome en des fines coupes de 5 micromètres d'épaisseur puis déparaffiné et colorées.

2.3. Étude de l'activité antiproliférative d'huile essentielle de thym

L'activité antiproliférative d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est déterminée par l'utilisation du MTT (bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl) -2,5-diphenyl Tetrazolium). Ce test est réalisé sur une lignée de cancer bronchique : la lignée A549.

Ce test donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Il consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus (figure 7). Après dissolution dans l'isopropanol ou le DMSO (Diméthylsulfoxyde) des cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée à 550 nm (Mosmann, 1983). Les absorbances obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes.

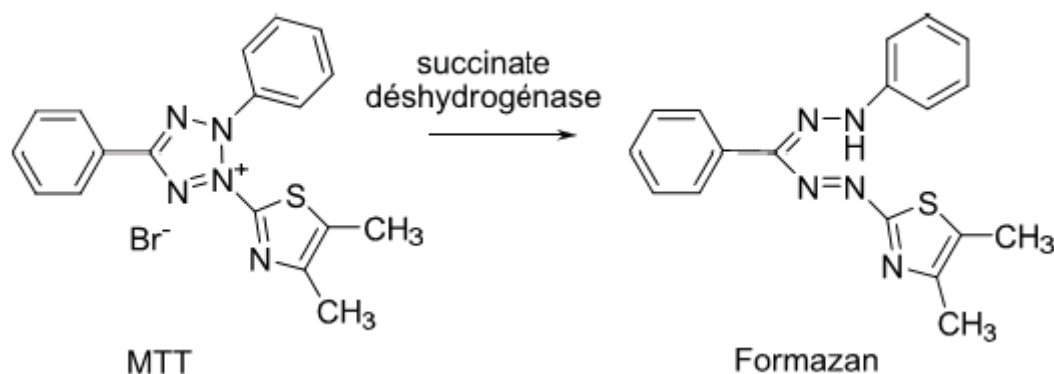


Figure 7 : Action de la succinate déshydrogénase sur la MTT (Mosmann, 1983)

a. La lignée A549 : La lignée A549 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans (Giard et coll., 1973). Elle est conservée dans la banque de lignées du NCI (réf. Collection ATCC n°CCL-185). Il s'agit d'une lignée hypo triploïde qui possède 24% de cellules à 12 chromosomes, 22% à 64 chromosomes, les autres cellules étant diploïdes. La lignée est tumorigène chez la souris nude et a conservé le type sauvage du gène p53. La figure 8 est une observation microscopique (x200) de la lignée A549, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.

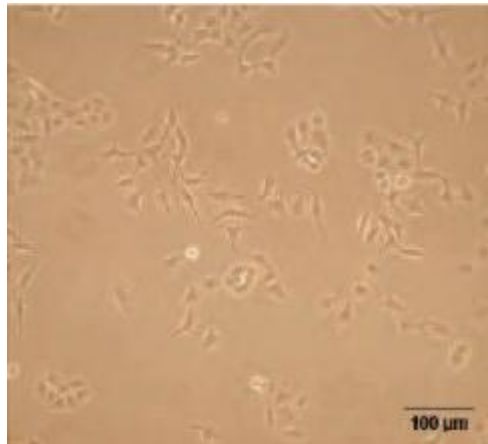


Figure 8 : Observation microscopique (X 200) de la lignée A549 en croissance normale dans son milieu de culture et fixé sur un support solide (Pasquet, 2011)

b. Culture et entretien de la lignée cellulaire A549

Les cellules cancéreuses sont cultivées en flasques à bouchon filtrant, 75 cm² dans 15 ml milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 additionné de 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), 1% d'antibiotiques (10000U pénicilline.ml⁻¹ et 10 mg streptomycine.ml⁻¹).

Les cellules sont incubées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours afin que les nutriments du milieu ne deviennent pas limitant pour le bon développement des cellules. De la trypsine (1X) est utilisée pour décrocher les cellules de leur support afin de procéder aux différentes expérimentations ou pour réaliser les repiquages.

Après récupération des cellules, la concentration cellulaire est déterminée par un comptage à la cellule de Mallassez. Les A549 sont utilisées à une concentration de 10⁵cellules/ml.

c. Protocole d'évaluation de l'activité antiproliférative d'huile essentielle de thym (Mosmann, 1983)

J-1: Dépôt des cellules en plaques 96 puits : Le milieu de culture contenant les cellules est déposé dans des plaques à raison de 100 ul dans chaque puits. Les cellules sont utilisées à une concentration de 1^{05} cellules/ml équivaut à 1^{04} cellules/100ul. Les plaques sont incubées 24h à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

JO : Dépôts de l'huile essentielle : Des solutions mères à 1mg/ml sont préparées, par solubilisation de l'huile essentielle de thym (HET) dans le DMSO à 1%. L'HET sont par la suite dissous dans le milieu de culture RPMI 1640 pour obtenir différentes concentrations (5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 75 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ et 150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Les plaques sont laissées à incuber pendant 72h à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité.

J3 : Révélation de la croissance : Après 72h d'incubation, le MIT dilué à 5mg.ml⁻¹ dans du tampon PBS (pH =7,4 ; 0,1M) puis au 1/10 dans le milieu culture RPMI 1640, est déposé à raison de 100ul dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 3h à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et à 95% d'humidité. Le milieu de culture est retiré, et les cristaux de formazan sont dissous dans 100ul d'isopropanol. L'absorbance dans chaque puits est mesurée à 550 nm par un lecteur de microplaques (TECAN Sunrise™) après 1h d'incubation.

d. Expression des résultats et détermination des CI₅₀ : Les CI₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) sont calculées pour 72h d'incubation des cellules, en phase exponentielle de croissance. La détermination des CI₅₀ se fait en deux temps :

Les pourcentages de croissance pour chacune des concentrations sont déterminés à partir de l'équation suivante :

$$\% Cx \text{ Croissance} = \frac{A Cx (550 \text{ nm}, 72h)}{A T (550 \text{ nm}, 72h)} \times 100$$

% Cx Croissance: Pourcentage de croissance des cellules en présence d'une concentration donnée d'huile essentielle.

A Cx (550 nm, 72h) : Absorbance mesurée à 550 nm après 72h d'incubation des cellules en présence d'une concentration donnée en huile essentielle.

A T (550 nm, 72h): Absorbance mesurée à 550 nm après 72h d'incubation des cellules en absence d'huile essentielle (témoin).

Cx : Concentration en extrait.

La CI50 est ensuite estimée graphiquement sur la courbe :

$$\% Cx \text{ croissance} = \text{Log} (C)$$

*Résultats
et Discussion*

I. La composition chimique de *Thymus vulgaris*

L'intérêt des produits photochimiques et des huiles essentielles en thérapie, la parfumerie, les cosmétiques et les additifs alimentaires augmente parmi les patients et les médecins, comme le montre clairement l'augmentation du marché de la phytothérapie (Musthaba *et al.*, 2010). Parmi tous ces médicaments à base de plantes, les huiles essentielles ont reçu un attrait considérable en raison de leur utilité biologique importante (Miladi *et al.*, 2013).

La composition des huiles aromatiques et volatiles est très influencée par nombreux facteurs : le génotype (espèce, cultivar, clone, écotype), écologique (origine géographique, conditions climatiques, composition du sol) et technologique (culture, types de collecte, stockage de matière brute et traitement technique) (Mancini *et al.*, 2015). Pour ces raisons, des plantes de la même espèce, mais provenant de contextes différents, peuvent exprimer des caractéristiques et des compositions chimiques différentes.

Également, *T. vulgaris* contient une odeur aromatique et un goût piquant chaud. Le parfum de cette plante est dû à l'huile essentielle, qui lui confère une valeur aromatique à des fins culinaires ainsi que ses propriétés médicinales (Boskabady *et al.*, 2006). Les études ont montré que *T. vulgaris* possède des propriétés carminatives, antimicrobiennes, myorelaxantes et antioxydantes (Lee *et al.*, 2005 ; Schawarz *et al.*, 1996).

La chromatographie à phase gazeuse (GC) est une technique idéale pour la séparation et l'identification des herbes contenant les constituants volatils et semi-volatils. Cela donne des informations sur le constituant disponible présent dans les herbes sans utiliser le marqueur chimique/biologique des plantes. Enfin, tous les constituants disponibles peuvent être séparés, fragmentés et caractérisés simultanément (Golmakani *et al.*, 2008).

Les composés chimiques trouvés dans *T. vulgaris* étaient des terpènes et des composés aromatiques. Les principaux composés étaient le thymol, le camphène, le caryophyllène, l'humulène, le -terpénol et le para-cymène.

Les analyses révèlent que l'huile hydro-distillée de *T. vulgaris* possède un certain nombre de composants. Ces composants bioactifs, présents dans Zaitra, agissent comme un médicament pour diverses maladies. Compte tenu des travaux publiés antérieurement, les chercheurs ont évalué la composition chimique de *T. vulgaris* (Tableau II).

Tableau II : Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de thym

Molécules	Boruga <i>et al.</i> , (2014) (%)	Gedikoğlu <i>et al.</i> , (2019) (%)	Boukhatem <i>et al.</i> , (2020) (%)
Alpha-Thujene	1,06	0.5 ± 0.07	
Alpha-Pinene	1,07	0.4 ± 0.01	2,80
Beta-Pinene	0,37		0,18
Beta-Myrcene	1,53	0.7 ± 0.16	1,05
Alpha-Phellandrene	0,33		0,16
Carene	3,76		
D-Limonene	0,29	0.4 ± 0.11	0,79
Phellandrene	0,21		0,16
Para-cymene	8,41	11.2 ± 1.89	12,8
Gamma-Terpinene	30,90	3.4 ± 0.37	11,17
Terpineol	0,47	0.1 ± 0.01	
Terpinen-4-ol	0,46	1.1 ± 0.30	0,42
Thymol	47,59	55.3 ± 1.2	3,99
Caryophyllene	2,68	4.2 ± 0.18	1,13
Linalool		1.7 ± 0.07	3,06
Carvacrol		8.7 ± 3.03	56,79

II. Étude de l'activité anti-inflammatoire d'huile essentielle de *Thymus Vulgaris*

Dans une étude menée par Vigo *et al.*, (2004), l'incubation des cellules J774.1 avec les lipopolysaccharides (LPS) + interféron gamma (IFN) γ a entraîné une augmentation maximale des concentrations de l'oxyde nitrique (NO) dans le milieu de culture après 24 h d'incubation par rapport à l'absence de nitrite détectable dans les cultures non traitées. L'extrait de *T. vulgaris* (aux doses de 8,5, 16,8, 50,4 et 84 g/mL) ont été administrés 5 h avant la stimulation LPS+ IFN γ , et la concentration en nitrites a été mesurée 24 h plus tard. Dans tous les cas, une inhibition dose-dépendante significative ($P < 0,001$) de la production de nitrite a été observée.

De plus, Vigo *et al.*, (2004) ont évalué la capacité de piégeage du NO par les extraits de *T. vulgaris*. L'activité de piégeage des radicaux NO des extraits et de *T. vulgaris* a été évaluée dans des expériences utilisant le donneur de NO propylamine propylamine NONOate (PAPA-NONOate). Ceci a montré une activité significative de piégeage du NO (Figure 9 et 10, Tableau III).

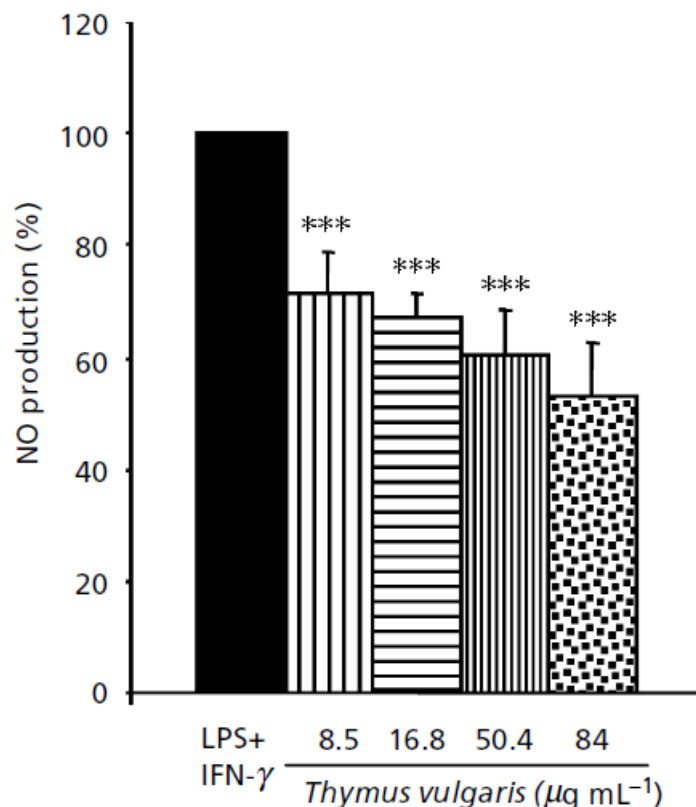


Figure 9 : Effets du prétraitement de *T. vulgaris* sur la production de NO par LPS+/IFN (Vigo *et al.*, 2004)

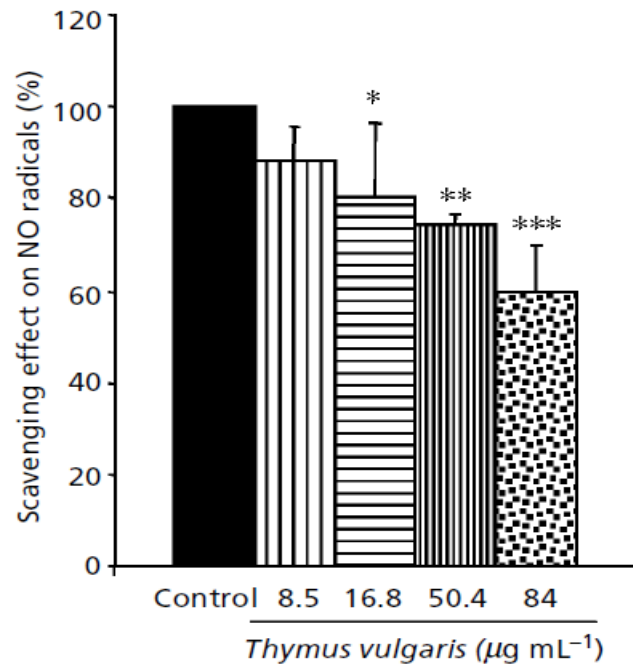


Figure 10 : Piégeage du NO par différentes doses d'extrait de *T. vulgaris*. (Vigo *et al* , 2004)

Tableau III : Effets de l'extrait de *T. vulgaris* sur la production de NO, la viabilité cellulaire et l'extraction de l'extrait végétal uniquement des radicaux NO libérés par PAPA NONOate (Vigo *et al.*, 2004).

		Nitrite (% de contrôle)	Viabilité cellulaire (% de contrôle)
Contrôle		100	100
<i>T. vulgaris</i> L. (ugmL-1)	8.5	71.4±7***	129.8±20.9
	16	67.2±3.9***	129.8±20.3
	50.4	50.4±8***	137.3±28.9
	84	52.6±9.8***	145±37.6

Aussi, l'extrait de *T. vulgaris* affecte les niveaux d'expression d'ARNm de synthèse d'oxyde nitrique inducible (iNOS) et de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase(GAPDH). L'amplification par Réaction en Chaîne par Polymérase PCR de l'ADNc préparé à partir de cellules J774A.1 a donné lieu à un produit de 499 pb correspondant à l'iNOS de souris et un produit de 309 pb correspondant à la GAPDH de souris. Les macrophages J774A.1 non stimulés avaient un ARNm iNOS à peine détectable ($0,14 \pm 0,05$). En revanche, une incubation de 24 heures avec LPS+ IFN γ induit une augmentation significative ($P<0,001$) ($0,86 \pm 0,06$) de l'expression de l'ARNm iNOS par rapport aux macrophages témoins. Le traitement des cellules avec des extraits de *T. vulgaris* a significativement réduit l'expression de l'ARNm d'iNOS par rapport aux cellules traitées par LPS+ IFN γ ($0,56 \pm 0,05$, $P<0,001$) (figure 11) (Vigo *et al.*, 2004)

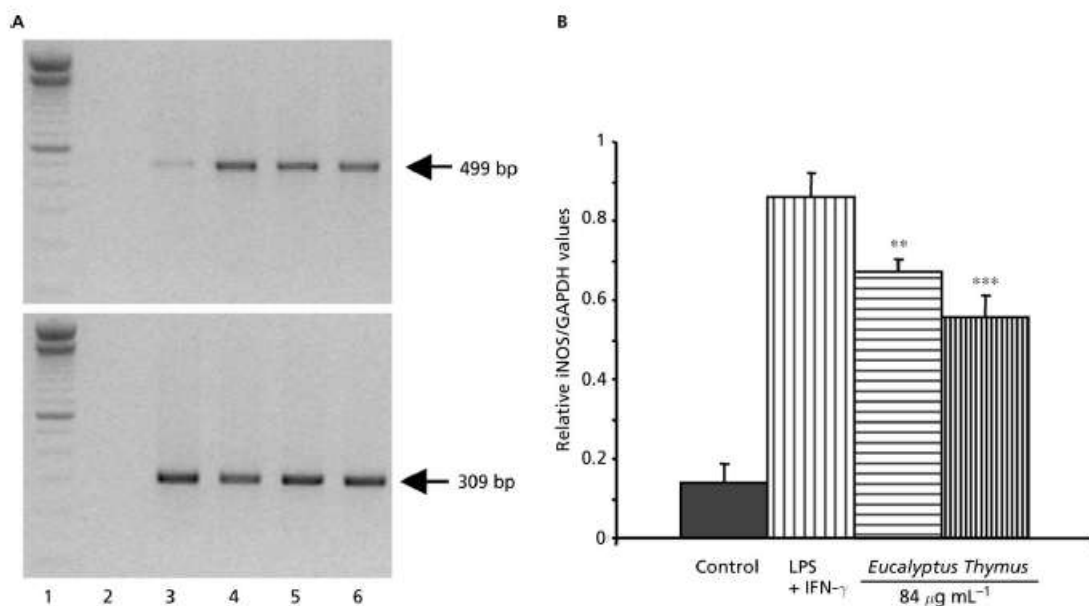


Figure 11 : Analyse RT-PCR de l'expression de l'ARNm de l'iNOS et de la GAPDH dans les macrophages J774A.1 activés après un prétraitement avec un extrait de *T. vulgaris*. (Vigo *et al.*, 2004)

Selon Juhas *et al.*, (2008), la consommation de régimes contenant de l'huile essentielle de thym a induit des modifications dose-dépendantes des inflammations cutanée médié par les lymphocytes T et spécifique d'un antigène (DTH) par l'oxazolone chez la souris. Après 24 h, des différences significatives ont été observées entre le gonflement des oreilles des souris sur 5000 ppm et 1250 ppm de l'huile essentielle de thym dans l'alimentation ($P < 0,05$) chez des souris BALB/c male. Le régime avec 5000 ppm d'HET a diminué les inflammations des oreilles chez les souris, tandis que le régime de 1250 ppm de l'huile essentielle de thym a produit une augmentation des gonflements des oreilles.

Après 48h, une augmentation significative du gonflement des oreilles chez les animaux à 1250 ppm ($P < 0,01$) et 2500 ppm ($P < 0,05$) d'huile essentielle de thym dans le régime a été observée. Une supplémentation alimentaire avec 5000 ppm de l'huile essentielle de thym a diminué les inflammations de l'oreille, mais les changements n'étaient pas significatifs.

Dans la même étude, les chercheuses ont observé des changements de réaction dose-dépendants dans les groupes expérimentaux d'huile essentielle de thym 2 h après l'induction de l'œdème de la patte par l'application de carraghénane. Une différence significative a été observée entre la formation d'œdème chez les souris nourries avec le régime avec 5000 ppm de l'huile essentielle de thym et chez les souris témoins ($P < 0,05$), tandis que la consommation du régime avec 1250 ppm d'HET a augmenté l'inflammation des pattes par rapport au groupe témoin, mais la différence n'était pas significative.

Les mesures à 4h et à 24h ont montré des différences significatives entre la formation d'œdème chez les souris traitées avec le régime l'huile essentielle de thym à 5000 ppm et chez les souris témoins ($P < 0,01$). Une diminution similaire du gonflement des pattes a été observée chez les souris nourries avec le régime HET de 2500 ppm 24 h après l'application de carraghénane ($P < 0,01$) (Juhas *et al.*, 2008).

D'autres résultats montrent que les dommages macroscopiques et microscopiques et le rapport poids du côlon/poids corporel des souris du groupe simulé étaient très significativement inférieurs à ceux des souris du groupeacide Trinitrobenzène Sulfonique (TNBS) ayant subi une induction de colite ($P < 0,001$). Le rapport poids du côlon/poids corporel et les scores de dommages macroscopiques/microscopiques chez les souris recevant 2500 ppm de l'huile essentielle de thym dans l'alimentation étaient comparables à ceux des souris du groupe TNBS.

Le régime de 1250 ppm de l'huile essentielle de thym a diminué le rapport poids du côlon/poids corporel et les scores de dommages macroscopiques/microscopiques par rapport aux souris du groupe TNBS, mais les changements n'étaient pas significatifs. Contrairement à cela, ils ont observé que le régime l'huile essentielle de thym à 5000 ppma significativement diminué les scores totaux de dommages macroscopiques/microscopiques des souris par rapport au groupe TNBS ($P < 0,05$), ainsi que le rapport poids du côlon/poids corporel dans ce groupe ($P < 0,05$) (Tableau IV).

Tableau IV : Effets de l'administration alimentaire d'huile essentielle de thym sur a) la réaction DTH/CHS chez la souris ; b) œdème de la patte induit par la carraghénine chez la souris (épaisseur de gonflement $\times 10^{-2}$ mm) (Juhás *et al.*, 2008)

a) DTH/CHS			
	n	24h	48h
Contrôler	14	35.5 \pm 8.3	15.2 \pm 4.8
TEO1250	12	41.8 \pm 5.4 *	22.0 \pm 5.3**
TEO 2500	12	37.8 \pm 5.0	18.8 \pm 3.4*
TEO 5000	13	30.9 \pm 3.9*	13.8 \pm 3.6

b) dème de la patte induit par la carraghénine				
	n	2h	4h	24h
Contrôler	12	43.7 \pm 9.5	36.8 \pm 7.9	55.3 \pm 9.3
TEO 1250	12	46.7 \pm 14.0	39.1 \pm 9.9	50.3 \pm 10.1
TEO 2500	12	42.8 \pm 12.4	31.6 \pm 13.9	44.4 \pm 7.4**
TEO 5000	12	34.2 \pm 13.7*	25.9 \pm 9.1**	39.9 \pm 10.8**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus CONTRÔLE.

Les résultats indiquent qu'une alimentation à 5000 ppm de l'huile essentielle de thym induit une diminution significative du degré d'inflammation colique, donc les expressions d'ARNm de IL-1 et IL-6 (Tableau V) (Juhás *et al.*, 2008).

Tableau V : Effets de l'administration alimentaire d'huile essentielle de thym à 5000 ppm sur la colite induite par le TNBS chez la souris : expression des ARNm de l'IL-1 β et de l'IL-6 (Juhás *et al.*, 2008).

	TNBS	TEO 5000
IL-1 β /ARN	746.7 \pm 1081.9	149.3 \pm 237.6 *
IL-6/ARN	733.1 \pm 587.5	237.5 \pm 302.6*

La cyclooxygénase-2 (COX-2), joue un rôle clé dans l'inflammation et l'homéostasie circulatoire. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) sont des facteurs de transcription ligand-dépendants appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires et sont impliqués dans le contrôle de l'expression de la COX-2, et vice versa. Hotta *et al.*, (2010) montrent que l'activité de COX-2 a été supprimée par les huiles essentielles dérivées du thym dans des tests de transfection cellulaire utilisant des cellules endothéliales artérielles bovines.

Hotta *et al.*, (2010) ont évalué les huiles commerciales disponibles dérivées de 21 sortes de plantes, chacune à une concentration de 0,01 %, et ont constaté que l'activité du promoteur COX-2 induite par le LPS était supprimée par le thym (65 %), le clou de girofle (40 %), rose (30 %), eucalyptus (25 %), fenouil (22 %) et huiles de bergamote (21 %) (Figure 12)

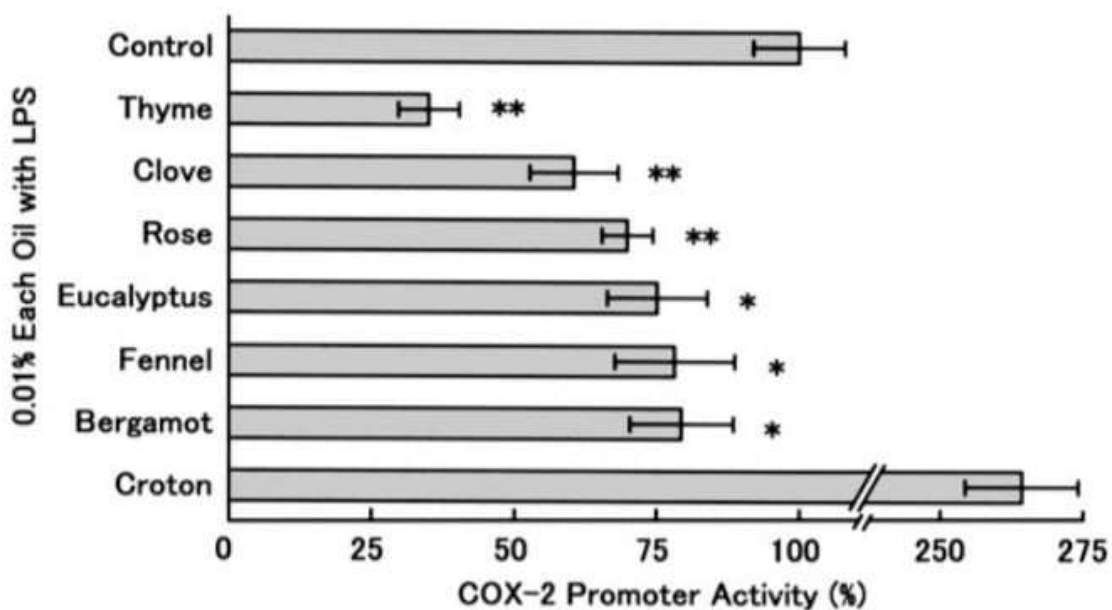


Figure 12 : Effets sur l'activité du promoteur COX-2 par les huiles essentielles dans BAEC (Hotta *et al* 2010)

Notamment, ces huiles sont des huiles essentielles, alors qu'aucune suppression de l'activité du promoteur COX-2 n'a été trouvée avec les huiles de ricin, de maïs, de coton, de fusel, de lavande, de citron, de lin, d'olive, d'orange, de palme, de carthame, de sésame, de soja ou de térébenthine. L'huile de thym était le suppresseur le plus puissant parmi ces huiles essentielles et a montré une suppression dose-dépendante de l'activité du promoteur COX-2 induite par LPS (figure 13.A).

Il a été rapporté que le traitement combiné avec l'Antigène Tissulaire Polypeptidique (TPA) et le LPS induit de manière synergique l'activité du promoteur COX-2 (Liang *et al.*, 2001), indiquant que l'activation des protéines kinases C (PKC) est impliquée dans l'induction de l'activité du promoteur COX-2 d'une manière indépendante du traitement au LPS. La chélérythrine, un inhibiteur sélectif de la PKC (Herbert *et al.*, 1900), n'a pas supprimé l'activité de promoteur induite par le LPS de la COX-2 (Figure 13.B) suggérant que la suppression par les huiles essentielles telles que l'huile de thym ne se fait pas via l'inhibition de la PKC mais avec l'activation des PPAR. Selon Hotta *et al.*, (2010), Un ligand naturel pour PPAR, 15d-PGJ 2, a supprimé l'expression de l'ARNm de COX-2 induite par le LPS dans les cellules U937 différenciées de type macrophage (Inoue *et al.*, 2000). Ainsi, Hotta *et al.*, (2010) ont évalué l'activation des PPAR par les huiles essentielles qui ont supprimé l'activité du promoteur COX-2 induite par le LPS.

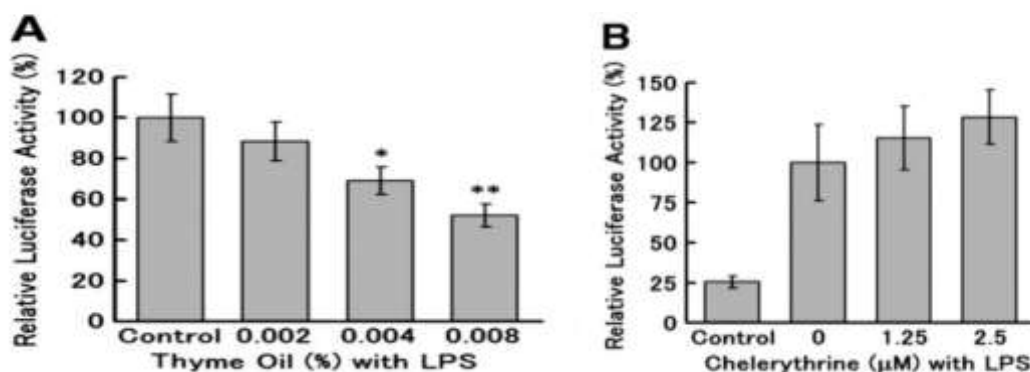


Figure 13 : Suppression dose-dépendante de l'activité du promoteur COX-2 par l'huile de thym et effets de la chélérythrine sur l'activité du promoteur (Hotta *et al.*, 2010)

La figure 14.A et B montre que les huiles de thym, de rose, de clou de girofle et de bergamote avaient une activité agoniste de PPAR et que l'huile de thym avait également une

activité agoniste de PPAR. Les chercheurs ont remarqué que PPAR est activé par l'huile de thym de manière dose dépendante.

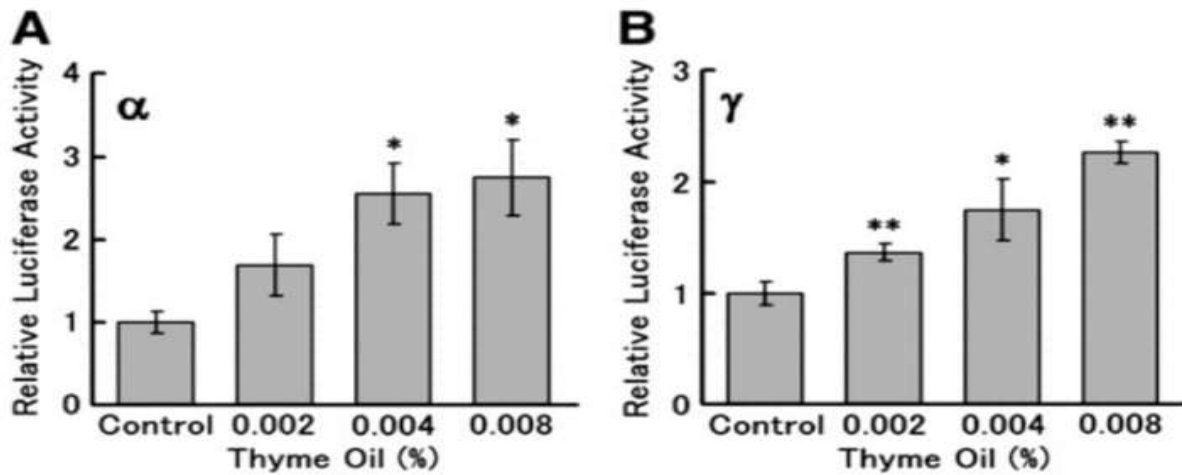


Figure 14 : Activation dose-dépendante du PPAR par l'huile de thym (Hotta *et al.*, 2010)

Pour cela, les chercheurs ont recherché des substances actives dans l'huile de thym qui étaient impliquées dans la suppression de l'activité du promoteur COX-2 induite par le LPS et l'activation de PPAR. L'huile de thym a été analysée par GC et GC-MS et le carvacrol était le composant majoritaire (58.2%).

Ensuite, des composés disponibles dans le commerce ont été examinés pour leurs effets sur l'activité du promoteur COX-2 induite par le LPS à une concentration de 1 mM ; le carvacrol et le bornéol ont supprimé l'activité du promoteur de 80 % et 55%, respectivement (figure 15).

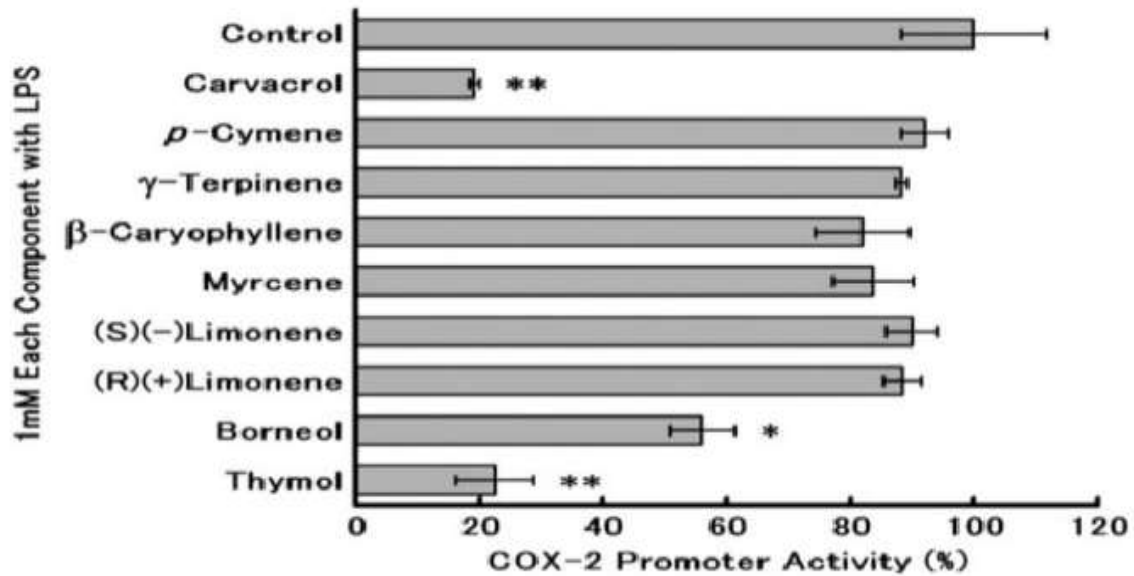


Figure 15 : Effets sur l'activité du promoteur COX-2 par les composants de l'huile de thym et du thymol (Hotta *et al.*, 2010)

L'activité du promoteur COX-2 a été supprimée à 48 % par 0,008 % d'huile de thym, qui contenait environ 300 pm de carvacrol et 3M de bornéol.

Le carvacrol est le principal composant de l'huile de thym impliqué dans la suppression de l'activité du promoteur COX-2 induite par le LPS de manière dose-dépendante (40 % et 60 % de suppression par 200 et 400 M de carvacrol, respectivement en induisant l'expression de PPAR α et PPAR γ (Hotta *et al.*, 2010).

De plus, le carvacrol 400 M a induit l'expression de l'ARNm du carnitinepalmitoyltransférase I dépendant du PPAR dans les cellules U937. Ces résultats indiquent que le carvacrol est à la fois un suppresseur de l'activité du promoteur COX-2 et un activateur de PPAR. Dans BAEC, le déhydroxyl-carvacrol, p-cymène, n'a pas supprimé l'activité du promoteur COX-2 induite par le LPS, alors que le thymol, un isomère structurel du carvacrol, l'a fait. De même, le thymol, a une activé sur les PPAR (figure 16.C-F).

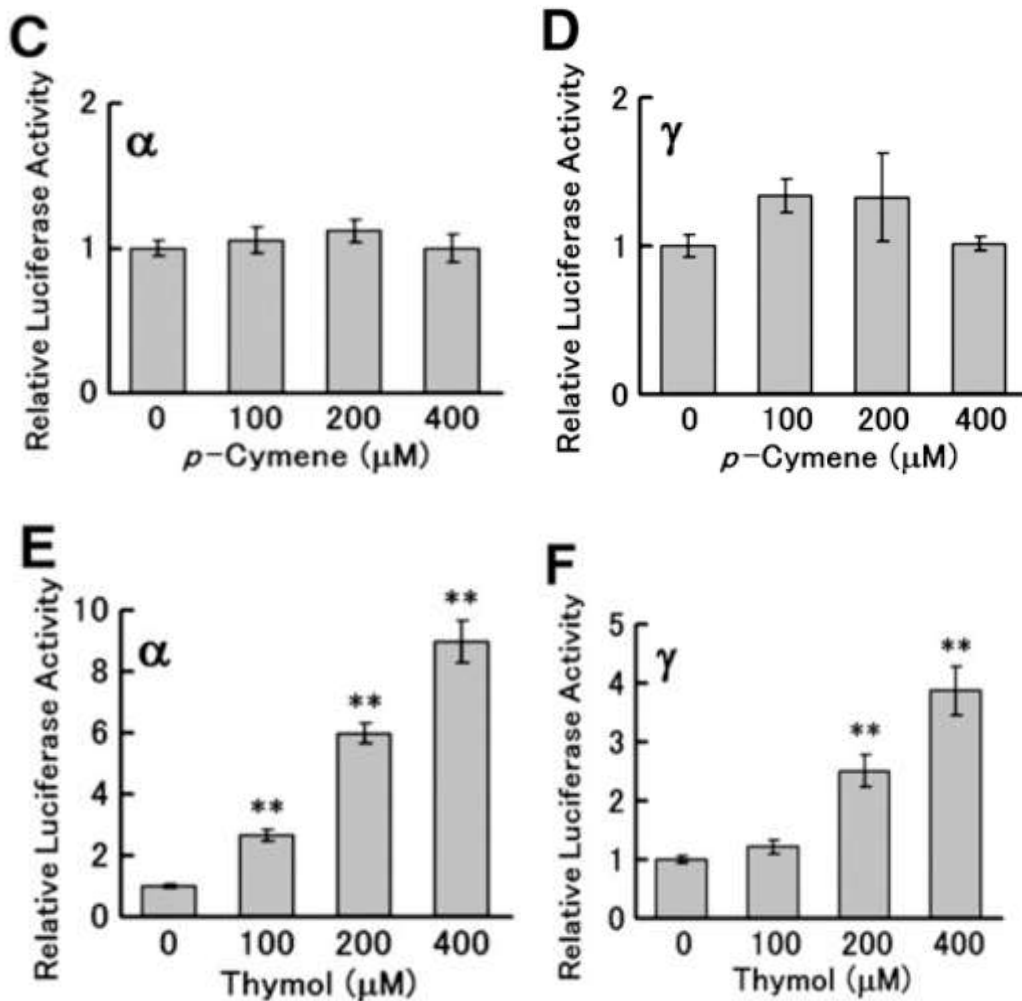


Figure 16 : Activation de PPAR α et PPAR γ en réponse au carvacrol et au thymol (Hotta *et al.*, 2010)

Ces résultats suggèrent que le groupe hydroxyle du carvacrol est essentiel à la fois pour la suppression de l'activité du promoteur COX-2 et l'activation de PPAR. Ensuite, Hotta *et al.*, (2010) ont examiné si le carvacrol supprimait l'expression de l'ARNm et des protéines de la COX-2 dans les cellules U937 différenciées de type macrophage. L'expression de l'ARNm et de la protéine COX-2 induite par le LPS a été supprimée environ 14% par traitement avec 1000 M de carvacrol mais n'a pas été supprimée en réponse à 400 M de carvacrol (Figure 17 et 18).

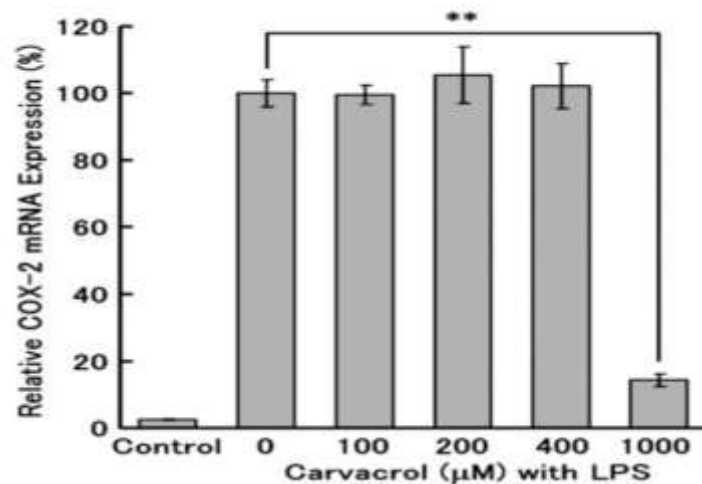


Figure 17 : Suppression de l'expression de l'ARNm de la COX-2 par le carvacrol dans les cellules U937 différenciées de type macrophage (Hotta *et al.*, 2010)

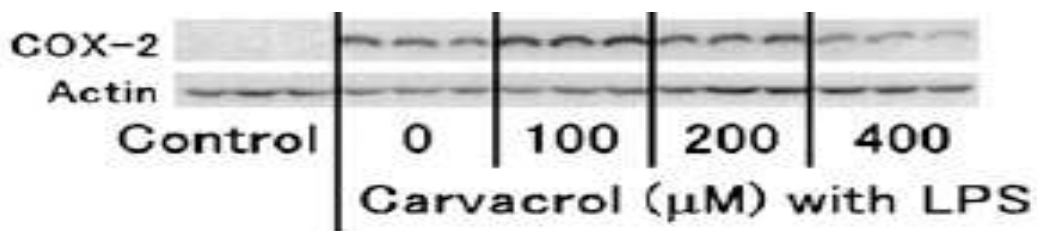


Figure 18 : Suppression de l'expression de la protéine COX-2 en réponse à carvacrol dans des cellules U937 différenciées de type macrophage (Hotta *et al.*, 2010)

Dans une étude comparative réalisée par Tsai *et al.*, (2011), les activités anti-inflammatoires en inhibant la 5-lipoxygénase (5-LOX) et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ont été évalués. Quant à l'activité d'inhibition de la 5-LOX, les résultats indiquent que les cinq huiles essentielles testés (*Eucalyptus bridgesiana*, *Cymbopogon martinii*, *Thymus vulgaris*, *Lindernia anagallis*, *Pelargonium fragrans* et *Melaleuca alternifolia*) répriment l'activité enzymatique de la 5-LOX. Cependant, l'huile essentielle de *T. vulgaris* présentait une activité anti-inflammatoire plus forte. De plus, dans le test de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, des cellules monocytaires humaine (THP-1) ont été utilisées pour tester la réponse inflammatoire en mesurant les quantités de cytokines pro-inflammatoires TNF-, IL-1 et IL-8.

Premièrement, pour vérifier les effets de ces huiles essentielles dans les cellules THP-1 et pour déterminer la concentration de travail appropriée, les huiles essentielles ont été ajoutées directement aux cellules THP-1 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la

viabilité cellulaire ont été analysées à une concentration relativement faible (0,01 mg/mL). Les niveaux de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules THP-1 traitées avec 0,01 mg/mL de chacune des huiles essentielles n'ont pas présenté de différences notables. Les effets des huiles essentielles sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites par les lipopolysaccharides (LPS) et *Propionibacterium acnes* (*P.acnes*) sont présentés dans la figure 19.

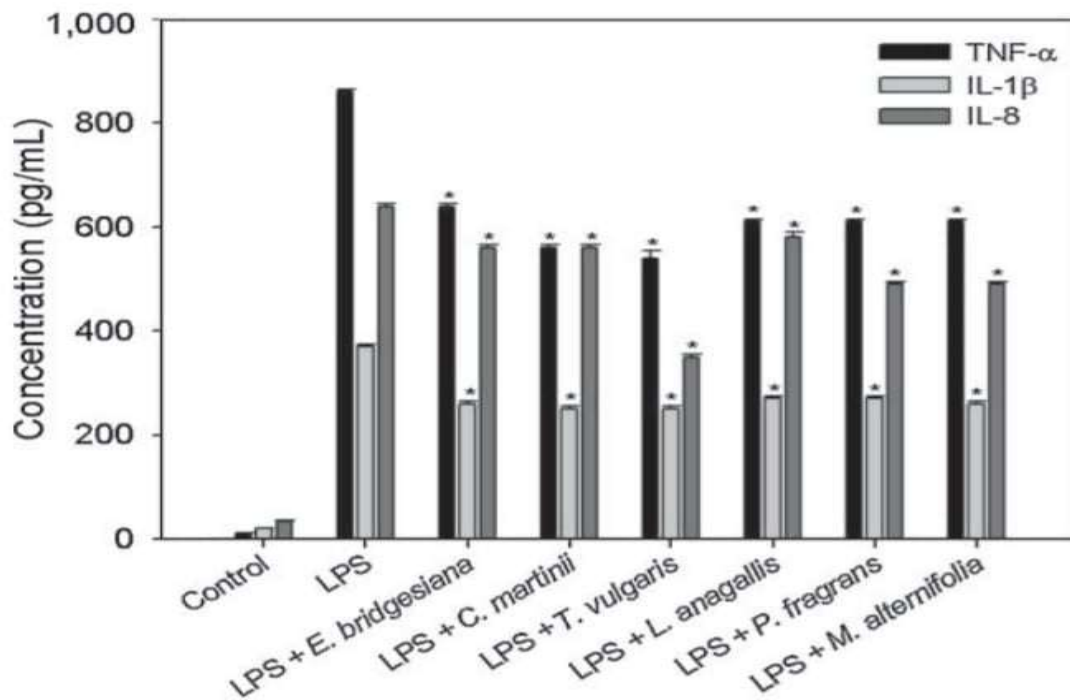


Figure 19 : Effets de l'huile essentielle (0,01ug/ml) sur la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS par les cellules TH-P1 (Tsai *et al.*, 2011)

Après induction de cytokines pro-inflammatoires par le LPS, toutes les huiles essentielles testées ont réduit les niveaux de sécrétion de TNF-, IL-1 et IL-8 des cellules THP-1. De plus, l'huile essentielle de *T. vulgaris* présentait une puissante activité inhibitrice de la sécrétion de TNF et d'IL-8 (figure 20), une activité plus efficace que l'activité inhibitrice des cytokines de l'huile essentielle de *M. alternifolia*. Dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par *P. acnes*, les huiles essentielles de *P. aeruginosa*, *C. martinii* et *T. vulgaris* ont présenté des activités inhibitrices équivalentes à celles de l'huile essentielle de *M. alternifolia*, mais celles de *L. anagallis* et Les huiles essentielles de *P. fragrans* n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la sécrétion de TNF- et d'IL-1 respectivement (figure 20).

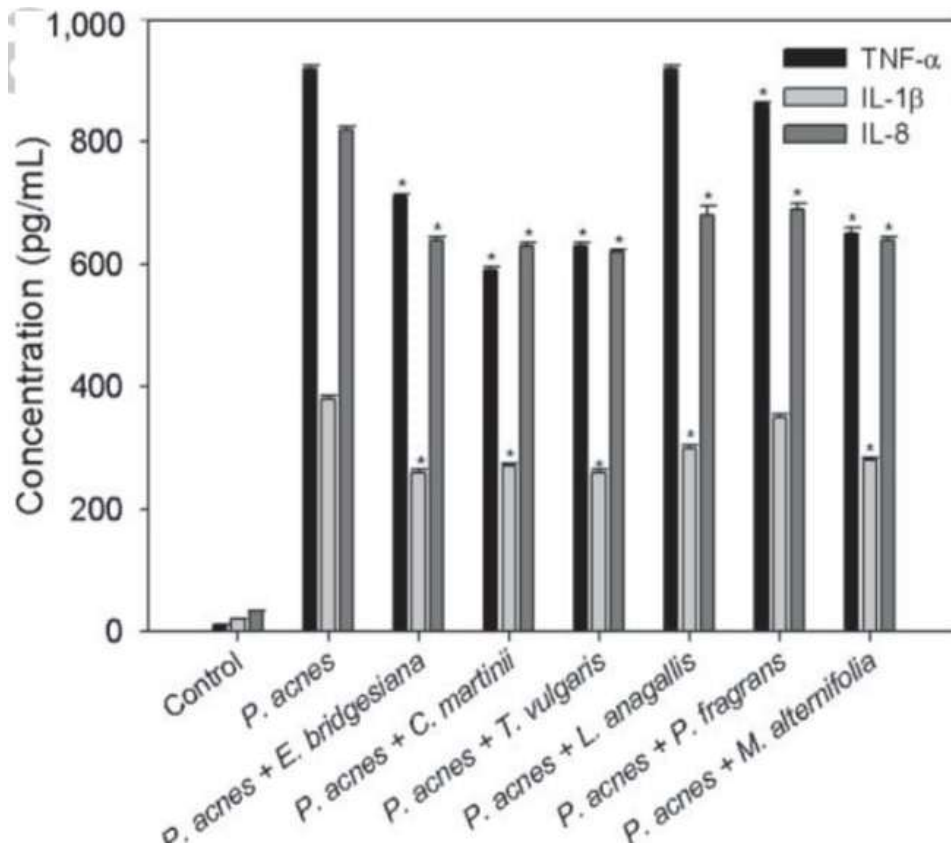


Figure 20 : Effets des huiles essentielles (0,01ug/ml) sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induites par P. acnes par les cellules THP-1 (Tsai *et al.*, 2011)

Dans la même étude (Tsai *et al.*, 2011), les résultats du test anti-inflammatoire montrent que l'huile essentielle de *vulgaris* a présenté l'activité anti-inflammatoire la plus efficace dans tous les tests. Cette puissante activité anti-inflammatoire peut résulter du fait que l'huile essentielle de *T. vulgaris* inhibe la production de NO médiée par l'interféron et le LPS via la suppression de l'expression de l'ARNm de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) inducible dans les cellules macrophages murines. Ces résultats étant similaires à ceux obtenue par Vigo *et al.*, (2004).

Selon l'étude de Fachini-Queiroz *et al.* (2012), les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles de *Thymus vulgaris* sont riches en phénols mono terpéniques, notamment le thymol et le carvacrol. La dose létale 50 (DL50) de l'huile essentielle de *T. vulgaris* (HET) administré par voie orale chez la souris a été déterminée. L'activité biologique d'HE a été testée à différentes concentrations et des doses inférieures aux valeurs de DL50 de HE de thym. La valeur élevée de DL50 de HET (4000 mg/kg) suggère que l'HE de *T. vulgaris* est

relativement sans danger et non toxique. En effet, ils ont étudié les effets de l'HE de *Thymus vulgaris*, du carvacrol et du thymol sur la réponse inflammatoire évaluée par l'activité anti-œdémogène et la migration des leucocytes après induction de l'œdème inflammatoire par le carraghénane.

La COX-2, une enzyme inductible trouvée dans les cellules inflammatoires activées, joue un rôle crucial dans la production de cytokines et la libération de médiateurs prostanoides.

L'inhibition de l'expression de la protéine COX-2 a été utilisée pour évaluer les effets anti-inflammatoires d'HET in vivo et in vitro. Les doses de 250, 500 et 750 mg/kg d' HET ont réduit significativement les exsudats inflammatoires. À une dose de 750 mg/kg, l'HET a réduit le nombre de cellules migrées. Les groupes traités avec l'indométacine et le célécoxib ont présenté une réduction des exsudats inflammatoires mais pas une réduction de la migration des leucocytes. Le Carvacrol (CVL) et le thymol ont réduit significativement le volume des exsudats inflammatoires pleuraux de 47,3 % et 34,2 %, respectivement, à une dose de 400 mg/kg. Aussi le CVL a diminué le nombre de cellules migrées significativement à des doses de 100, 200 et 400 mg/kg.

Ces données indiquent que l'HET, le carvacrol et le thymol ont inhibé de manière significative l'œdème inflammatoire, mais seuls l'HET et le carvacrol ont exercé des effets inhibiteurs sur la migration des leucocytes vers le site de la lésion.

Le Carvacrol agit comme un suppresseur de la COX-2 et un activateur des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (Hotta *et al.*, 2010).

Les données de Fachini-Queiroz *et al.*, (2012) suggèrent que le Carvacrol peut inhiber la libération de prostanoides parce que le Carvacrol avait des effets similaires à ceux de l'indométacine et du célécoxib (c'est-à-dire une inhibition des COX-1 et -2) (Vane *et al.*, 1971). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par JUHÁS *et al.*, (2008) et Hotta *et al.*, (2009).

Selon Abdelli *et al.*, (2017), l'activité anti-inflammatoire des HE de *T. vulgaris* peut être principalement attribuée à son composé principal, le thymol. Le thymol semble interférer avec l'activité de l'élastase, un marqueur de la maladie inflammatoire produite par les neutrophiles activés (Braga *et al.*, 2009), et inhibe la COX (Veras *et al.*, 2013). Comme déjà souligné, la forte activité antioxydante du thymol contribue également à l'action anti-inflammatoire.

Il a pu être démontré que les HE de *T. vulgaris* de l'ouest algérien possèdent une activité anti-inflammatoire dose dépendante considérable à des doses très inférieures aux concentrations toxiques.

Ainsi, dans une étude visant à évaluer l'activité anti-inflammatoire de HE de *Thymus vulgaris*, Boukhatem *et al.*, (2020) ont évalué l'aptitude de HET à inhiber la dénaturation de l'Albumine de Sérum Bovin (BSA). La fraction riche en carvacrol d'huile essentielle de *T. vulgaris* présentait une inhibition maximale dose-dépendante de la dénaturation de la BSA de 96,35 % à 0,5 L/ML. Il a été établi qu'HET inhibe la dénaturation des protéines.

Sur le plan histopathologique, Boukhatem *et al.*, (2020) ont étudié des sections d'oreille d'animaux après une induction d'inflammation par l'huile de croton(solvant irritant). L'application d'huile de croton a entraîné une augmentation notable de l'épaisseur de l'oreille avec une confirmation évidente de l'œdème et l'augmentation du poids des bouchons de l'oreille gauche par rapport à l'oreille droite non traitée.

L'application topique d'HE de thymus vulgaris a diminué l'épaisseur de l'oreille et les indicateurs pathologiques associés, en comparaison avec le contrôle positif le diclofénac a produit une inhibition de 73,52 % de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton.

L'huile essentielle de *T. vulgaris* présentait une activité anti-inflammatoire efficace et similaire à celle obtenue par diclofénac (Boukhatem *et al.*, 2020).

Alors que, l'application des doses plus fortes d'HE de *Thymus Vulgaris* (2,5 L/ml) provoque une infiltration moyenne de cellules inflammatoires associées à l'inflammation dans le derme. Selon ces chercheurs, ceci peut être lié à l'effet d'irritation de cet HE à une concentration plus élevée.

Cependant, il a été démontré que l'HE de thym réduisait la sécrétion de médiateurs de l'inflammation tels que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-8 et la réduction des cellules inflammatoires, l'infiltrat leucocytaire (Veras *et al.*, 2003). De plus, des composés mineurs, comme le p-cymène et le linalol, peuvent également contribuer à l'activité anti-inflammatoire : le p-cymène s'est avéré bloquer les voies de signalisation NF- κ B et MAPK, réduisant ainsi la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β (Karaman *et al.*, 2001). Le linalol inhibe l'oxyde nitrique synthase inductible et donc les effets pro-inflammatoires du NO (Tepe *et al.*, 2004 ;Boukhatem *et al.*, 2020).

D'après l'analyse des données des études ci-dessus, on peut conclure que le *Thymus vulgaris* possède une activité anti-inflammatoire efficace, grâce à son effet sur plusieurs médiateurs, cellules intervenant dans l'inflammation et les mécanismes impliqués, à savoir ; la diminution du nombre de leucocytes migrés vers le site d'inflammation, l'inhibition de l'oxyde nitrique synthase, la suppression de l'expression de l'ARNm de la protéine COX-2, qui joue un rôle crucial dans la libération de médiateurs prostanoides. Ainsi, le thym est impliqué dans la régulation de la signalisation inflammatoire, la réduction de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires tels que TNF alpha, l'IL-1, IL-6 et IL-8.

III. Étude de l'activité antiproliférative de *Thymus vulgaris*

1. Étude de la viabilité cellulaire

Dans l'étude de Ayesh *et al.*, (2014), les chercheurs ont étudié les effets antiprolifératifs et cytotoxiques d'extraits d'*Origanum syriacum* et de *Thymus vulgaris* sur la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire aiguë THP-1 et les cellules mononuclées du sang périphérique humain (PBMC) isolées de témoins normaux.

Les deux extraits d'*O. syriacum* et de *T. vulgaris* ont considérablement réduit le nombre de cellules THP-1 viables et de PBMC d'une manière dépendante de la concentration (Figure 21) (Ayesh *et al.*, 2014).

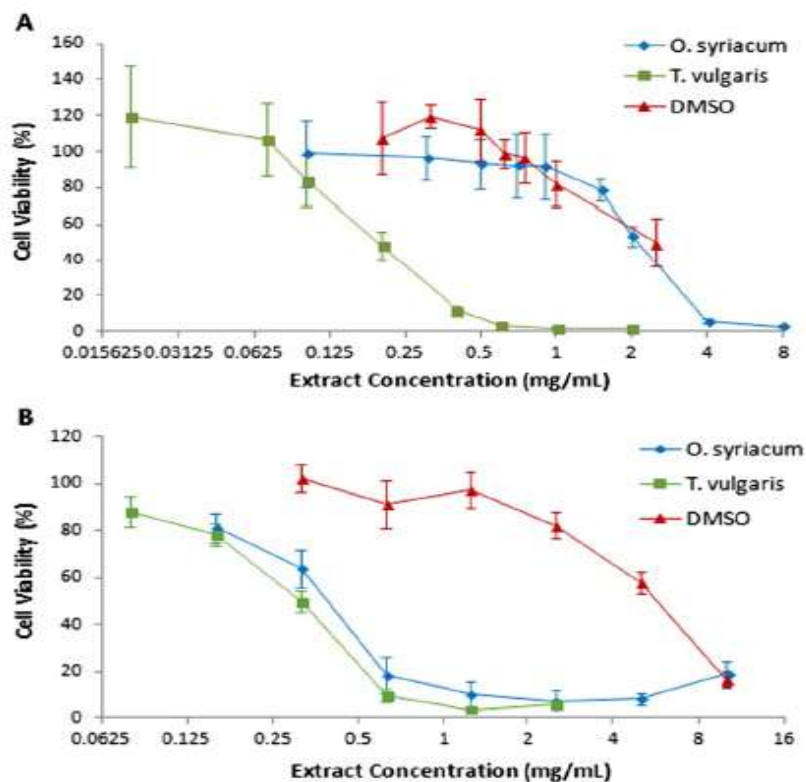


Figure 21 : Réduction de la viabilité des cellules THP-1 (A) et des PBMC (B) en réponse à l'augmentation des concentrations des extraits *O. syriacum* et *T. vulgaris* et de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Ayesh *et al.*, 2014)

L'effet de l'extrait de *T. vulgaris* était sélectif contre les cellules leucémiques avec un indice de sélectivité (IS) de 2,1. Une valeur $IS < 2$ indique une toxicité générale non spécifique. D'autre part, l'effet de l'extrait d'*O. syriacum* était plus puissant sur les cellules normales que sur les cellules leucémiques.

Le dosage de lactate deshydrogénase(LDH) a été utilisé afin de déterminer si la réduction de la viabilité cellulaire obtenue avec le dosage 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazolium bromide (MTT) était due à une cytotoxicité ou à un effet antiprolifératif. L'extrait de *T. vulgaris* n'a montré aucun effet cytotoxique contre les cellules leucémiques THP-1 par rapport au DMSO (valeur P = 0,6520) (Figure 22).

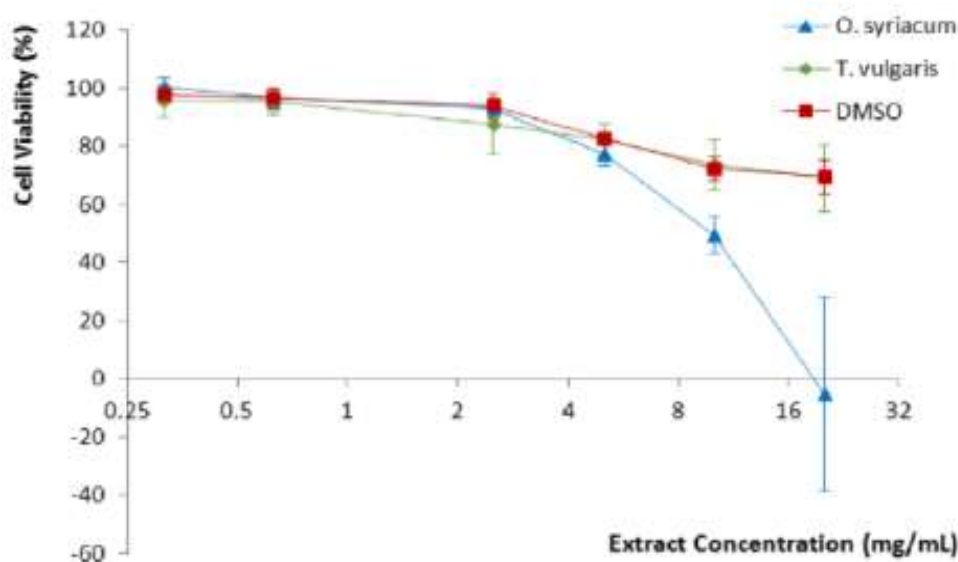


Figure 22 : Effet cytotoxique sur les cellules THP-1 en réponse à l'augmentation des concentrations des extraits et de DMSO (Ayesh *et al.*, 2014)

D'autre part, l'extrait d'*O. syriacum* a montré un effet cytotoxique significatif contre les cellules THP-1 avec une valeur CL50 de 9,646 mg/mL.

Dans l'étude de Ayesh *et al.*, (2014), *T. vulgaris* a présenté une inhibition dose-dépendante sélective de la prolifération de THP-1 (activité cytostatique) aux concentrations appliquées et au temps d'exposition plutôt que de les tuer (activité cytotoxique). Ces découvertes prometteuses laissent espérer que *T. vulgaris* peut contenir des principes actifs thérapeutiques anticancéreux qui, une fois purifiés, sont plus sélectifs pour les cellules leucémiques que les cellules sanguines normales à des concentrations relativement faibles. Il a déjà été démontré que l'huile essentielle de *T. vulgaris* interfère avec la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire et le cancer, à savoir la signalisation de l'interféron, la biosynthèse des N-glycanes et la signalisation de la kinase 5 régulée par le signal extracellulaire (ERK5) (Sertel *et al.*, 2011).

Des résultats similaires ont été démontré par Al-Menhali *et al.*, (2014). Par rapport au témoin, l'extrait de *Thymus vulgaris* provoqué une diminution significative du nombre de cellules de carcinome du côlon humain (HCT116) après différentes durées de traitement par exemple, après 72 h d'incubation, l'extrait de *T. vulgaris* (TVE) a entraîné une diminution de la viabilité de 22,4 % – 8,6 %, 33,1 % – 4,1 %, 35,8 % – 8,6 % ou 52,4 % – 22,5 % lorsque les cellules étaient traitées avec des dose de 0,2, 0,4, 0,6 ou 0,8 mg/mL, respectivement (n= 6) (Tableau VI).

Tableau VI : Le traitement par TVE sur la viabilité cellulaire (Al-Menhali *et al.*, 2014)

Concentration	Viabilité	Viabilité après 72 h d'incubation
0,2 mg/mL	22,4 %	8,6 %
0,4 mg/mL	33,1 %	4,1 %
0,6 mg/mL	35,8 %	8,6%
0,8 mg/mL	52,4 %	22,5 %

Le traitement par TVE a également montré un effet dépendant du temps (0, 24, 48 et 72 h) sur la viabilité cellulaire (Figure 23).

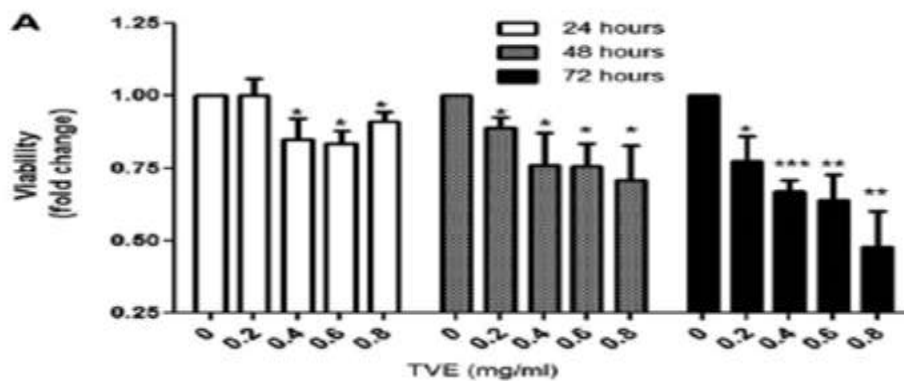


Figure 23 : L'extrait de thymus vulgaris (TVE) inhibe la prolifération des cellules HCT116 (Al-Menhali *et al.*, 2014)

Par rapport au témoin, le traitement avec TVE (0,4 mg/mL) a causé un 15% à 0,07 %, 25 % à 0,11 % ou 65 % à 0,03 % diminution de la viabilité après incubation des cellules pendant 24, 48 ou 72 h, respectivement (n = 6 ; P < 0,05 pour le véhicule par rapport à 0,4 mg/mL à 24 et 48 h ; P < 0,001 pour le véhicule par rapport à 0,4 mg/mL à 72 h) (Tableau VII).

Tableau VII : Le traitement par TVE 0,4 mg/mL sur la viabilité cellulaire (Al-Menhali *et al.*, (2014)

	Viabilité	Viabilité après incubation
24 h	15%	0,07 %
48 h	25 %	0,11 %
72 h	65 %	0,03 %

2. Effet de *T. vulgaris* sur l'apoptose

Étant donné que la TVE réduisait la viabilité des cellules HCT116, Al-Menhali *et al.*, (2014) ont cherché à déterminer si la mort cellulaire programmée (apoptose) était induite par HE de thym dans les cellules cancéreuses colorectales (HCT116). Pour cela, l'activité de l'apoptose exécutant la caspase3/7, qui est directement corrélée à l'apoptose, a été mesurée. Il a été montré que la TVE induit une augmentation de manière concentration-dépendante de l'activité de la caspase3/7 (Figure 24).

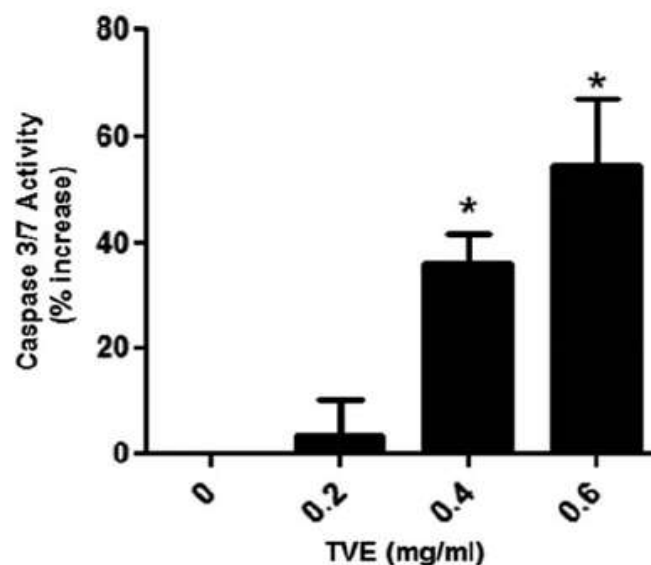


Figure 24 : l'extrait de TVE induit l'apoptose des cellules HCT116 (Al-Menhali *et al.*, 2014)

Après 48 h d'incubation, une augmentation de $3,5\% \pm 6,8\%$, $36,1\% \pm 5,5\%$, $54,7\% \pm 12,4\%$ (moyenne% – SEM%) de l'activité de la caspase3/7 a été observée lorsque les cellules étaient traitées avec 0,2, 0,4, ou 0,6 mg/mL de TVE, respectivement (n = 3) (Tableau VIII).

Tableau VIII : Effet de traitement par TVE sur l'activité de la caspase3/7 (Al-Menhali *et al.*, 2014)

Concentration	L'activité de la caspase 3/7 après 48h d'incubation
0,2 mg/mL	$3,5\% \pm 6,8\%$
0,4 mg/mL	$36,1\% \pm 5,5\%$
0,6 mg/mL	$54,7\% \pm 12,4\%$

3. Étude de l'effet de *T. vulgaris* sur l'adhésion cellulaire et la capacité migratoire

Dans la même étude (Al-Menhali *et al.*, 2014), l'inhibition de l'adhésion des cellules HCT116 par le thym est testée. L'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) est un processus cellulaire intrinsèque qui joue un rôle majeur dans la survie de diverses cellules, y compris le cancer. Étant donné que le TVE inhibait la prolifération des cellules HCT116, ils ont cherché à déterminer si cette diminution de la viabilité était concomitante à une diminution de l'adhésion aux protéines de la MEC, à savoir la fibronectine. L'adhésion cellulaire aux surfaces revêtues de fibronectine était significativement diminuée d'une manière dépendante de la concentration (Figure 25).

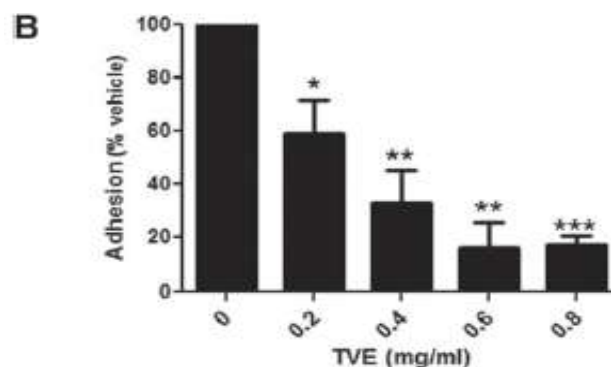


Figure 25 : TVE inhibe l'adhésion des cellules HCT116 à la fibronectine (Al-Menhali *et al.*, 2014)

En effet, la TVE a causé une diminution de 40,7 % à 12,3 %, 67 % à 12 %, 83,7 % à 9,3 % ou 82,9 % à 3,5 % (moyenne % -SEM %) de l'adhérence lorsque les cellules étaient traitées avec 0,2, 0,4, 0,6 ou 0,8 mg/mL de TVE respectivement (Tableau IX).

Tableau IX : Effet de traitement par TVE sur l'adhérence cellulaire (Al-Menhali et al., (2014))

Concentration	L'adhérence cellulaire	L'adhérence-cellulaire après incubation
0,2 mg/mL	40,7 %	12,3 %
0,4 mg/mL	67 %	12 %
0,6 mg/mL	83,7 %	9,3%
0,8 mg/MI	82,9 %	3,5 %

D'un autre côté, l'augmentation de la capacité migratoire des cellules est une caractéristique des cellules tumorales. Pour déterminer si TVE module la migration des cellules HCT116, un test de grattage de la plaie a été effectué par Al-Menhali *et al.*, (2014). Par rapport aux cellules traitées avec le véhicule, les cellules traitées par TVE présentaient une migration réduite pour fermer la plaie (Figure 26). Cette diminution de la migration a été observée dès 4 h après le traitement par TVE.

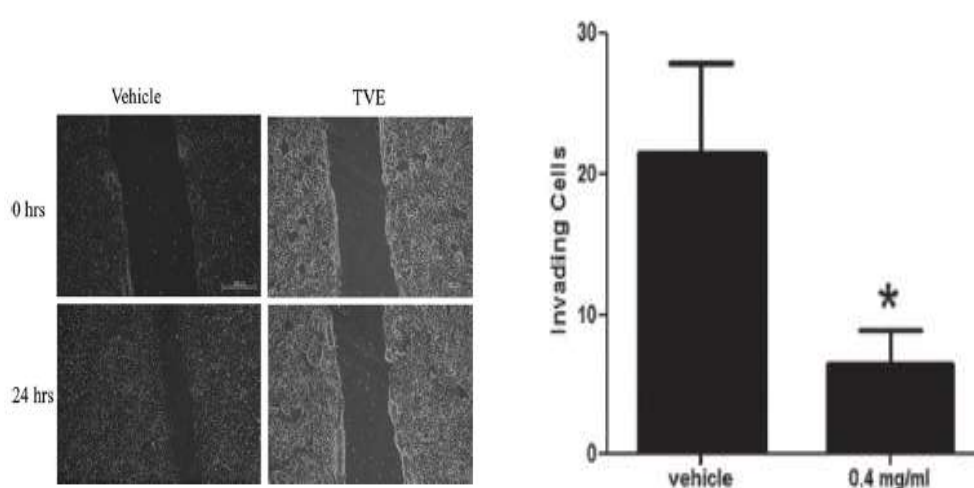


Figure 26 : TVE inhibe la migration et l'invasion des cellules HCT116 (Al-Menhali *et al.*, 2014)

Compte tenu de cette observation selon laquelle la TVE inhibe la migration des cellules HCT116, Al-Menhali *et al.*, (2014) ont tentés de déterminer si l'invasion de ces cellules pouvait également être modulée par l'extrait car les métastases sont une caractéristique des cancers agressifs. L'envahissement accru est une caractéristique clé des cellules cancéreuses qui métastasent dans des organes voisins ou distants. En effet, le traitement par TVE a significativement diminué l'invasion cellulaire.

Selon un étude réalisée par Oliviero *et al.*, (2016), les résultats obtenus ont démontré que le *Thymus vulgaris* n'a aucun effet sur le cycle cellulaire dans les lignées H460 à 0,3% d'extrait de thym pour 24, 48 et 72 h de traitement. Le traitement par l'extrait de thym n'induisait pas de modulation du profil du cycle cellulaire dans les cellules H460. De plus, la capacité du traitement par l'extrait de thym à entraîner la mort cellulaire a été étudiée par électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN. La fragmentation d'ADN a été trouvée à partir de 24 h après le traitement avec 0,3% d'extrait et augmenté au cours du temps (Figure 27).

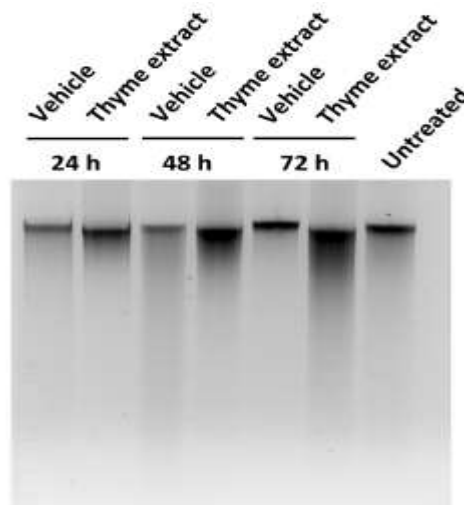


Figure 27 : traitement par TVE de l'ADN sur gel d'agarose (Oliviero *et al.*, (2016))

Oliviero *et al.*, (2016) ont confirmé que le traitement par l'extrait de thym entraîne une augmentation significative du pourcentage des cellules subissant une mort de type nécrotique après 72 h de traitement. L'incorporation de PI a également été confirmée au microscope, en évaluant le nombre accru de cellules colorées PI positives (Figure 28).

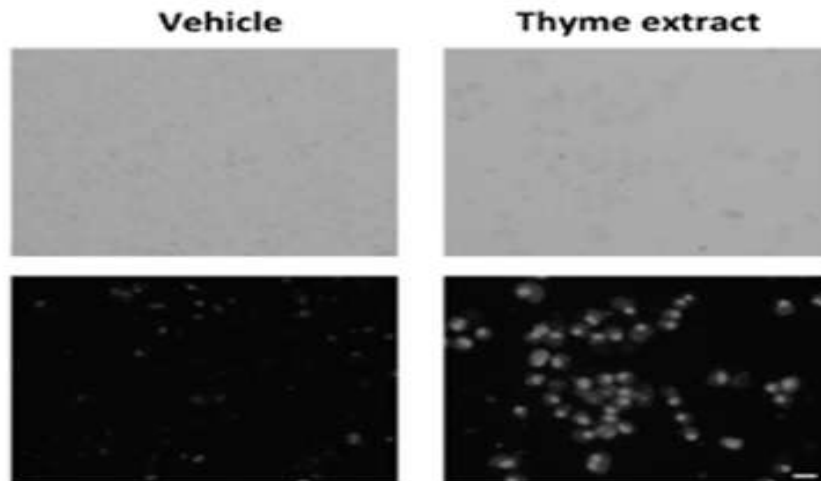


Figure 28 : Les cellules colorées PI positives au microscope (Oliviero *et al.*, 2016)

Dans une autre étude, Catauro *et al.*, (2017) ont d'abord regardé l'impact de l'HE de thym sur la prolifération des lignées cellulaires d'ostéosarcome humain (U2OS) et les cellules du cancer du pancréas humain (PANC-1) afin d'évaluer les éventuelles propriétés anti tumorales de l'HE de thym.

Les cellules U2OS et PANC-1 ont été incubées avec des concentrations croissantes d'HE de thym (de 10 à 400 g/ml) pendant 48 h puis la prolifération cellulaire a d'abord été déterminée par dosage MTT conventionnel. Le traitement à l'HE de thym entraîne une réduction significative dose-dépendante de la viabilité cellulaire des cellules U2OS et PANC-1 ($p < 0,05$), avec une sensibilité différente entre les deux lignées cellulaires.

Les cellules PANC-1 semblent être plus sensibles à l'HE. Même à une dose de 10 g/ml (très faible), une réduction statistiquement significative de la viabilité cellulaire était déjà évidente dans PANC-1, mais pas dans les cellules U2OS. Plus pertinent, à une dose de 100 µg/ml (concentration faible et non toxique), l'HE provoque une très forte inhibition (60%) de la viabilité cellulaire dans les cellules PANC-1, contre 40% de réduction observée dans les cellules U2OS (Figure 29).

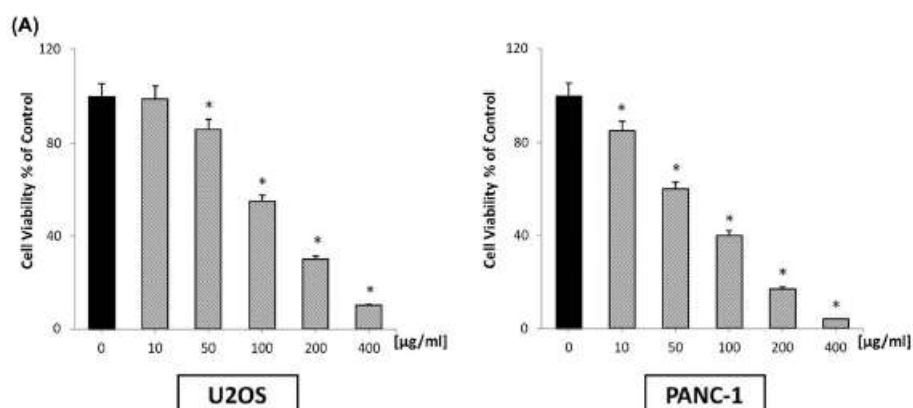


Figure 29 : L'Effets du thym EOS sur la prolifération des cellules PANC-1 et U2OS (Catauro *et al.*, 2017)

Ensuite, les cellules U2OS et PANC-1 ont été exposées à 100 g/ml d'HE de thym pendant 24, 48 et 72 h. En accord avec les données MTT, l'HE provoque une réduction du nombre de cellules dans les lignées cellulaires PANC-1 et U2OS à des degrés différents. Pour être précis, la réduction du nombre de cellules était de 2, 15, 30 % dans U2OS contre 18, 35, 50 % dans les cellules PANC-1 à 24, 48, 72 h (Tableau X).

Tableau X : Le traitement de la viabilité cellulaire dans les cellules PANC-1 et les cellules U2OS par HET (Catauro *et al.*, 2017)

La viabilité des cellules après incubation	La viabilité des cellules U2OS	La viabilité des cellules PANC-1
24 h	2%	18%
48 h	15%	35%
72 h	30 %	50 %

Dans l'ensemble, les résultats de Catauro *et al.*, (2017) indiquent que l'HE de thym provoque une action antiproliférative sur les cellules PANC-1 et U2OS, les premières étant plus sensibles. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Alexa *et al.*, (2018) sur des lignées cellulaires de B164A5 et A375.

Le TEO à une concentration de 50 g/mL a induit un taux d'inhibition de 19,5% pour la lignée cellulaire B164A5 et 17,5% pour la lignée cellulaire A375, tandis qu'une

concentration de 100g/mL a entraîné un taux d'inhibition de 30% pour la lignée cellulaire B164A5 et 27% pour la lignée cellulaire A375 (Alexa *et al.*, 2018).

Pour explorer davantage l'effet inhibiteur de croissance de l'HE de thym sur les cellules PANC-1, la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire a été évaluée par analyse cytométrique en flux de cellules colorées à l'iodure de propidium afin d'investiguer si le HE de thym affecte le cycle cellulaire. Pour cela, Catauro *et al.*, (2017) ont également étudié la proportion de cellules à teneur en ADN hypodiploïde (population sous-G1), caractéristique des cellules ayant subi une fragmentation de l'ADN, comme un signe de l'apoptose.

Selon l'action antiproliférative ci-dessus, la Figure 30.A montre qu'aux deux moments considérés (24h et 48 h), dans 100g/ml de cellules PANC-1 traitées aux HE, le pourcentage de cellules en phases G1 et S est de plus en plus bas, respectivement, que celle des cellules témoins non traitées. Notamment, à 24 h, la diminution de la phase S est spectaculaire avec une augmentation concomitante principalement de la phase G1.

Fait intéressant, la Figure 30.A ne montre également aucune apparition d'une population sous-G1 en réponse aux HET jusqu'à 48 h, alors qu'un pourcentage clair (16 %) de cellules sous-G1 est évident, comme prévu, après un traitement de 24 h avec le médicament anti-cancer anti-pancréatique conventionnel Gemcitabine (contrôle positif) (Torres *et al.*, 2016).

Dans l'ensemble, les résultats obtenus par Catauro *et al.*, (2017) suggèrent que HET inhibe la prolifération des cellules PANC-1 en ralentissant le cycle cellulaire, et non en induisant la mort cellulaire par apoptose.

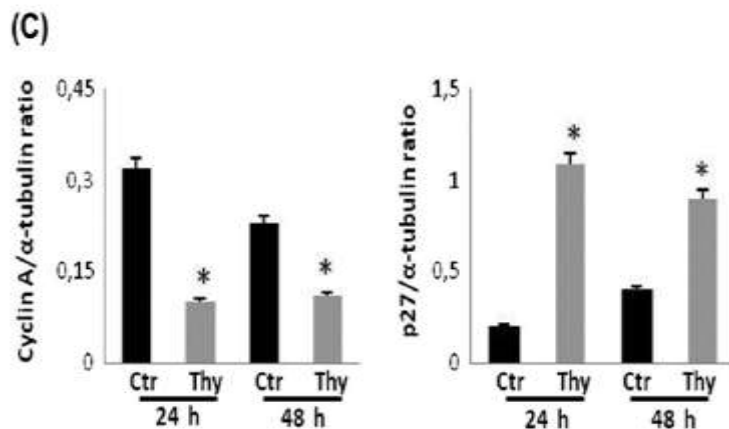
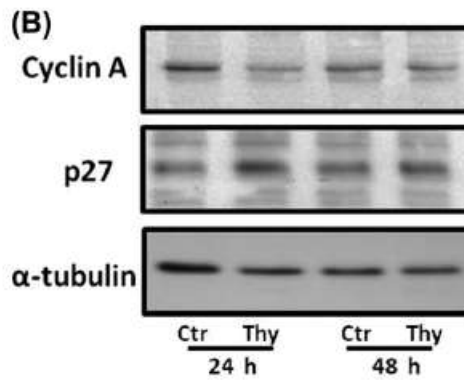
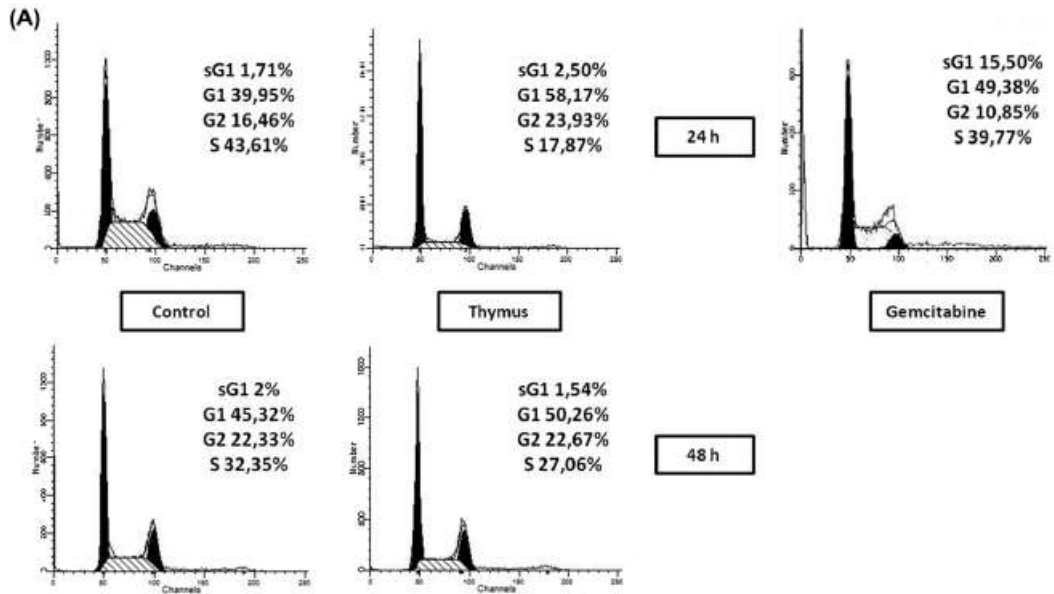


Figure 30 : Effets de l'HE de thym sur la distribution des cellules PANC-1 dans le cycle cellulaire et les phases sous-G1 et sur les niveaux de certaines protéines régulatrices pertinentes du cycle cellulaire (Catauro *et al.*, 2017).

Pour mieux comprendre les effets de l'HE de *Thymus* sur le cycle cellulaire des cellules PANC-1, Catauro *et al.*, (2017), ont étudié l'expression de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire pertinentes en réponse au traitement à l'HET. Dans ce but, des cellules PANC-1 ont été exposées à 100 µg/ml d'HET pendant 24h et 48 h. Les extraits cellulaires ont été analysés par Western blot pour examiner les taux d'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p27 et de protéines cycline A. La Figure 28.B et C, montre que dans les cellules traitées aux HET, la quantité de cycline A est diminuée par rapport aux cellules témoins non traitées, tandis que la quantité d'inhibiteur de croissance cellulaire p27 est augmentée. Fait intéressant, les variations ci-dessus sont clairement évidentes déjà après 24 h, et sont maintenues à 48 h de traitement à l'HET. Dans l'ensemble, ces données indiquent que l'effet antiprolifératif induit par le traitement à l'huile essentielle de *T. vulgaris* est parallèle à des changements constants des niveaux de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire pertinentes.

L'huile essentielle de *Thymus* à 100 g/ml, une dose non toxique, inhibe largement la prolifération des cellules PANC-1 en ralentissant la progression du cycle cellulaire, sans l'apparition d'apoptose. Il amène les cellules à diminuer la phase S et à s'accumuler dans la phase G1.

En conséquence, la réduction de la phase S des cellules PANC-1 est associée à une diminution de la cycline A effectrice positive du cycle cellulaire et à une augmentation des niveaux de protéine p27 inhibitrice du cycle cellulaire, respectivement. Fait intéressant, les effets antiprolifératifs d'HET se produisent également dans les cellules d'ostéosarcome U2OS, mais dans une moindre mesure, ce qui suggère fortement que l'HET peut avoir des effets discrets sur la prolifération des cellules cancéreuses en fonction du type cellulaire et non d'un effet toxique cellulaire aspécifique.

Une autre étude a été réalisée sur des cellules de la lignée T47D par Heidari *et al.*, (2018). L'activité cytotoxique *in vitro* de *T. vulgaris* et des nanoparticules *Thymus vulgaris* Argent Nano Particule (TVAgNPs) a été réalisée en utilisant un test MTT (test colorimétrique).

Les lignées cellulaires T47D ont été traitées avec diverses concentrations, allant de 12,5 à 200 µg/mL pour évaluer le pourcentage de cytotoxicité envers les cellules. Selon cette étude, les TVAgNPs synthétisés déclenchent la mort cellulaire en inhibant environ 90 % dans les cellules T47D à la concentration la plus élevée de 200 g/mL, alors que les extraits de plantes de *T.vulgaris* ont montré une mortalité cellulaire d'environ 75 %. Cette réduction de la viabilité cellulaire indique un schéma dose-dépendant (Figure 31).

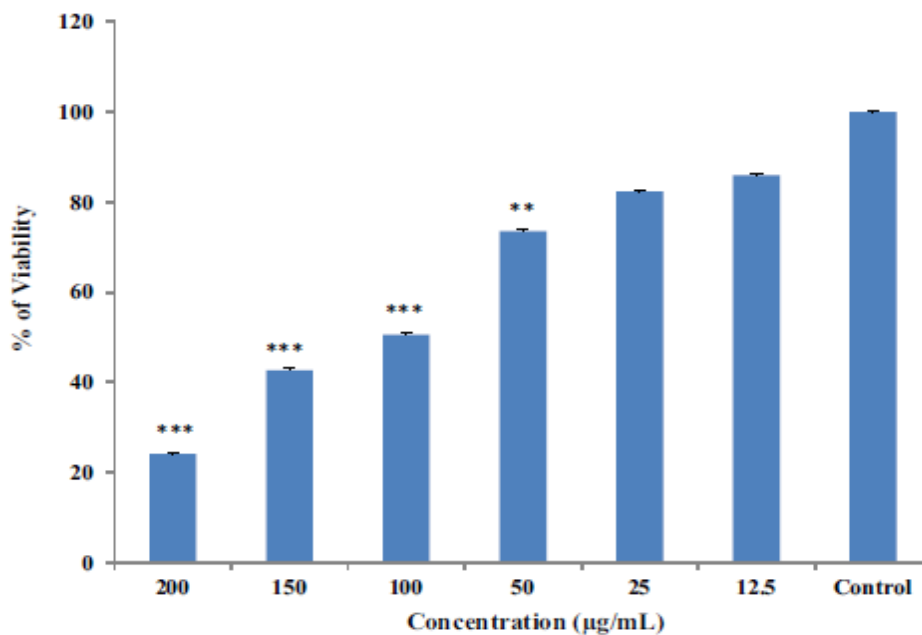


Figure 31 : Effets cytotoxiques de la viabilité cellulaire avec divers concentrations d'extrait éthanolique aqueux de *Thymus vulgaris* sur les cellules T47D calculées par dosage MTT(Heidari *et al.*, (2018))

L'effet de l'induction de l'apoptose et de la nécrose dans les cellules cancéreuses a été testé pendant 24 h. Il a été démontré que le *T. vulgaris* et TVAgNPs ont la capacité à induire l'apoptose selon l'analyse par cytométrie en flux. L'apoptose et la nécrose ont été évaluées via l'Annexine V pour déterminer les cellules apoptotiques et le PI pour identifier les noyaux cellulaires, puis soumis à une cytométrie en flux (Heidari *et al.*, 2018). Les dots plots de la coloration à l'annexine V/PI sont représentées sur la figure 32.

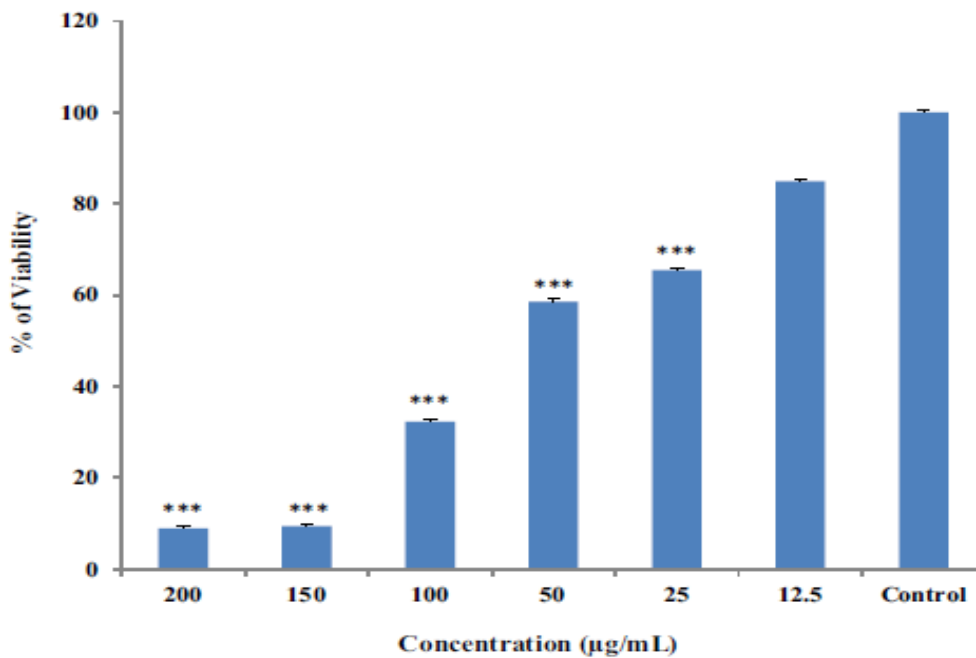


Figure 32 : Test d'induction de l'apoptose par cytométrie en flux (Heidari *et al.*, 2018)

La translocation de la phosphatidylsérine (PS) vers la membrane cellulaire externe est une étape importante dans la voie de l'apoptose des cellules. La liaison à l'annexine V est extrêmement spécifique au PS, qui est exprimé sur la surface cellulaire externe, tandis que le PI ne s'intègre pas dans la cellule avec la membrane cellulaire saine. L'analyse par cytométrie en flux a indiqué que les TVAgNPs pourraient déclencher la translocation de PS de la membrane interne par rapport aux cellules non traitées indiquant la voie de l'apoptose plutôt que la nécrose.

Dans une étude *in vivo* ciblant le cancer du sein, Kubatka *et al.*, (2019) ont évalué les effets chimiopréventifs et thérapeutiques de *T. vulgaris* administrés par voie alimentaire à des souris et de rats Balb/c ayant un adénocarcinome du sein 4T1 induit chimiquement, son effet sur les protéines impliqués dans l'apoptose (caspase-3, Bax, Bcl-2), la prolifération (Ki67), l'angiogénèse (VEGF, VEGFR-2), les dommages oxydatifs (MDA), les cellules souches cancéreuses (CD24, CD44, ALDH1A1, EpCam) et l'épigénétique (statut de méthylation des promoteurs de gènes sélectionnés, modifications chimiques des histones et expressions de miARN).

Le traitement par *T.vulgaris* (THYM 0,1) (0,1%, THYME 0,1 groupe) a augmenté l'expression de Bax de 75,5 % ($p < 0,001$) et diminué l'expression de VEGFR-2 de 28 % ($p < 0,05$) et les niveaux de MDA de 35,5 % ($p < 0,05$) par rapport au groupe témoin. *T.vulgaris*(THYM 1)(1%, THYME 1 groupe) a réduit l'expression de VEGFR-2 de 29 % ($p < 0,05$) et les niveaux de MDA de 33,5 % ($p < 0,05$) par rapport au témoin. Les expressions de caspase-3, Bcl-2, Ki67 et VEGF n'ont pas été modifiées de manière significative dans les cellules de carcinome traitées (Figure 33).

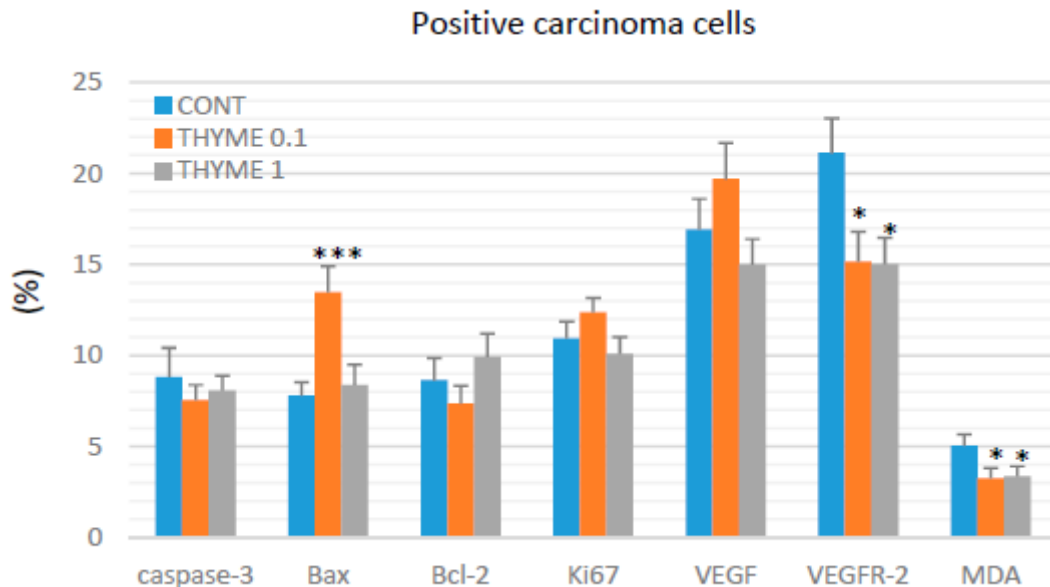


Figure 33 : Évaluation immunohistochimique de la caspase-3 (cytoplasmique), Bax, Bcl-2, Ki67, VEGFA, Expression de VEGFR-2 et de MDA dans des cellules de carcinome mammaire de rat après l'administration de *T. vulgaris* en deux doses (Kubatka *et al.*,2019)

L'expression de CD44 a été diminuée de 15 % ($p < 0,05$) dans le groupe THYME 1 et l'expression d'ALDH1A1 de 27 % ($p < 0,05$) dans le groupe THYME 0,1 par rapport aux cellules de carcinome de rat témoin (Figure 34.a). Une réduction de l'expression de CD24 de 28 % ($p > 0,05$) a été observée dans le groupe THYME 1.

De même, les modifications de l'histone 3 et de l'histone 4 ont montré une diminution significative et dose-dépendante de H3K4m3 de 19,5% ($p < 0,05$, THYME 0,1) et de 33,5% ($p < 0,01$, THYME 1), respectivement, par rapport au témoin (Figure 34.b).Les changements dans les niveaux de H3K9m3, H4K16ac et H4K20m3 dans les groupes traités n'étaient pas significatifs.

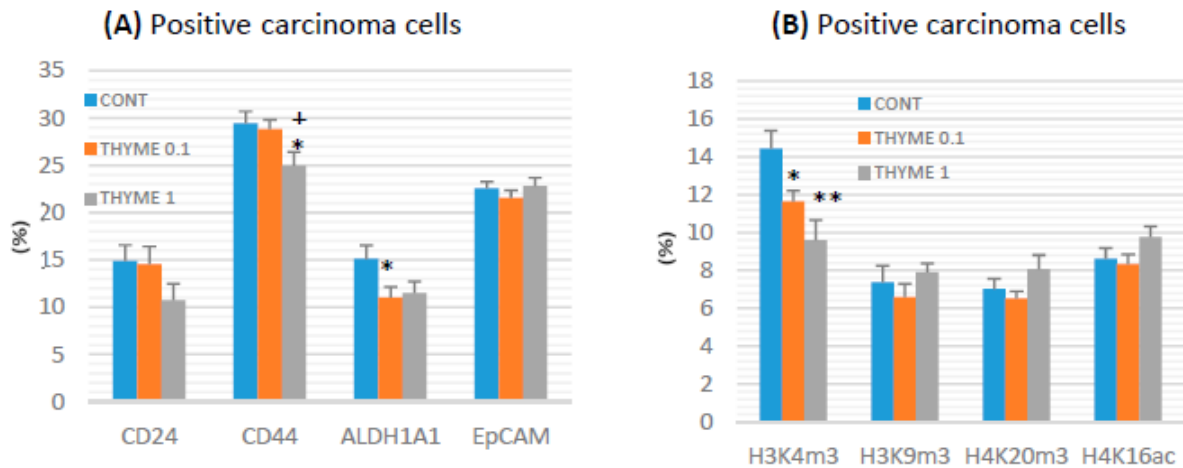


Figure 34 : Immunopositivity of cancer stem cell markers (A) and epigenetic markers (B) in rat breast carcinoma cells after treatment with *T. vulgaris* (Kubatka *et al.*, 2019).

Par rapport au groupe témoin, *T. vulgaris* a significativement ($p < 0,001$) réduit les volumes tumoraux dans les deux groupes de traitement de 85 % (THYME 0,1) et 84 % (THYME 1), respectivement. Ensuite, *T. vulgaris*, aux deux doses étudiées, a réduit significativement ($p < 0,01$) le rapport nécrose/toutes surfaces tumorales de 77 % (THYM 0,1) et 81 % (THYM 1) par rapport au témoin, ainsi que l'indice d'activité mitotique ($p < 0,05$) de 31,5% (THYM 0,1) et 25% (THYM 1) versus le contrôle dans l'adénocarcinome chez les souris 4T1 (Figure 3, Tableau XI).

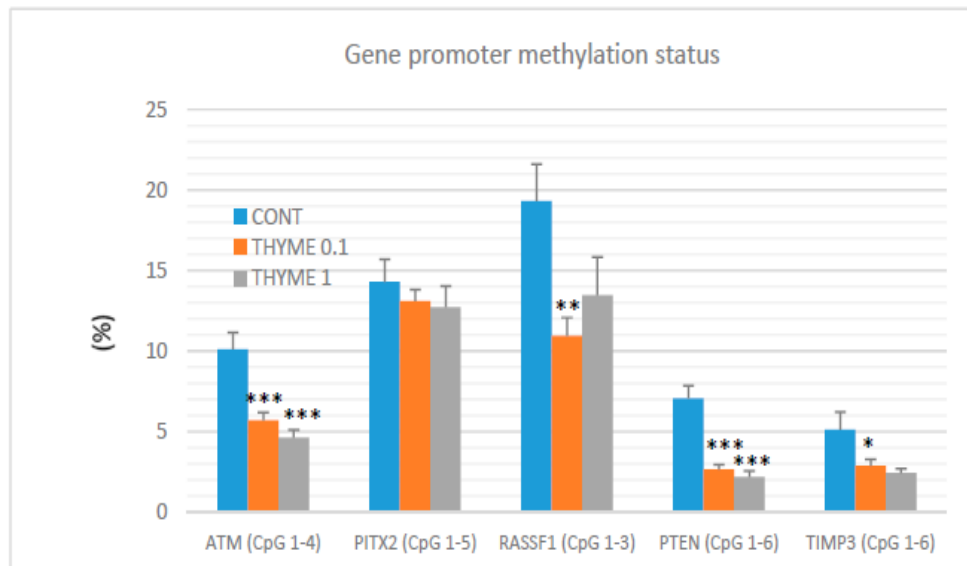


Figure 35 : Statut total de méthylation du promoteur de l'ADN des gènes ATM, PITX2, RASSF1A, PTEN et TIMP3 dans les carcinomes mammaires du rat (Kubatka *et al.*, 2019).

Tableau XI : Caractéristiques histopathologiques des tumeurs 4T1 dans des souris Balb/c après un traitement avec *T. vulgaris* (Kubatka *et al.*, 2019).

Paramètre	CONTROLE	THYME 0.1	THYME 1
Necrosis/all tumor area	8.71 _ 3.08	1.99 _ 1.11 **	1.66 _ 1.16 **
Mitoticactivity index	25.15 _ 2.32	17.26 _ 1.82 *	18.82 _ 1.99 *

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus CONTRÔLE.

Thymus vulgaris (THYM 1) a induit aussi une augmentation significative de taux d'expression de miARNs par rapport au contrôle. Le THYM 0.1 a induit une augmentation de 34% dans l'expression de miARN21. En revanche, son expression a été diminuée par (37,5%) par le THYM 1 (Figure 36).

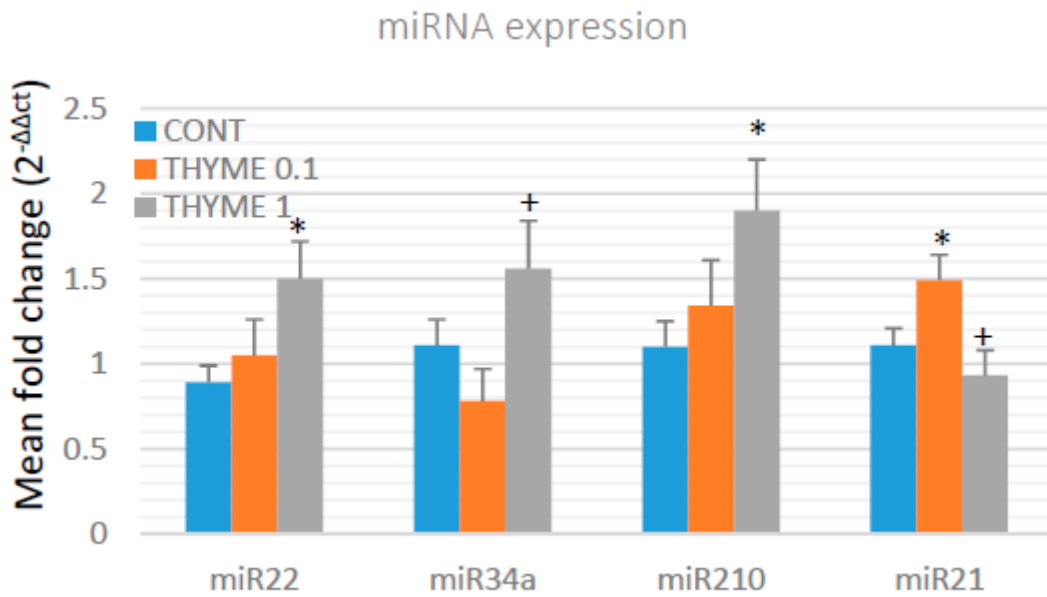


Figure 36 : Expression relative des miARN de miR22, miR34a, miR210 et miR21 dans des carcinomes mammaires de rat (Kubatka *et al.*, 2019).

D'après l'analyse des articles ci-dessus, on peut conclure que le *Thymus vulgaris* a fait l'objet de nombreuses études montrant son activité antiproliférative, cytotoxique et chimiopréventive. Cette activité lui confère une utilité en thérapie anticancéreuse sur différents type de cancer (cancer du sein, leucémie monocyttaire aiguë, cancer colorectales... etc.) où il inhibe l'adhésion cellulaire et l'invasion métastatique, et interfère avec la transcription des gènes impliqués dans le cycle cellulaire par l'inhibition de kinase cycline-dépendante p27 et de protéines cycline A. De même, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* exécute une activité apoptotique grâce à la sur-activation de la caspase3/7. Également, *T. vulgaris* induit une augmentation des taux d'expression de miARNs suppresseurs de tumeurs.

Conclusion

Conclusion Et Perspectives

L'utilisation de plantes médicinales, ou d'extraits de celles-ci, est traditionnellement pratiquée dans le monde dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires intestinales, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'arthrite, le diabète, les allergies, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson et le cancer.

D'après notre analyse d'articles, il a été rapporté que l'huile essentielle de thym réduit la production de NO dans les macrophages murins J774A.1. L'activité biologique des plantes médicinales dépend fortement de leur composition. Les principaux composés bioactifs des extraits de thym sont le carvacrol et le thymol. Le thymol présente de multiples activités biologiques, notamment des propriétés anti-inflammatoires, immunomodulatrices, antioxydante et antiradicalaires. Le carvacrol possède également des activités anti-inflammatoires, antioxydantes, ainsi que des effets antimutagènes et anticancérigènes. Des effets ont été démontrés sur le traitement des souris colitiques avec des huiles essentielles de thym contenant du thymol et du carvacrol comme principaux composés bioactifs, diminuant les niveaux des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF- α . Cependant, les mécanismes médiateurs de ces effets suppresseurs ne sont pas clairs. Le bornéol, autre composé présent dans le thym, a également été décrit comme anti-inflammatoire puisque sa supplémentation alimentaire diminue significativement la concentration des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-6 chez la souris.

On rapporte que les extraits de *T. vulgaris* possèdent un potentiel anticancéreux, selon plusieurs recherches. Ceux-ci incluent une activité significative de piégeage des radicaux libres et des effets pro-apoptotiques, et l'inhibition de la prolifération. Cependant, une enquête plus approfondie est nécessaire afin d'estimer le potentiel anticancéreux de l'huile essentielle de thym.

Jusqu'à présent, la plupart des recherches recueillies ont été basées sur des expériences in vitro et in vivo alors qu'il y a un énorme manque d'études cliniques, afin de pouvoir confirmer les effets bénéfiques des extraits de *Thymus* sur la santé humaine.

Après cette étude, le développement d'aliments fonctionnels enrichis par l'inclusion de thym aux propriétés à valeur ajoutée est d'un grand intérêt pour la communauté scientifique et pour l'industrie alimentaire. Ainsi, au-delà de leur rôle dans la saveur, les huiles essentielles de thym doivent être considérées comme des composants naturels de notre nutrition lorsqu'elles sont ajoutées aux aliments à des doses bien étudiées.

*Liste des
références*

Liste des références

- Abdellatif F, Hassani A. (2015). Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. *Journal of Materials and Environmental Science*. 6(1):207-213
- Abdelli, W., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., & Jirovetz, L. (2017). Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of Algerian *Thymus vulgaris* Essential Oil. *Natural product communications*, 12(4), 611–614.
- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezme, M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, 11(5), 627–635. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.627-635>
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*; 2:675–680.
- Alexa, E., Sumalan, R. M., Danciu, C., Obistoiu, D., Negrea, M., Poiana, M. A., Rus, C., Radulov, I., Pop, G., & Dehelean, C. (2018). Synergistic Antifungal, Allelopathic and Anti-Proliferative Potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(1), 185. <https://doi.org/10.3390/molecules23010185>
- Al-Menhali, A., Al-Rumaihi, A., Al-Mohammed, H., Al-Mazrooey, H., Al-Shamlan, M., AlJassim, M., Al-Korbi, N., & Eid, A. H. (2015). *Thymus vulgaris* (thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *Journal of medicinal food*, 18(1), 54–59. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.3121>
- Amiri H. (2012). Essential oils composition and antioxidant properties of three thymus species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ;2012(7):1–8.
- Amjad A. I., Parikh R. A., Appleman L. J., Hahm E. R., Singh K., Singh S. V. (2015). Broccoli-derived sulforaphane and chemoprevention of prostate cancer: From bench to bedside. *Curr. Pharmacol. Rep.* 1, 382–390.
- Andrew D Patterson, Frank J Gonzalez, Gary H Perdew, Jeffrey M Peters, (2018), Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe, *Toxicological Sciences*, Volume 165, Issue 2, Pages 277–283, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy185>
- Angélica Escobar, Miriam Pérez, Gustavo Romanelli, Guillermo Blustein,. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications, *Arabian Journal of Chemistry*, Volume 13, Issue 12, Pages 9243-9269, ISSN 1878-5352, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>.

- Anwar F., Hussain A.I., Sherazi S.T.H., Bhangar M.I. (2009), Changes in composition and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruit at different stages of maturity. *J. Herbs Spices Med. Plants* ;15:1–16. doi: 10.1080/10496470903139488.
- Asadbegi M, Yaghmaei P, Salehi I, Komaki A, Ebrahim-Habibi A., (2017). Investigation of thymol effect on learning and memory impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid beta peptide in high fat diet-fed rats. *Metabolic brain disease.* ;32(3):827-39.
- Asavarut P, Zhao H, Gu J, Ma D. (2013). The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ injury. *Acta Anaesthesiol Taiwanica* ; 51:28–33.
- Ascensão L, Pais MS (1988) Ultrastructure and histochemistry of secretory ducts in *Artemisia campestris* ssp. *maritima* (Compositae). *Nordic Journal of Botany* 8: 283-292.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). *Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 43(1), 385–406.* doi:10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530
- Association Française de Normalisation (AFNOR). (2000). *Huiles Essentielles, Tome 2, Monographies Relatives Aux Huiles Essentielles.* 6th ed. AFNOR, Association Française de Normalisation; Paris, France.
- Ayesh, B. M., Abed, A. A., & Faris, D. M. (2014). In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts. *BMC research notes*, 7, 612. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-612>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol* 46: 446– 75.
- Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. (2005). Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J Hum Hypertens* ; 19:149–154.
- Belmalha, S., M. El Idrissi, et al. (2015). "caracterisation chimique de certaines especes de thym marocain du moyen atlas (region de midelt) chemical characterization of some species of moroccan middle atlas thyme (region of midelt)." *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research* 3(2): 43-52.
- Beloued Abdelkader, (2001), plantes médicinales d'Algérie, édition : 2.01.4267, ISBN : 9961.1.0304.7 page 206.
- Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. (2000) Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax.* 55:114–120.

- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., & Horhat, F. G. (2014). Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, 7 Spec No. 3(Spec Iss 3), 56–60.
- Boskabady M.H., Aslani M.R., Kiani S. (2006). Relaxant effect of Thymus vulgaris on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Phytother Res*, pp. 28-33
- Boukhatem, M.N.; Darwish, N.H.E.; Sudha, T.; Bahlouli, S.; Kellou, D.; Benelmouffok, A.B.; Chader, H.; Rajabi, M.; Benali, Y.; Mousa, S.A. (2020). In Vitro Antifungal and Topical Anti-Inflammatory Properties of Essential Oil from Wild-Growing Thymus vulgaris (Lamiaceae) Used for Medicinal Purposes in Algeria: A New Source of Carvacrol. *Sci. Pharm.* 88, 33. <https://doi.org/10.3390/scipharm88030033>
- Braga PC, Dal Sasso M, Fonti E, Culici M. (2009) Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. *Pharmacology*, 83, 110–115.
- Braga PC, Dal Sasso M, Fonti E, Culici M. (2009) Antioxidant activity of bisabolol: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and cell-free systems. *Pharmacology*, 83, 110–115.
- Brusselle G, Bracke K. (2014). Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Annals American Thoracic Society*. 11:S322 -S328.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Intl J Food Microbiol* 94: 223– 53.
- Caissard JC, Joly C, Bergougnoux V, Huguency P, Mauriat M, et al. (2004) Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent research developments in cell biology* 2: 1-15.
- Carette Delacour A.S. *Ph.D. Thesis*. Université Lille 2; Lille, France: 2000. La Lavande et son Huile Essentielle.
- Carpenter KJ (2006) Specialized structures in the leaf epidermis of basal angiosperms: morphology, distribution, and homology. *Am J Bot* 93: 665-681.
- Carrero JJ, Yilmaz MI, Lindholm B, Stenvinkel P. (2008). Cytokine Dysregulation in Chronic Kidney Disease: How Can We Treat It? *Blood Purificat.* 26:291–299.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB. (2003). Inflammatory markers and onset of cardiovascular events. *Circulation*. 108: 2317–2322.
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, et al. (2011) Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Ann Bot* 107: 1287-1312.
- Chen F, Tholl D, D'Auria JC, Farooq A, Pichersky E, et al. (2003) Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers. *The Plant Cell Online* 15: 481-494.

- Cheng Y, Wang D, Wang B, Li H, Xiong J, Xu S, Chen Q, Tao K, Yang X, Zhu Y. (2017). HMGB1 translocation and release mediate cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice through a TLR4/MyD88-dependent signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 28:201–209.
- Chenni M, El Abed D, Rakotomanomana N, Fernandez X, Chemat F. (2016). Comparative study of essential oils extracted from microwave extraction. *Molecules*. 21:113-129
- Chwil M (2011) Micromorphology and anatomy of the floral elements of *Tradescantia x andersoniana* W Ludw Rohweder. *Acta Agrobotanica* 64: 15-24.
- Clastre M, Papon N, Courdavault V, Giglioli-Guivarc'h N, St-Pierre B, et al. (2011) Subcellular evidence for the involvement of peroxisomes in plant isoprenoid biosynthesis. *Plant signaling & behavior* 6: 2044-2046.
- Coussens L. M., Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867
- Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:2515–2532.
- Czerkies M, Kwiatkowska K. (2014). Toll-Like Receptors and their Contribution to Innate Immunity: Focus on TLR4 Activation by Lipopolysaccharide. *Adv Cell Biol*. 2014; 4:1–23.
- Dewick P.M. (2002) The biosynthesis of C5-C-25 terpenoid components. *Nat. Prod. Rep.* 19:181–222. doi: 10.1039/b002685i.
- Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C (2006) Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int J Aromather* 16: 95–100.
- Eckersall PD, Bell R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 2010; 185:23–27.
- Efferth, T., M. Banerjee, M.S. Abu-Darwish, S. Abdelfatah, M. Böckers, D. Bhakta-Guha, V. Bolzani, S. Daak, Ö.L. Demirezer, M. Dawood, M. et al. (2019). Biopiracy versus one-world medicine—from colonial relicts to global collaborative concepts. *Phytomedicine* 53: 319–331.
- Fachini-Queiroz FC, Kummer R, EstevaoSilva CF, Carvalho MD, Cunha JM, Grespan R, Bersani-Amado CA, Cuman RK. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (9):1-10.
- Fadel O, Ghazi Z, Mouni L, Benchat N, Ramdani M, Amhamdi H. (2011). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and traditional hydrodistillation methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2(2):112-117

- Fadel O, Ghazi Z, Mouni L, Benchat N, Ramdani M, Amhamdi H. (2011). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and traditional hydrodistillation methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2(2):112-117
- Frohlich E., Wahl R. (2015). Chemotherapy and chemoprevention by thiazolidinediones. *Biomed. Res. Int*. 2015, 845340.
- Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, 7(5), 1704–1714. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1007>
- Gersbach PV (2002) The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). *Ann Bot* 89: 255-260.
- Ghasemi Pirbalouti, Abdollah & Emami, Zohreh & Malekpoor, Fatemeh. (2015). An overview on genus *Thymus*. *Journal of Herbal Drugs. J Herbal Drugs*.
- Glass C. K., Saijo K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol*. 10, 365–376.
- Glodkowska-Mrowka E., Manda-Handzlik A., Stelmaszczyk-Emmel A., Seferynska I., Stoklosa T., Przybylski J., Mrowka P. (2016). PPAR γ ligands increase antileukemic activity of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia cells. *Blood Cancer J*. 6, e377.
- Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. (2009). Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psych*. 70:1078–1090.
- Golmakani M.T., Rezaei K.. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem*, 109 (2008), pp. 925-930
- Gong J., Chehrazi-Raffle A., Reddi S., Salgia R. (2018). Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: A comprehensive review of registration trials and future considerations. *J. Immunother. Cancer* 6, 8.
- Grespan R, Aguiar RP, Giubilei FN, Fuso RR, Damião MJ, Silva EL, Mikcha JG, Hernandez L, Bersani Amado C, Cuman RK. (2014). Hepatoprotective effect of pretreatment with *Thymus vulgaris* essential oil in an experimental model of acetaminophen-induced injury. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. (7):1-8.
- Grigor E. J. M., Fergusson D. A., Haggart F., Kekre N., Atkins H., Shorr R., Holt R. A., Hutton B., Ramsay T., Seftel M., et al. . (2017). Efficacy and safety of chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy in patients with haematological and solid malignancies: Protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7, e019321.

- Gudkov AV, Komarova EA. (2016). p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. CSH Perspect Med. 2016; <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026161>.
- Guenther E. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand Company Inc.; New York, NY, USA: 1948. p. 427.
- Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M. (2012). Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. Clin J Am Soc Nephrol. 7:1938–1946.
- Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* mill. Journal of Ethnopharmacology. 89(1):67-71
- Halliwell B, Gutteridge J.M, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. USA: Oxford University Press; 2015.
- Hawes CR, Coleman JO, Evans DE (1991) Endocytosis, exocytosis and vesicle traffic in plants. Cambridge University Press.
- Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, et al. (2009) Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food Chem 116: 714–21
- Hazzit, M. and A. Baaliouamer (2009). "Composition of the essential oils of the leaves and flowers of *Thymus pallescens* de Noé and *Origanum floribundum* Munby from Algeria." Journal of Essential Oil Research 21(3): 267-270.
- Headland SE, Norling LV. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. Semin Immunol. 27:149–160.
- Heidari, Z., Salehzadeh, A., Sadat Shandiz, S. A., & Tajdoost, S. (2018). Anti-cancer and antioxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles. 3 Biotech, 8(3), 177. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1199-x>
- Herbert, J. M., Augereau, J. M., Gleye, J., and Maffrand, J. P. (1990). Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 : 993 – 999 .
- Hotta, M., Nakata, R., Katsukawa, M., Hori, K., Takahashi, S., & Inoue, H. (2010). Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. Journal of lipid research, 51(1), 132–139. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900255-JLR200>
- Huang W, Tang Y, Li L. (2010). HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. Cytokine. 51:119–126.
- Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H., Przybylski R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils

- depends on seasonal variations. *Food Chem.* 108:986–995. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.010.
- Inoue , H. , C. Yokoyama , S. Hara , Y. Tone , and T. Tanabe . (1995) . Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J. Biol. Chem.* 270 : 24965 – 24971 .
- Iqbal, Javed & Abbasi, Banzeer & Batool, Riffat & Mahmood, Tariq & Ali, Barkat & Khalil, Ali & Kanwal, Sobia & Shah, Sayed & Ahmad, Riaz. (2018). Potential phytocompounds for developing breast cancer therapeutics: Nature’s healing touch. *European Journal of Pharmacology.* 827. 125-148. 10.1016/j.ejphar.2018.03.007.
- Iwasaki A, Medzhitov R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 5:987–995.
- Jamzad, Z. (2010). *Thymus and Satureja spp of Iran*, Research instituted of Forests and rangelands Press, 172 P.
- Jamzad, Z. (2009). *New Species and New Plant records of Lamiaceae from Iran.*
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. (2002). Innate immune recognition. *Annu rev of immunol.* 20:197–216.
- Jeyaratnam N, Nour AH, Akindoyo JO. (2016). Comparative study between hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation for extraction of cinnamomum cassia oil. *Journal of Engineering and Applied Science.* 11(4):2647-2652
- Juhas, Š., Bujňáková, D., Reháč, P., Čikoš, Š., Czikková, S., Veselá, J., ... Koppel, J. (2008). Anti-Inflammatory Effects of Thyme Essential Oil in Mice. *Acta Veterinaria Brno*, 77(3), 327–334. doi:10.2754/avb200877030327
- Kamiie Y, Sagisaka M, Nagaki M. (2014). Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* ‘Hidcote’: Comparison of hydrodistillation and supercritical fluid extraction methods. *Transactions of the Materials Research Society of Japan.* 39(4):485-489
- Kandoth C., McLellan M. D., Vandin F., Ye K., Niu B., Lu C., Xie M., Zhang Q., McMichael J. F., Wyczalkowski M. A., et al. . (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339.
- Karaman, S.; Digrak, M.; Ravid, U.; Ilcim, A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 76, 183–186.
- Khan MF, Dwivedi AK. (2018). A review on techniques available for the extraction of essential oils from various plants. *International Research Journal of Engineering and Technology.* 5(5):5-8

- Komaki A, Hoseini F, Shahidi S, Baharlouei N. (2016). Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on male rats' anxiety. *Journal of traditional and complementary medicine*. 6(3):257-61.
- Kubatka, P., Uramova, S., Kello, M., Kajo, K., Samec, M., Jasek, K., Vybohova, D., Liskova, A., Mojzis, J., Adamkov, M., Zubor, P., Smejkal, K., Svajdlenka, E., Solar, P., Samuel, S. M., Zulli, A., Kassayova, M., Lasabova, Z., Kwon, T. K., Pec, M., ... Büsselberg, D. (2019). Anticancer Activities of *Thymus vulgaris* L. in Experimental Breast Carcinoma in Vivo and in Vitro. *International journal of molecular sciences*, 20(7), 1749. <https://doi.org/10.3390/ijms20071749>
- Kubatka, Uramova, Kello, Kajo, Samec, Jasek, ... Büsselberg. (2019). *Anticancer Activities of Thymus vulgaris L. in Experimental Breast Carcinoma in Vivo and in Vitro. International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1749. doi:10.3390/ijms20071749
- Lawrence T. (2009). The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *CSH Perspect Biol*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
- Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K.G. (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem*, 91, pp. 131-137
- Leone A., Diorio G., Sexton W., Schell M., Alexandrow M., Fahey J. W., Kumar N. B. (2017). Sulforaphane for the chemoprevention of bladder cancer: Molecular mechanism targeted approach. *Oncotarget* 8, 35412–35424.
- Liang , Y. C. , S. H. Tsai , D. C. Tsai , S. Y. Lin-Shiau , and J. K. Lin . (2001). Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett*. 496 : 12 – 18.
- Liaqat, I., Riaz, N., Saleem, Q. U., Tahir, H. M., Arshad, M., & Arshad, N. (2018). Toxicological Evaluation of Essential Oils from Some Plants of Rutaceae Family. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 4394687. <https://doi.org/10.1155/2018/4394687>
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P Wallentin L. (2000). Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *New Engl J Med*.343:1139–1147.
- Lintermans LL, Stegeman CA, Heeringa P, Abdulahad WH. (2014). T cells in vascular inflammatory diseases. *Front Immunol*. 5:504.
- Litchenthaler H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:47–65. doi: 10.1146/annurev.arplant.50.1.47.

- Liu Z, Wang Y, Wang Y, Ning Q, Zhang Y, Gong C, Zhao W, Jing G, Wang Q. (2016). Dexmedetomidine attenuates inflammatory reaction in the lung tissues of septic mice by activating cholinergic anti-inflammatory pathway. *Int Immunopharmacol.*35:210–216.
- Loeb L. A., Harris C. C. (2008). Advances in chemical carcinogenesis: A historical review and prospective. *Cancer Res.* 68, 6863–6872.
- Lopresti AL, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. (2014). A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Prog neuro-psychoph.* 48:102–111.
- Machowska A, Carrero JJ, Lindholm B, Stenvinkel P. (2016). Therapeutics targeting persistent inflammation in chronic kidney disease. *Translat Res J La Clin Med.* 167:204–213.
- Mancini E., Senatore F., Del Monte D., De Martino L., Grulova D., Scognamiglio M., et al. (2015). Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*, 20, pp. 12016-12028
- Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E. (1994). Effects of variety and ontogenic stage on the essential oil composition and biological activity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) *J. Essent. Oil Res.* 6:57–62. doi: 10.1080/10412905.1994.9698325.
- Mcguffin M., Hobbs C., Upton R., Goldberg A. (1997). *American Herbal Products.*
- Michelina Catauro, Flavia Bollino, Elisabetta Tranquillo, Luigi Sapio, Michela Illiano, Ilaria Caiafa & Silvio Naviglio (2017) Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania *Thymus Vulgaris* essential oil, *Journal of Essential Oil Research*, 29:6, 461-470, DOI: 10.1080/10412905.2017.1351405
- Miladi H., Slama R.B., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E..(2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography–mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Nat Sci*, 5 (6), pp. 729-739
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. (2009). Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psych.* 65:732–741.
- Mitri Z., Constantine T., O'Regan R. (2012). The HER2 receptor in breast cancer: Pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemother. Res. Pract.* 2012, 1.
- Modzelewska A., Sur S., Kumar K.S., Khan S.R. (2005). Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents.* 54:477–499. doi: 10.2174/1568011054866973.
- Mohamed AA, El-Emary GA, Ali HF. (2010). Influence of some citrus essential oils on cell viability, glutathione-s-transferase and lipid peroxidation in Ehrlich ascites Carcinoma cells. *J Am Sci* 6: 820– 6.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P., Evans R. M., Martin K. J., Zhang M., Fletcher C., Singer S., Spiegelman B. M. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol. Cell* 1, 465–470.
- Muhammad Irshad, Muhammad Ali Subhani, Saqib Ali and Amjad Hussain (2019). Biological Importance of Essential Oils, *Essential Oils - Oils of Nature*, Hany A. El-Shemy, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.87198. Available from: <https://www.intechopen.com/books/essential-oils-oils-of-nature/biological-importance-of-essential-oils>
- Murakami A, Ohigashi H. (2007). Targeting NOX, INOS, COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int J Cancer*. 121:2357–2363.
- Murata H, Shimada N, Yoshioka M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*. 168:28–40.
- Musthaba M., Baboota S., Athar M.T., Thajudeen K.Y., Ahmed S., Ali J. (2010). Patented herbal formulations and their therapeutic applications. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 4, pp. 231-244
- Ngahang Kamte S. L., Ranjbarian F., Cianfaglione K., et al. (2018). Identification of highly effective antitrypanosomal compounds in essential oils from the Apiaceae family. 156:154–165. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.032.
- Ninomiya I., Yamazaki K., Oyama K., Hayashi H., Tajima H., Kitagawa H., Fushida S., Fujimura T., Ohta T. (2014). Pioglitazone inhibits the proliferation and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Oncol. Lett.* 8, 2709–2714.
- Norfatirah M, Tajuddin S, Chemat F, Rajan J, Yusoff M. (2013). Comparison of microwave-assisted extraction and hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Aquilaria malaccensis* (Agarwood) oil. In: *Proceedings of the ICNP*. Vol. 4. p. 227. DOI: 10.2174/2210289201304010227
- Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. (2011). Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*. 12:695–708.
- Oliviero, M., Romilde, I., Beatrice, M. M., Matteo, V., Giovanna, N., Consuelo, A., Claudio, C., Giorgio, S., Filippo, M., & Massimo, N. (2016). Evaluations of thyme extract effects in human normal bronchial and tracheal epithelial cell lines and in human lung cancer cell line. *Chemico-biological interactions*, 256, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.024>
- Opitz B, Van LV, Eitel J, Suttorp N. (2010). Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *American J Resp Crit Care Med*. 181:1294–1309.

- Özenver N., Efferth T. (2020) Integration of Phytochemicals and Phytotherapy into Cancer Precision Medicine. In: Bizzarri M. (eds) *Approaching Complex Diseases. Human Perspectives in Health Sciences and Technology*, vol 2. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32857-3_16
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *P Natl Acad Sci.* 97:13766–13771.
- Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ. (2004). Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *New Engl J Med.* 351:2599–2610.
- Pardoll D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 12, 252–264.
- Park J, Min JS, Kim B, Chae UB, Yun JW, Choi MS, Kong IK, Chang KT, Lee DS. (2015). Mitochondrial ROS govern the LPS-induced pro-inflammatory response in microglia cells by regulating MAPK, NF- κ B pathways. *Neurosci Lett.* 584:191–196.
- Pasquet, V. (2011). Recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle.
- Patel H, Patel V. H. (2015). Inflammation and Metabolic Syndrome- An Overview. *Curr Res Nutr Food Sci.* 3(3). doi : <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.3.3.10>
- Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. (2006) (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*, 78, 719–723.
- Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P. (2003). Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 41:1212–1218.
- Pophof B., Stange G., Abrell L. (2005). Volatile Organic Compounds as Signals in a Plant—Herbivore System: Electrophysiological Responses in Olfactory Sensilla of the Moth *Cactoblastis cactorum*. *Chem. Senses.* 30:51–68. doi: 10.1093/chemse/bji001.
- Rahman I, Adcock IM. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J.* 28:219–242.
- Rassem HHA, Nour AH, Yunus RM. (2016). Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 2016;10(1016):117-127
- Rehman S, Latief R, Bhat KA, Khuroo MA, Shawl AS, Chandra S. (2013). Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques. *Arabian Journal of Chemistry.* 10(2):S2485-S2490

- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biol Med.* 2010; 49:1603–1616.
- Reville K, Crean JK, Vivers S, Dransfield I, Godson C. (2006). Lipoxin A4 redistributes myosin IIA, Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *Jof Immunol.* 2006; 176:1878–1888.
- Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM. (2012) Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 656–663.
- Roby, M.H.H.; Sarhan, M.A.; Selim, K.A.H.; Khalel, K.I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crop. Prod.* 48, 43–48.
- Ross AC. (2009). Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial Activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis.* 49:1119–1127.
- Rota, C.; Herrera, A.; Martinez, R.M.; Sotomayor, J.A.; Jordán, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hymemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681–687.
- Schierbeck H, Lundbäck P, Palmblad K, Klevenvall L, Erlandssonharris H, Andersson U, Ottosson L. (2011). Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Mol Med.* 17:1039–1044.
- Schwarz K., Ernst H., Ternes W. (1996). Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *J Sci Food Agric*, 70, pp. 217-223
- Sell C.S. (2006). *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer.* 2nd ed. The Royal Society of Chemistry; Cambridge, UK: p. 329.
- Seong SY, Matzinger P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 4:469–478.
- Serhan CN, Savill J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 6:1191–1197.
- Sertel S, Eichhorn T, Plinkert P, Efferth (2011). T: Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 31:81–87.
- Sharifi-Rad J, Salehi B, Schnitzler P, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Fathi M, Eisazadeh M, Sharifi-Rad M. (2017). Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oil of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia*

- royleana Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)*. 63(8):42–47.
- Sharifi-Rad J, Soufi L, Ayatollahi SA, Iriti M, Sharifi-Rad M, Varoni EM, Shahri F, Esposito S, Kuhestani K. (2016). Anti-bacterial effect of essential oil from *Xanthium strumarium* against shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology*. 62(9):69-74.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Salehi B, SharifiRad J, Matthews KR, Ayatollahi SA, Kobarfard F, Ibrahim SA, Mnayer D, Zakaria ZA, Sharifi-Rad M. (2017). Plants of the genus *Zingiber* as a source of bioactive phytochemicals: From tradition to pharmacy. *Molecules*. 22(12):2145-65.
- Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, Furberg CD, Psaty BM. (2003). Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation*. 107: 87–92.
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. (2016). Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00.00160>.
- Suire C, Bouvier F, Backhaus RA, Bégu D, Bonneau M, et al. (2000) Cellular localization of isoprenoid biosynthetic enzymes in *Marchantia polymorpha*. Uncovering a new role of oil bodies. *Plant Physiol* 124: 971-978.
- Tepe, B.; Daferera, D.; Sökmen, M.; Sökmen, A. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extract of *Thymus eigii* M. Zohary et PH Davis. *J. Agric. Food Chem*. 52, 1132–1137.
- Tepe, B.; Sökmen, M.; Akpulat, H.A.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sokmen, A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *J. Food Eng*. 66, 447–454.
- Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. (2014), Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79: R1231-R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Torres C., Linares A., Alejandre M.J., Palomino- Morales R.J., Delgado J.R. and Perales S., (2016). Interplay between gemcitabine and erlotinib over pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas*, 45, 269–80.
- Tortorella S. M., Royce S. G., Licciardi P. V., Karagiannis T. C. (2015). Dietary sulforaphane in cancer chemoprevention: The role of epigenetic regulation and HDAC inhibition. *Antioxid. Redox. Signal*. 22, 1382–1424.
- Tsai M-L, Lin C-C, Lin W-C, Yang C-H. (2011) Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 1977–1983.

- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *BBA-Mol Cell Res.* 1843:2563–2582.
- Vainstein A., Lewinsohn E., Pichersky E., Weiss D. (2001). Floral Fragrance. New Inroads into an Old Commodity. *Plant Physiol.* 27:1383–1389. doi: 10.1104/pp.010706.
- Vane J. R. (1971). “Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs,” *Nature*, vol. 231, no. 25, pp. 232–235.
- Veras HNH, Araruna MKA, Costa JGM, Coutinho HDM, Kerntopf MR, Botelho MA, Menezes IRA. (2013) Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* CHAM: possible mechanism of action. *Phytotherapy Research*, 27, 179–185.
- Veras HNH, Araruna MKA, Costa JGM, Coutinho HDM, Kerntopf MR, Botelho MA, Menezes IRA. (2013) Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* CHAM: possible mechanism of action. *Phytotherapy Research*, 27, 179–185.
- Vigo, E., Cepeda, A., Gualillo, O., & Perez-Fernandez, R. (2004). In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(2), 257–263. <https://doi.org/10.1211/0022357022665>
- Wan Z., Shi W., Shao B., Shi J., Shen A., Ma Y., Chen J., Lan Q. (2011). Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone inhibits β -catenin-mediated glioma cell growth and invasion. *Mol. Cell. Biochem.* 349, 1–10.
- Wang G, Tian L, Aziz N, Broun P, Dai X, et al. (2008) Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiol* 148: 1254-1266.
- Wasserscheid AJ, Wasserscheid P. (2010). A brief review on essential oil extraction and equipment. *Chemical Technology.* (1):19-24
- Yamamoto M, Takeda K. (2010). Current Views of Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Gastroenterol Res Pract.* <https://doi.org/10.1155/2010/240365>.
- Zhang Y, Niu Y, Luo Y, Ge M, Yang T, Yu LL, Wang Q. (2014). Fabrication, characterization, and antimicrobial activity of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate–chitosan hydrochloride double layers. *Food chemistry.* 142(11):269-75.
- Zhong W, Chi G, Jiang L, Soromou LW, Chen N, Huo M, Guo W, Deng X, Feng H. (2012) p-Cymene modulates in vitro and in vivo cytokine production by inhibiting MAPK and NF- κ B activation. *Inflammation*, 36, 529–537.
- Zouari N. (2013). Essential Oils Chemotypes: A Less Known Side. *Med Aromat Plants* 1: e145. doi:10.4172/2167-0412.1000e145

Annexe

Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of Algerian *Thymus vulgaris* Essential Oil

Wafae Abdelli^a, Fouad Bahri^a, Abderrahmane Romane^b, Martina Höferl^c, Juergen Wanner^d,
Erich Schmidt^e and Leopold Jirovetz^c

^aLaboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem, Algeria

^bLaboratory of Applied Organic Chemistry, Semlalia, Cadi Ayyad University, Marrakech, Morocco

^cDepartment of Pharmaceutical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria

^dKurtKitzing Co., Hintern Alten Schloss, Wallerstein, Germany

bahrifouad13@gmail.com

Received: November 15th, 2016; Accepted: January 2nd, 2017

This work aims to elucidate the chemical composition of two essential oil (EO) samples obtained from the leaves of *Thymus vulgaris* L. (*Lamiaceae*) collected in two regions of Northwestern Algeria (Tlemcen and Mostaganem) and to assess their *in vivo* acute toxicity and anti-inflammatory activity. Sixty-six compounds could be identified by means of simultaneous GC-FID and GC-MS, accounting for 99.3% of total thyme oil of Mostaganem (EO.TM) and 99.0% of Tlemcen (EO.TT). In both samples, thymol was the major component, amounting to 59.5% (EO.TM) and 67.3% (EO.TT) of the total oil. EO.TT proved to be acutely toxic to mice at a dose of 4500 mg/kg p.o., whereas EO.TM did not show signs of acute toxicity, even at the highest dose tested (5000 mg/kg p.o.). Both EO samples were proven to possess anti-inflammatory activities, significantly reducing carrageenan-induced paw edema in mice (after 6 hours at a dose of 400 mg/kg p.o.) at 58.4% for EO.TT and 50.4% for EO.TM, respectively. In conclusion, it could be demonstrated that EOs of *T. vulgaris* exhibit a considerable *in vivo* anti-inflammatory activity at non-toxic doses.

Keywords: *Thymus vulgaris* L., Essential oil, Chemical composition, Acute toxicity, Anti-inflammatory activity.

Inflammatory processes are non-specific defense mechanisms developed to protect tissues against damage by harmful stimuli, e.g. pathogens, physical damage or chemical irritants, and initiating repair mechanisms [1]. Unfortunately, inflammation is accompanied by various undesirable symptoms, e.g. edema, erythema and pain, alleviated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs with well-known gastrointestinal, renal and cardiovascular adverse effects. Thus, there has recently been an increasing interest in highly effective anti-inflammatory agents from natural sources with as little adverse reaction as possible.

Thyme (*Thymus vulgaris* L., *Lamiaceae*) is widely used in traditional medicine and phytotherapy [2]. Its essential oil has been proven to possess a great variety of biological properties, including antibacterial [3, 4], antifungal [5], anthelmintic [6], insect repellent [7], antioxidant [8] and anticancer [4, 9] effects, often attributed to its high yield of phenolic compounds, i.e. thymol and carvacrol. Up to now, only little is known about anti-inflammatory effects of thyme EOs [10] though there is strong evidence that the antioxidant potential of phenols such as thymol are associated with inhibitory effects on inflammatory processes [11].

In the present study, we aimed at examining the composition of the leaf EOs of *T. vulgaris*, collected in two regions of Northwestern Algeria, Mostaganem and Tlemcen, and evaluating their *in vivo* acute oral toxicity and anti-inflammatory properties using the carrageenan-induced paw edema test. To our best knowledge, this is the first time that *T. vulgaris* EOs from western Algeria have been analyzed.

The EO yields were 2.2% for EO.TM and 4.2% for EO.TT, respectively, determined on dry weight basis, confirming previous

results for a *T. vulgaris* EO from Algeria [12]. The EO compositions, analyzed by simultaneous GC-FID and GC-MS, are presented in Table 1. In total, 66 volatile compounds could be identified, accounting for 99.3% of EO.TM and 99% of EO.TT. Both samples are dominated by monoterpenes and their oxygenated derivatives, the major component being thymol with 59.5% in EO.TM and 67.3% in EO.TT, respectively, whereas carvacrol was only found in traces in both EOs. Thus, it can be concluded that the analyzed EOs are typical representatives of the *T. vulgaris* chemotype thymol [13]. In both samples, thymol is accompanied by minor amounts of its biosynthetic precursors [14], γ -terpinene (8.7% in EO.TM; 10.1% in EO.TT) and *p*-cymene (5.6% in EO.TM; 6.0% in EO.TT). The present results are in accordance with results of *T. vulgaris* EOs of the same chemotype [3]. Interestingly, a previous study on Algerian thyme EO [12] revealed an unusually high content of *p*-cymene (26.4%) compared with thymol (25.6%), which may be explained by differences in plant age and harvesting times [15].

Concerning the acute toxicity study of *T. vulgaris* EOs, mortality was observed in 2 out of 3 mice 24 hours after testing EO.TT at a dose of 4500 mg/kg. Sedation and dyspnea were also noted during the first hours after treatment with this dose. According to the guidelines [16], a toxic dose 4500 mg/kg can be concluded for mice. Concerning EO.TM, no mortality was recorded in the mice tested, but sedation was observed during the first hours after treatment with 5000 mg/kg.

The results of the assessment of anti-inflammatory activity by carrageenan-induced paw edema in mice are given in Table 2 and Figure 1. The edema volume increases progressively depending on hours, reaching its peak in the control group four hours after carrageenan injection.



Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs

Mei-Lin TSAI,¹ Chih-Chien LIN,² Wei-Chao LIN,¹ and Chao-Hsun YANG^{2,†}

¹Department of Cosmetic Science, Chia Nan University of Pharmacy and Science, 60, Sec. 1, Erh-Jen Rd., Jen-Te, Tainan, 71710, Taiwan, ROC

²Department of Cosmetic Science, Providence University, 200, Chung-Chi Road, Shalu, Taichung, 43301, Taiwan, ROC

Received May 12, 2011; Accepted July 8, 2011; Online Publication, October 7, 2011

[doi:10.1271/bbb.110377]

Eucalyptus bridgesiana, *Cymbopogon martinii*, *Thymus vulgaris*, *Lindernia anagallis*, and *Pelargonium fragrans* are five species of herbs used in Asia. Their essential oils were analyzed by GC-MS, and a total of 36 components were detected. The results of our study indicated that, except for the essential oil of *P. fragrans*, all of the essential oils demonstrated obvious antimicrobial activity against a broad range of microorganisms. The *C. martinii* essential oil, which is rich in geraniol, was the most effective antimicrobial additive. All of the essential oils demonstrated antioxidant activities on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay, β -carotene/linoleic acid assay, and nitric oxide radical scavenging assay. Furthermore, the *T. vulgaris* essential oil, which possesses plentiful thymol, exhibited the highest antioxidant activity. For *P. acnes*-induced secretion of pro-inflammatory cytokines, the essential oils of *P. aeruginosa*, *C. martinii*, and *T. vulgaris* reduced the TNF- α , IL-1 β , and IL-8 secretion levels of THP-1 cells.

Key words: *Eucalyptus bridgesiana*; *Cymbopogon martinii*; *Thymus vulgaris*; *Lindernia anagallis*; *Pelargonium fragrans*

In recent years, the measurement and utilization of plant essential oils has become increasingly important in scientific research and industrial applications, including pharmaceutical, nutritional, and cosmetic uses,^{1,2)} primarily due to the oils' various potent biological activities, including antimicrobial,³⁾ antioxidant,⁴⁾ and anti-inflammatory⁵⁾ activities. The infection process frequently induces inflammation, and free radicals are released from the phagocytes during the inflammatory process.⁶⁾ Because various skin disorders, including atopic dermatitis⁷⁾ and acne vulgaris,⁸⁾ are associated with infection-stimulated inflammation, the presence of antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory agents might explain the effectiveness of some plant essential oils in the treatment of these syndromes. This fact also indicates that antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities are good targets for natural product development. Moreover, in many regions of the world, aromatic herbs still play major roles in primary health care, particularly in rural areas.⁹⁾ Thus, an understanding of the biological activities of herbs can provide many

functional components and additives for medical, nutritional, and cosmetic products.

The vast majority of *Eucalyptus* species belong to the family Myrtaceae and originated in Australia. Several species are widespread throughout the world, including *Eucalyptus bridgesiana*.¹⁰⁾ *Eucalyptus* essential oils are found in the leaves, fruits, buds, and bark of the tree,^{11,12)} but only a small number of studies have described the essential oil of *E. bridgesiana*. *Cymbopogon martinii* produces a geraniol-rich, commercially valuable essential oil. The essential oil of *C. martinii* has been employed to impart a rose-like fragrance to a broad range of perfumes, soaps, and cosmetic products.¹³⁾ The genus *Thymus* comprises 300–400 species, several of which are utilized in folk medicine. *Thymus vulgaris* is the most important medicinal *Thymus* and has been administered for dry coughs, bronchitis, indigestion, and gastritis.¹⁴⁾ *Lindernia anagallis* belongs to the family Scrophulariaceae and is normally grown in tropical and semi-tropical regions. Although *L. anagallis* is employed as a folk medicine in many countries, this study is the first to investigate the effectiveness of the essential oil of this common plant. The genus *Pelargonium* contains a large number of species with scented leaves exhibiting various fragrances, ranging from pleasantly fruity and floral scents to oppressively balsamic aromas. In addition, commercial geranium oil has been extracted from the leaves of several *Pelargonium* species and cultivars.¹⁵⁾ *Pelargonium fragrans* might also represent a useful source of commercial geranium oil, but the chemical and biological characteristics of the *P. fragrans* essential oil have not been fully elucidated. These five herbs are regularly and widely used in many areas, but only a few studies have described the chemical and biological features of these essential oils. Moreover, no studies have yielded information about the essential oils of *L. anagallis* and *P. fragrans*. Hence, investigation of these five selected herbs is important.

In this study, we examined the antimicrobial activity of essential oils against several microorganisms, including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Candida albicans*, and *Pityrosporum ovale*. The antioxidant activities of the essential oils were determined by various antioxidant assays, including 2,2-diphenyl-1-

† To whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: +886-4-26311167; E-mail: chyang@pu.edu.tw

Anti-Inflammatory Effects of Thyme Essential Oil in Mice

Š. JUHÁS¹, D. BUJŇÁKOVÁ¹, P. REHÁK¹, Š. ČIKOŠ¹, S. CZIKKOVÁ¹, J. VESELÁ²,
G. ILKOVÁ¹, J. KOPPEL¹

¹Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

²Šafárik University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Košice, Slovakia

Received December 10, 2007

Accepted April 14, 2008

Abstract

Juhás Š., D. Bujňáková, P. Rehák, Š. Čikoš, S. Czikková, J. Veselá, G. Ilková, J. Koppel: Anti-Inflammatory Effects of Thyme Essential Oil in Mice. Acta Vet. Brno 2008, 77: 327-334.

Plant essential oils are plant secondary metabolites possessing various pharmacological properties, primarily anti-oxidative, antimicrobial or immunomodulatory ones. The aim of this work was to study the effects of thyme essential oil dietary administration in murine DTH/CHS reaction, carrageenan paw oedema and TNBS colitis. Thyme essential oil was added to the murine diet at three concentrations (5000, 2500 and 1250 ppm) and fed to Balb/c mice. The extent of ear swelling in DTH/CHS reaction and paw oedema induced by carrageenan application was measured using the Mitutoyo thickness gauge. In the model of TNBS colitis we evaluated the changes in body weight, the colon weight : body weight ratio, bacterial translocation to mesenteric lymph nodes, and macroscopical and histological scores. IL-1 β and IL-6 messenger RNA expression in colonic samples of one experimental group were assessed using quantitative real-time reverse transcriptase PCR. Dietary supplementation with 5000 ppm of thyme essential oil significantly decreased paw oedema and ear swelling. This thyme essential oil concentration caused a significant inhibition of total mRNA IL-1 β expression in the mouse colon, and markedly decreased the macroscopic and microscopic scores of colitis. On the other hand, the 1250 ppm of thyme essential oil in diet increased ear oedema induced by oxazolone application in mice. Our study indicates that thyme essential oil is able to affect murine experimental inflammatory models depending on the concentration used. It is concluded that the anti-inflammatory effects of thyme essential oil should be interpreted with a caution due to its contradictory, dose-related effects.

Inflammation, DTH/CHS reaction, carrageenan paw oedema, colitis, thyme essential oil, cytokines

A large number of plant species contain various bioactive compounds exhibiting health-beneficial properties, anti-oxidative, anti-inflammatory and mainly antimicrobial effects, and their preventive and therapeutic use increases. Numerous natural products have been already tested in various animal models for the development of new anti-inflammatory therapeutics.

Contact hypersensitivity (CHS) experimental models are commonly used in rodents to investigate possible anti-inflammatory agents (Verdrengh et al. 2003; Wee et al. 2005; Puebla-Pérez et al. 2003). CHS is one of the forms of delayed type of hypersensitivity (DTH) which is a T-cell-mediated, antigen-specific skin inflammation induced by skin exposure to hapten (e.g. oxazolone, dinitrofluorobenzene). Carrageenan-induced mouse paw oedema is frequently used to determine the anti-inflammatory activity of various bioactive compounds. Recently Posadas et al. (2004) divided the inflammatory response to carrageenan into an early phase lasting 6 h and a second late response that peaks at 72 h, although only 7- or 8-week old mice displayed a consistent response in both phases. Carrageenan-induced mouse paw oedema has been used for assessment of the anti-inflammatory activity of many plant extracts and essential oils (Khalil et al. 2006; Orhan et al. 2006; Hajhashemi et al. 2003).

Address for correspondence:

Doc. MVDr. Juraj Koppel, DrSc.
Institute of Animal Physiology
Slovak Academy of Sciences
Šoltésovej 4 - 6
040 01 Košice, Slovak Republic

Phone: +421 55 72 87 841
Fax: +421 55 72 87 842
E-mail: koppel@saske.sk
<http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>

Research Article

Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response

Fernanda Carolina Fachini-Queiroz,¹ Raquel Kummer,¹ Camila Fernanda Estevão-Silva,¹ Maria Dalva de Barros Carvalho,² Joice Maria Cunha,³ Renata Grespan,¹ Ciomar Aparecida Bersani-Amado,¹ and Roberto Kenji Nakamura Cuman¹

¹ Department of Pharmacology and Therapeutic, State University of Maringá, 870020-900 Maringá, PR, Brazil

² Department of Medicine, State University of Maringá, 870020-900 Maringá, PR, Brazil

³ Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, 80060-000 Curitiba, PR, Brazil

Correspondence should be addressed to Roberto Kenji Nakamura Cuman, rkncuman@uem.br

Received 9 February 2012; Accepted 7 May 2012

Academic Editor: Ke Ren

Copyright © 2012 Fernanda Carolina Fachini-Queiroz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) is an aromatic and medicinal plant that has been used in folk medicine, phytopharmaceutical preparations, food preservatives, and as an aromatic ingredient. The effect of *Thymus vulgaris* essential oil (TEO) and its isolated constituents thymol and carvacrol (CVL) were studied in the following experimental models: ear edema, carrageenan-induced pleurisy, and chemotaxis *in vitro*. In the pleurisy model, TEO, CVL, and thymol significantly inhibited inflammatory edema. However, only TEO and CVL inhibited leukocyte migration. In the *in vitro* chemotaxis experiment, CVL inhibited leukocyte migration, whereas thymol exerted a potent chemoattractant effect. In the ear edema model, CVL (10 mg/ear), applied topically, reduced edema formation, exerting a topical anti-inflammatory effect. Thymol did not reduce edema formation but rather presented an irritative response, probably dependent on histamine and prostanoid release. Our data suggest that the anti-inflammatory effects of TEO and CVL are attributable to the inhibition of inflammatory edema and leukocyte migration.

1. Introduction

Thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae), a small subshrub native to the western Mediterranean region of Europe, has a long history of use and is a chemically variable species [1]. In folk medicine, some *Thymus* spp. are used for their antihelminthic, expectorant, antiseptic, antispasmodic, antimicrobial, antifungal, antioxidative, antiviral, carminative, sedative, and diaphoretic effects. They are usually administered by infusion or are used externally in baths to cure rheumatic and skin disease [2, 3]. Reports indicate that the volatile oils of thyme are among the main essential oils used in the food industry and in cosmetics as preservatives and antioxidants [1].

Thymus vulgaris essential oil (TEO) is a mixture of monoterpenes. The main compounds of this oil are the natural terpenoid thymol and its phenol isomer carvacrol (CVL) [4, 5], which have antioxidative, antimicrobial, antitussive,

expectorant, antispasmodic, and antibacterial effects [6–10]. Terpenoids, flavonoid aglycones, flavonoids glycosides, and phenolic acids were also found in *Thymus* spp. [11].

Several studies have been performed with plant extracts [4, 12, 13], but few studies have evaluated the effects of TEO and its isolated constituents in the inflammatory response. In the present study, the effects of TEO and its isolated components thymol and CVL were studied in experimental models of ear edema, carrageenan-induced pleurisy, and chemotaxis *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Isolation of the Essential Oil

2.1.1. Plant Material. The fresh leaves of *Thymus vulgaris* L. were collected from the Profa Irenice Silva Medicinal Plant Garden on the campus of the State University of Maringá,

Article

In Vitro Antifungal and Topical Anti-Inflammatory Properties of Essential Oil from Wild-Growing *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) Used for Medicinal Purposes in Algeria: A New Source of Carvacrol

Mohamed Nadjib Boukhatem ^{1,2,*}, Noureldien H.E. Darwish ^{1,3}, Thangirala Sudha ¹, Siham Bahlouli ², Dahbia Kellou ⁴, Amina Bouchra Benelmouffok ⁴, Henni Chader ^{5,6}, Mehdi Rajabi ¹, Yasmine Benali ⁷ and Shaker A. Mousa ^{1,*}

¹ The Pharmaceutical Research Institute, Albany College of Pharmacy and Health Sciences, Rensselaer, New York, NY 12144, USA; noureldien.darwish@acphs.edu (N.H.E.D.); sudha.thangirala@acphs.edu (T.S.); m.rajabi.s@gmail.com (M.R.)

² Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université–Saad Dahlab–Blida 1, 270 BP, Blida 09000, Algeria; bahlouli.siham@yahoo.com.

³ Clinical Pathology Department, Hematology Unit, Mansoura Faculty of Medicine, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt

⁴ Laboratoire de Mycologie, Institut Pasteur d'Algérie, Route du petit Staouéli, Dely-Brahim, Alger 16047, Algeria; kellou.dahbia@yahoo.com (D.K.); amina.benelmouffok@yahoo.com (A.B.B.)

⁵ Service Pharmaco-Toxicologie, Laboratoire National de Contrôle des Produits Pharmaceutiques, Route du petit Staouéli, Dely-Brahim, Alger 16047, Algeria; hennichader@hotmail.fr

⁶ Faculté de Médecine, Université Ben Youcef Ben Khedda, Alger I, Algiers 16000, Algeria

⁷ Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques Vétérinaires, Institut Pasteur d'Algérie, Alger 16047, Algeria; yasmiebenali@yahoo.com

* Correspondence: mn.boukhatem@yahoo.fr (M.N.B.); shaker.mousa@acphs.edu (S.A.M.); Tel.: +213-664-983-174 (M.N.B.); +1-518-694-7397 (S.A.M.); Fax: +1-518-694-7567 (S.A.M.)

Received: 9 May 2020; Accepted: 2 June 2020; Published: 3 August 2020

Abstract: The aim of this study is to investigate the *Thymus vulgaris* essential oil (TVEO) as an antifungal agent in aromatherapy and/or as an active ingredient in the prevention or management of topical inflammatory diseases. The chemical composition of TVEO was determined with gas chromatography and revealed the presence of 25 compounds. Carvacrol was found to be the major component (56.8%). Antifungal action of TVEO was determined in vitro by using different methods. By the disc diffusion method, TVEO showed more potent antifungal activity against *Candida* strains than the positive control. The diameter of inhibition zone (DIZ) varied from 34 to 60 mm for *Candida* yeasts. Significantly higher antifungal activity was observed in the vapor phase at lower quantities. *Candida albicans* and *C. parapsilosis* were the most susceptible strains to the oil vapor with DIZ varying from 35 to 90 mm. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of yeast were determined with an agar dilution method and revealed that MIC varied from 0.3 to 0.15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for yeast species. The topical anti-inflammatory potential of TVEO was also explored in vivo with the croton oil-induced ear edema assay. TVEO exhibited a potent anti-inflammatory effect at all doses (100, 10 and 2 mg/kg), which were statistically similar ($p > 0.05$) to the positive control. This activity was also confirmed at the cellular level with histopathology analysis. Our results suggest the potential application of this carvacrol-rich TVEO in the prevention and management of fungal infections and topical inflammation and deserve further investigation for clinical applications. Furthermore, while the mode of action remains mainly undetermined and should be studied.

In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves

H. Ismaili^a, L. Milella^b, S. Fkih-Tetouani^c, A. Ildrissi^c, A. Camporese^d,
S. Sosa^e, G. Altinier^e, R. Della Loggia^e, R. Aquino^{b,*}

^a *Faculté de Médecine et Pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Morocco*

^b *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno, Fisciano (Salerno), Italy*

^c *Faculte des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, Morocco*

^d *Unità di Microbiologia Clinica e Terapia Antibiotica, Ospedale Generale "S. Maria degli Angeli", Pordenone, Italy*

^e *Dipartimento di Economia e Merceologia, Università di Trieste, Trieste, Italy*

Received 13 May 2003; received in revised form 23 October 2003; accepted 17 November 2003

Abstract

Four extracts at increasing polarity were prepared from the leaves of *Thymus satureioides* Coss. (Labiatae) and assayed for the in vivo topical anti-inflammatory effect using the croton oil ear test in mice, and for in vitro both antioxidant (DPPH° test) and anti-bacterial (broth microdilution method) activities. The chloroform extract showed a topical anti-inflammatory activity ($ID_{50} = 282 \mu\text{g cm}^{-2}$), only three times lower than that of the reference drug indomethacin ($ID_{50} = 93 \mu\text{g cm}^{-2}$) and its active components were identified as ursolic and oleanolic acids. The methanol extract, showing a significant radical-scavenging effect ($SC_{50} = 14.54 \mu\text{g}$), was characterized by the isolation and identification of some flavonoids. On the contrary, the extracts did not show any anti-bacterial effect against four standard aerobic bacteria strains.

© 2003 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: *Thymus satureioides* extracts; Triterpenes; Flavonoids; Topical anti-inflammatory activity; Free radical-scavenging effect

1. Introduction

Various *Thymus* species are aromatic plants of the Mediterranean flora, commonly used as spices and as traditional medicine remedies. They are also reported to possess some biological effects such as antispasmodic (Meister et al., 1999), antibacterial (Essawi and Srour, 2000), antiviral, expectorating (Brasseur, 1983) and antioxidant activities (Miura and Nakatami, 1989). Recently, we found that the chloroform extracts of two related *Thymus* species, endemic to Morocco, *Thymus willdenowii* Boiss and *Thymus broussonettii* Boiss (Ismaili et al., 2001, 2002), were responsible for the topical anti-inflammatory activity of the plants. *Thymus satureioides* Coss. (Labiatae), trivial name "azukni," is a North African species typical of arid habitats used in the Moroccan folk medicine in form of infuse and decoctions to treat whooping cough, bronchitis and rheumatism (Bellakhadar et al., 1991) and, generally, for its anti-inflammatory properties after topical or oral administration. Previous investigations on this species have been lim-

ited to the study of the composition and anti-microbial activity of the essential oil (Lattaoui et al., 1993; Lattaoui and Tantaoui-Elaraki, 1994) and to the survey of the presence of some methoxylated flavonoids (Voinin et al., 1985), whereas no pharmacological studies on the non-volatile extracts are reported. In this paper the in vivo topical anti-inflammatory effect (croton oil ear test in mice), and the in vitro antioxidant (DPPH° test) and anti-bacterial (broth microdilution assay) activities were studied. While no anti-microbial activity was observed against four standard aerobic bacteria strains, the bioassay-oriented fractionation (Tubaro et al., 1985) revealed that the highest anti-inflammatory activity is due to the chloroform extract and its components, ursolic and oleanolic acids. A significant radical-scavenging activity was shown by the methanolic extract containing flavonoids.

2. Materials and methods

2.1. General

A Bruker DRX-600 spectrometer operating at 599.2 MHz for ¹H and 150.9 for ¹³C, using the UXNMR software

* Corresponding author. Tel.: +39-089-962-814; fax: +39-089-962-828.
E-mail address: aquino@unisa.it (R. Aquino).

Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression^S

Mariko Hotta,* Rieko Nakata,* Michiko Katsukawa,* Kazuyuki Hori,[†] Saori Takahashi,[†] and Hiroyasu Inoue^{1,*}

Department of Food Science and Nutrition,* Nara Women's University, Nara 630-8506, Japan; and Department of Bioengineering,[†] Akita Research Institute of Food and Brewing, 010-1623, Japan

Abstract Cyclooxygenase-2 (COX-2), the rate-limiting enzyme in prostaglandin biosynthesis, plays a key role in inflammation and circulatory homeostasis. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-dependent transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily and are involved in the control of COX-2 expression, and vice versa. Here, we show that COX-2 promoter activity was suppressed by essential oils derived from thyme, clove, rose, eucalyptus, fennel, and bergamot in cell-based transfection assays using bovine arterial endothelial cells. Moreover, from thyme oil, we identified carvacrol as a major component of the suppressor of COX-2 expression and an activator of PPAR α and γ . PPAR γ -dependent suppression of COX-2 promoter activity was observed in response to carvacrol treatment. In human macrophage-like U937 cells, carvacrol suppressed lipopolysaccharide-induced COX-2 mRNA and protein expression, suggesting that carvacrol regulates COX-2 expression through its agonistic effect on PPAR γ . These results may be important in understanding the antiinflammatory and antilifestyle-related disease properties of carvacrol.—Hotta, M., R. Nakata, M. Katsukawa, K. Hori, S. Takahashi, and H. Inoue. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. *J. Lipid Res.* 2010. 51: 132–139.

Supplementary key words cyclooxygenase • peroxisome proliferator-activated receptor • thymol • essential oil

Cyclooxygenase (COX), the rate-limiting enzyme in prostaglandin (PG) biosynthesis, has two isoforms, COX-1 and -2. COX-1 is constitutively expressed in most cells, whereas COX-2 is typically absent. However, COX-2 is induced by inflammatory stimuli such as endotoxins and lipopolysaccharide (LPS), suggesting that COX-2 plays a role in inflammation (1–3). Recent studies have shown that COX-2 is involved in not only inflammation but also circulatory homeostasis (4–6).

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are members of a nuclear receptor family of ligand-dependent transcription factors (7). The PPAR subfamily comprises three isotypes, PPAR α , β/δ , and γ , which play various roles in lipid and carbohydrate metabolism, cell proliferation and differentiation, and inflammation; they are considered molecular targets against lifestyle-related diseases (8, 9). The PGD₂ metabolite 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂) was identified as a potent natural ligand of PPAR γ (10, 11). Previously, we reported that 15d-PGJ₂ suppressed LPS-induced expression of COX-2 in differentiated, macrophage-like U937 cells, but not in vascular endothelial cells, and that the expression of COX-2 was regulated by a negative feedback loop mediated through PPAR γ , especially in macrophages (12). Likewise, the PPAR α agonist fenofibrate inhibited interleukin-1-induced COX-2 expression in smooth muscle cells (13). These findings indicate that PPARs participate in cell type-specific control of COX-2 expression.

Resveratrol, a phytoalexin and antioxidant polyphenolic compound found in red wine and various plant products, has long been suspected to have cardioprotective effects and to be a contributor to the so-called “French paradox” (i.e., the relatively low incidence of coronary heart disease in France compared to other developed countries with comparable diets; 14–16). We demonstrated that resveratrol suppressed COX-2 expression in 184B5/HER-transformed mammary epithelial cells (17), activated PPAR α and γ in cell-based reporter assays using bovine arterial endothelial cells (BAEC), and protected the brain against ischemic stroke in mice through a PPAR α -dependent mechanism (18). Similarly, polypheno-

Abbreviations: BAEC, bovine arterial endothelial cell; COX, cyclooxygenase; FID, flame ionization detection; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; LPS, lipopolysaccharide; 15d-PGJ₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂; PG, prostaglandin; PKC, protein kinase C; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TRP, transient receptor potential.

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: inoue@cc.nara-wu.ac.jp

^SThe online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains supplementary data in the form of two tables and five figures.

This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (nos. 15310158 to H.I. and 19300250 to H.I. and R.N.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

Manuscript received 26 May 2009 and in revised form 29 June 2009.

Published, JLR Papers in Press, July 3, 2009
DOI 10.1194/jlr.M900255-JLR200

In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages

E. Vigo, A. Cepeda, O. Gualillo and R. Perez-Fernandez

Abstract

It is well known that nitric oxide (NO) plays an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Eucalyptus globulus* Labill. and *Thymus vulgaris* L. have been used in traditional medicine in the treatment of bronchitis, asthma and other respiratory diseases. The present study focuses on the effects of these two extracts on NO production induced by lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) in the murine macrophage cell line J774A.1. In addition, cell viability, scavenging activity and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression were evaluated. *E. globulus* and *T. vulgaris* extracts significantly inhibited the enhanced production of NO induced by LPS and IFN- γ in a dose-dependent manner. Treatment with these two extracts did not reduce cell viability at any dose used. Both plant extracts showed significant scavenging of NO radicals released by an NO donor, PAPA-NONOate. Results also show that pre-treatment with *E. globulus* and *T. vulgaris* extracts significantly inhibits iNOS mRNA expression. This study thus suggests that the inhibition of net NO production by these two extracts may be due to their NO scavenging activity and/or their inhibitory effects on iNOS gene expression.

Introduction

Nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine in numerous mammalian cells and tissues. It has diverse physiological roles and may also contribute to pathological processes. The physiological actions of NO are implemented by NO at low concentrations (about 10^{-12} M) acting as a labile intracellular messenger molecule in, for example, the regulation of vascular tone or in neurotransmission. Physiological NO production is mediated by two enzymes (constitutive nitric oxide synthases, cNOS), which were originally detected in endothelial cells (eNOS) and in neurons (nNOS), and which are generally constitutive. However, when NO is synthesized in large quantities (10^{-9} M) by activated inflammatory cells, it has cytotoxic properties and may be involved in the pathogenesis of acute and chronic inflammatory conditions (Moilanen et al 1999). This NO production is mediated by an enzyme termed inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is inducible by several stimuli, including bacterial lipopolysaccharide (LPS) and interferon- γ (IFN- γ). iNOS is present in macrophages and hepatocytes. During inflammation associated with different pathologies, NO production increases significantly (Kharitonov et al 1994) and may become cytotoxic. Moreover, the free radical nature of NO and its high reactivity with oxygen to produce peroxynitrite (ONOO $^-$) makes NO a potent oxidant molecule able to induce oxidative damage and to be potentially harmful towards cellular targets (Epe et al 1996). Thus inhibition of NO production in response to inflammatory stimuli might be a useful therapeutic strategy in inflammatory diseases (Hobbs et al 1999; Sautebin 2000).

Eucalyptus globulus Labill. and *Thymus vulgaris* L. extracts have been used in traditional medicine in the treatment of bronchitis, asthma and other respiratory diseases (Alonso 1998). It has been demonstrated that the antibacterial properties of eucalyptus oil are effective not only against *Streptococcus* D isolated from bronchial aspirates, but also against pathogenic strains of *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (Benouda et al 1988). In addition, eucalyptus oil increases

Department of Physiology,
School of Medicine, University of
Santiago de Compostela, 15782
Santiago de Compostela, Spain

E. Vigo, A. Cepeda,
R. Perez-Fernandez

Laboratorio de Investigación 4,
Area de Docencia e
Investigación, Hospital Clínico
Universitario, 15782 Santiago de
Compostela, Spain

O. Gualillo

Correspondence:

R. Perez-Fernandez,
Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina,
Universidad de Santiago de
Compostela, 15782 Santiago de
Compostela, Spain. E-mail:
fsropefe@usc.es

Acknowledgements and

funding: This work was supported by an I+D research grant (2000/CE535) from Bioserum Laboratorios, S.L. We thank Angeles Checa for helping us with extract preparation. O. Gualillo is a recipient of research contract 00/3051 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.



Article

Anticancer Activities of *Thymus vulgaris* L. in Experimental Breast Carcinoma In Vivo and In Vitro

Peter Kubatka ^{1,2,*}, Sona Uramova ³, Martin Kello ⁴, Karol Kajo ^{5,6}, Marek Samec ³, Karin Jasek ², Desanka Vybohova ⁷, Alena Liskova ³, Jan Mojzis ^{4,*}, Marian Adamkov ⁸, Pavol Zubor ³, Karel Smejkal ⁹, Emil Svajdlenka ⁹, Peter Solar ¹⁰, Samson Mathews Samuel ¹¹, Anthony Zulli ¹², Monika Kassayova ¹³, Zora Lasabova ², Taeg Kyu Kwon ¹⁴, Martin Pec ¹, Jan Danko ³ and Dietrich Büsselberg ^{11,*}

- ¹ Department of Medical Biology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, 036 01 Martin, Slovakia; pec@jfmed.uniba.sk
 - ² Division of Oncology, Biomedical Center Martin, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, 036 01 Martin, Slovakia; jasek@jfmed.uniba.sk (K.J.); Zora.Lasabova@jfmed.uniba.sk (Z.L.)
 - ³ Department of Obstetrics and Gynecology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, 036 01 Martin, Slovakia; sonicka.rybka@gmail.com (S.U.); marek.samec@uniba.sk (M.S.); alenka.liskova@gmail.com (A.L.); Pavol.Zubor@jfmed.uniba.sk (P.Z.); danko@jfmed.uniba.sk (J.D.)
 - ⁴ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, P. J. Šafarik University, 040 11 Košice, Slovakia; Martin.Kello@upjs.sk (M.K.)
 - ⁵ St. Elisabeth Oncology Institute, Department of Pathology, 812 50 Bratislava, Slovakia; kkajo@ousa.sk
 - ⁶ Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, 845 05 Bratislava, Slovakia
 - ⁷ Department of Anatomy, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, 036 01 Martin, Slovakia; desanka.vybohova@jfmed.uniba.sk
 - ⁸ Department of Histology and Embryology, Jessenius Faculty of Medicine, Comenius University in Bratislava, 036 01 Martin, Slovakia, adamkov@jfmed.uniba.sk
 - ⁹ Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, 612 42 Brno, Czech Republic; karel.mejkal@post.cz (K.S.); svajdlenkae@vfu.cz (E.S.)
 - ¹⁰ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, P. J. Safarik University, 040 11 Kosice, Slovakia; solarpeter@yahoo.com
 - ¹¹ Weill Cornell Medicine in Qatar, Qatar Foundation-Education City, Doha 24144, Qatar; sms2016@qatar-med.cornell.edu
 - ¹² Institute for Health and Sport, Victoria University, Melbourne, VIC 3011, Australia; Anthony.Zulli@vu.edu.au
 - ¹³ Department of Animal Physiology, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, P. J. Šafarik University, 040 01 Košice, Slovakia; monika.kassayova@upjs.sk
 - ¹⁴ Department of Immunology and School of Medicine, Keimyung University, Dalseo-Gu, Daegu 426 01, Korea; kwontk@dsmc.or.kr
- * Correspondence: kubatka@jfmed.uniba.sk (P.K.); jan.mojzis@upjs.sk (J.M.); dib2015@qatar-med.cornell.edu (D.B.)

Received: 26 February 2019; Accepted: 6 April 2019; Published: 9 April 2019



Abstract: Naturally-occurring mixtures of phytochemicals present in plant foods are proposed to possess tumor-suppressive activities. In this work, we aimed to evaluate the antitumor effects of *Thymus vulgaris* L. in in vivo and in vitro mammary carcinoma models. Dried *T. vulgaris* (as haulm) was continuously administered at two concentrations of 0.1% and 1% in the diet in a chemically-induced rat mammary carcinomas model and a syngeneic 4T1 mouse model. After autopsy, histopathological and molecular analyses of rodent mammary carcinomas were performed. In addition, in vitro evaluations using MCF-7 and MDA-MB-231 cells were carried out. In mice, *T. vulgaris* at both doses reduced the volume of 4T1 tumors by 85% (0.1%) and 84% (1%) compared to the control, respectively. Moreover, treated tumors showed a substantial decrease in necrosis/tumor area ratio and mitotic activity index. In the rat model, *T. vulgaris* (1%) decreased the tumor frequency by 53% compared to the control. Analysis of the mechanisms of anticancer action included well-described and validated

Thymus vulgaris (Thyme) Inhibits Proliferation, Adhesion, Migration, and Invasion of Human Colorectal Cancer Cells

Afnan Al-Menhali,* Aisha Al-Rumaihi,* Hana Al-Mohammed,* Hana Al-Mazrooei,*
Maryam Al-Shamlan,* Meaad AlJassim,* Noof Al-Korbi,* and Ali Hussein Eid

Department of Biological and Environmental Sciences, Qatar University, Doha, Qatar.

ABSTRACT Colorectal cancer (CRC) remains one of the most common malignancies and a leading cause of cancer-related deaths. Its prognosis remains poor for patients with several grades of this disease. This underscores the need for alternative modalities, such as herbal medicines, to treat this disease. A commonly used plant that appears to be of high medicinal value is *Thymus vulgaris* L. However, the effects of this plant on the malignant behavior of human CRC cells remains poorly investigated. This study was undertaken to determine the anticancer efficacy of *T. vulgaris* extract (TVE) in CRC cells. Our results show that TVE inhibits proliferation in a concentration- and time-dependent fashion. This decreased proliferation was concomitant with increased apoptotic cell death as evidenced by increased caspase3/7 activity. Moreover, TVE also decreased adhesion to fibronectin in a concentration-dependent manner. The migratory and invasive capacities of HCT116 cells were significantly inhibited by TVE. Taken together, these data suggest that the TVE inhibits malignant phenotype of colon cancer cells. Therefore, *T. vulgaris* could have an anticancer effect and that some of its bioactive compounds may prove to be effective treatment modalities for human CRC.

KEY WORDS: • colorectal cancer • herbal medicine • malignancy • *Thymus vulgaris*

INTRODUCTION

COLORECTAL CANCER (CRC) is the third most common cancer and the second leading cause of cancer-related mortality in the United States of America and Qatar.^{1,2} Estimates for cancer incidence in 40 European countries indicate that CRC was the most common cancer during the period of the study.³ Such a high prevalence mandated that increased efforts be expended to better understand and eventually treat CRC. Indeed, different therapeutic modalities for CRC have improved over the last decade.

Although surgery, radiotherapy, and chemotherapy have been primary CRC treatments in recent years, side effects and high rate of toxicity for these modalities are of great concern, in addition to the low response rate of these types of treatments. For example, prognosis of CRC remains poor even with comprehensive treatment, given that the 5-year survival rate is around 10% for Dukes D patients.^{4,5} Targeted therapy combined with chemotherapeutic agents like 5-fluoruracil has resulted in better outcomes than other approaches in advanced stages of CRC. However, the majority of patients with metastatic CRC cases do not respond to such regimen.⁶ Therefore, there is a critical need for alternative

approaches that are more effective with lower undesirable side effects.

Herbal medicine has been gaining increased attention in recent decades.⁷ Indeed, more than half of the currently available pharmaceutical drugs are obtained from plants or herbs.^{8,9} Furthermore, the use of traditional herbs is based on the experience accumulated over centuries, and these herbs are used by people due to their low cost, high effectiveness, as well as ease of access.

Thymus vulgaris L is one of many traditional herbs that have been shown to possess therapeutic potential. This plant is native to the Mediterranean region especially Southern Europe and the Middle East as well as Western Asia. *T. vulgaris* has leaves of 4–12 mm in length and 3 mm in width and the petiole is very short. When it flowers in the summer, it has pink to purple flowers which possess a unique smell and are rather attractive to bees, flies, and other insects.

Historically, the use of this plant dates back to ancient Sumerians around 3500 years ago. It was originally used for its aromatic fragrance; however, its use for the treatment of several conditions such as sore throat, back pain, and other conditions highlight its consideration as a very important medicinal herb.¹⁰ Reports indicate that thyme reduces inflammation and irritation associated with skin disorders such as acne and psoriasis, as well as eczema and other types of dermatitis. It can accelerate healing of bruises, burns, cuts, sores, and wounds.¹⁰ Additionally, leaves and flowering parts of thyme are utilized for their antiseptic, tonic, antitussive, or carminative potential, as well as in treating colds.¹¹

*Equal contribution.

Article received 4 December 2013. Revision accepted 31 August 2014.

Address correspondence to: Ali Hussein Eid, MSc, PhD, Department of Biological and Environmental Sciences, Doha PO Box 2713, Qatar, E-mail: ali.eid@qu.edu.qa

RESEARCH ARTICLE

Open Access

In vitro inhibition of human leukemia THP-1 cells by *Origanum syriacum* L. and *Thymus vulgaris* L. extracts

Basim M Ayesh¹, Abdalla A Abed² and Doa'a M Faris^{3*}

Abstract

Background: Natural products including, traditional medicinal plants have emerged as a tempting alternative to conventional chemotherapeutic protocols of leukemia because of their minimum side effects and less documented drug resistance.

Methods: Ethanol extracts were prepared from *Thymus vulgaris* L. and *Origanum syriacum* L. plants and investigated against the THP-1 leukemia cell line and freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and the lactate dehydrogenase (LDH) assay were respectively used to determine the cellular viability and cytotoxicity in response to treatment with increasing extract concentrations.

Results: Both extracts exhibited a concentration dependent reduction in viability of the THP-1 cells ($IC_{50} = 2.126$ mg/mL for *O. syriacum*, and 0.1569 mg/mL for *T. vulgaris*). *O. syriacum* was more potent against the PBMCs ($IC_{50} = 0.4247$ mg/mL), while *T. vulgaris* was moderately selective ($IC_{50} = 0.3345$ mg/mL with PBMCs and SI = 2.1). Only in *O. syriacum* the reduction in cells viability was caused by cytotoxic effect against leukemic cells ($LC_{50} = 9.646$ mg/mL).

Conclusion: *T. vulgaris* and *O. syriacum* are both antileukemic *in vitro*. *T. vulgaris* represents a potential selective cytostatic and safe target for future anticancer agents' development. *O. syriacum* on the other hand is cytotoxic against the leukemia cell line THP-1.

Keywords: Leukemia, THP-1 Cells, *Origanum syriacum*, *Thymus vulgaris*, Antiproliferative, Cytotoxic

Background

Depending on its type, leukemia may be successfully treated with chemotherapy, radiation therapy, hormonal therapy, or bone marrow transplantation. However, chemotherapeutic agents are highly toxic to a wide range of normal body cells, and thus are associated with diverse side effects. In addition, multiple drug resistance is a major determinant of chemotherapy failure. Therefore, natural products including, traditional medicinal plants, have emerged as a tempting more tolerated alternative with minimum side effects.

The leaves of *Origanum syriacum* L. (Syrian Oregano), which belongs to the Lamiaceae family and inhabits a large area in the eastern Mediterranean, have been

widely used in the traditional herbal medicine [1,2]. Its composition and effects as antioxidant and antibacterial were extensively studied, but few were concerned with the antiproliferative and anticancer activities of this plant [3,4].

Thymus vulgaris L. (thyme) is a member of the genus *Thymus* (Lamiaceae family) which is predominantly found in the Mediterranean region, Asia, Southern Europe and North Africa [5]. Extracts of *T. vulgaris* are traditionally used as anti-asthmatic, bronchodilator, antitussive, antispasmodic [6], antibacterial, and antifungal [7,8]. In addition, these extracts have shown immunomodulating properties [9,10]. Different studies proposed that extracts of *Thymus vulgaris* may have potential anticancer effects [11-15].

In this study, we investigated the antiproliferative and cytotoxic effects of extracts from *Origanum syriacum*

* Correspondence: d_fariss@yahoo.com

³European Gaza Hospital Laboratory, Ministry of Health, Gaza, Palestine
Full list of author information is available at the end of the article



Anti-cancer and anti-oxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles

Zahra Heidari¹ · Ali Salehzadeh² · Seyed Ataollah Sadat Shandiz³ · Sara Tajdoost¹

Received: 3 July 2017 / Accepted: 5 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

This study highlights the anti-oxidant and anti-cancer activities of bio-functionalized *Thymus vulgaris* silver nanoparticles (TVAgNPs) and bioactive compounds were compared using the human breast cancer T47D cell line. The aqueous ethanolic extract of *T. vulgaris* evaluated for chemical composition using the gas chromatography–mass spectrometer (GC–MS) analysis. The prepared TVAgNPs were determined by means of UV–Vis spectroscopy, FTIR spectroscopy, zeta potential, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and energy-dispersed spectroscopy analysis. The *T. vulgaris* extract and TVAgNPs were studied for their in vitro anti-oxidant property by 2, 2-diphenyl, 1-picryl hydrazyl (DPPH) assay. Microscopic observations indicated spherical shaped and monodispersed nanoparticles and the average size of the nanoparticles was about 30 nm. Regarding the elemental composition profile of the TVAgNPs, the highest signal of silver (89.30%) was detected followed by other elements. An absorption peak was registered at 440 nm according to surface plasmon resonance (SPR) of the TVAgNPs in solution. A zeta potential of fabricated nanoparticles was approximately – 12.6 mV, indicating higher stability of the bio-functionalized TVAgNPs. The *T. vulgaris* extract and synthesized TVAgNPs were evaluated for their anti-cancer activity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and Annexin V double staining with propidium iodide (PI) flow cytometric analysis toward T47D cells. The cytotoxicity properties of the bio-functionalized *T. vulgaris* AgNPs revealed that the sensitivity of T47D human breast cancer cells is high compared with *T. vulgaris* extract. The Annexin V/PI staining indicated that the fabricated TVAgNPs shows increased apoptosis in T47D cells as compared to untreated cells. Besides, the anti-oxidant activity of the TVAgNPs clarified a higher anti-radical-scavenging activity compared to *Thymus vulgaris* extract. Our data show that the potential biological activities of the bioactive constituents of *T. vulgaris* can be enhanced through bio-functionalized *T. vulgaris* AgNPs due to the bioorganic compounds that exist in the extract.

Keywords Anti-cancer · Anti-oxidant · Silver nanoparticles · T47D · *Thymus vulgaris*

Introduction

Metallic nanoparticles have become progressively popular because of their application potential in electrical, optical, catalysis, magnetic, photonic, and chemical processes (Barabadi et al. 2017; Parameshwaran et al. 2013; Shenya

et al. 2011). Among different metal nanoparticles, silver nanoparticles (AgNPs) have attracted more attention of researchers due to their broad scope for investigation in terms of catalysis, anti-oxidant, anti-fungal, anti-microbial, anti-platelet, anti-viral, and anti-cancer activities (Asgary et al. 2016; Zayed et al. 2012; Ghanbar et al. 2017; Gopinath et al. 2013). Different chemical and physical methods have been used for the synthesis of AgNPs (Ramteke et al. 2013; Roopana et al. 2013). However, the main disadvantage with these reported methods is the use of hazardous reagents, high-energy requirement, difficulty in purification, and high synthesis costs. Methods that are safe, easy-to-handle, and possess potential for scaling up are also preferred. Nowadays, the biologically green synthesized AgNPs using plant extracts have received significant importance over physical

✉ Zahra Heidari
heidari.z@asaiau.ac.ir

¹ Department of Biology, Astaneh Ashrafiyeh Branch, Islamic Azad University, Astaneh Ashrafiyeh, Iran

² Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

³ Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/318477862>

Chemical analysis and anti-proliferative activity of Campania Thymus Vulgaris essential oil

Article in *Journal of Essential Oil Research* · July 2017

DOI: 10.1080/10412905.2017.1351405

CITATIONS

7

READS

434

7 authors, including:



Michelina Catauro

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli

202 PUBLICATIONS 3,397 CITATIONS

SEE PROFILE



Flavia Bollino

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli

70 PUBLICATIONS 1,814 CITATIONS

SEE PROFILE



Elisabetta Tranquillo

The University of Manchester

28 PUBLICATIONS 309 CITATIONS

SEE PROFILE



Luigi Sapio

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli

33 PUBLICATIONS 541 CITATIONS

SEE PROFILE



Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



anthropic pollution in the environment [View project](#)

Article

Synergistic Antifungal, Allelopathic and Anti-Proliferative Potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils

Ersilia Alexa ¹, Renata Maria Sumalan ^{2,*} , Corina Danciu ³, Diana Obistoiu ⁴,
Monica Negrea ¹ , Mariana-Atena Poiana ¹, Cristian Rus ¹, Isidora Radulov ⁵, Georgeta Pop ⁵
and Cristina Dehelean ³

¹ Faculty of Food Processing Technology, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "King Michael I of Romania" from Timisoara, Calea Aradului, No. 119, Timisoara 300645, Romania; alexa.ersilia@yahoo.ro (E.A.); negrea_monica2000@yahoo.com (M.N.); atenapoiana@yahoo.com (M.-A.P.); ruscrastian181@yahoo.com (C.R.)

² Faculty of Horticulture and Forestry, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "King Michael I of Romania" from Timisoara, Calea Aradului, No. 119, Timisoara 300645, Romania

³ Faculty of Pharmacy, "Victor Babes" University of Medicine and Pharmacy Timisoara, Eftimie Murgu Square, No. 2, Timisoara 300041, Romania; corina.danciu@umft.ro (C.D.); cadehelean@umft.ro (C.D.)

⁴ Interdisciplinary Research Platform, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "King Michael I of Romania" from Timisoara, Calea Aradului, No. 119, Timisoara 300645, Romania; diana.obistoiu@yahoo.com

⁵ Faculty of Agriculture, Banat's University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine "King Michael I of Romania" from Timisoara, Calea Aradului, No. 119, Timisoara 300645, Romania; isidoraradulov@yahoo.com (I.R.); getapop_tm@yahoo.com (G.P.)

* Correspondence: srenata_maria@yahoo.com; Tel.: +40-723-346-537

Received: 26 November 2017; Accepted: 13 January 2018; Published: 16 January 2018

Abstract: The current study aimed to investigate the chemical composition and the synergistic potential of two essential oils (EOs), as obtained from *Salvia officinalis* L. (SEO), and *Thymus vulgaris* L. (TEO). The antifungal potential was tested in vitro against *Fusarium graminearum* (Fg 06_17), the herbicidal effect was studied using weed seeds of *Amaranthus retroflexus* (ARET), *Chenopodium album* (CALB), *Echinochloa crus-galli* (EGAL), but also wheat seeds (WS) of the Lovrin variety and tomato seeds Saint-Pierre of the variety. The GC-MS profile highlights that the main compounds identified in SEO were: caryophyllene (25.364%), camphene (14.139%), eucalyptol (13.902%), and β -pinene (11.230%), while in TEO, the predominant phytochemicals were: γ -terpinene (68.415%) and *p*-thymol (24.721%). The results indicated that the tested EOs alone as well as in combination have allelopathic effect against investigated seeds, while the synergistic effect of TEO and SEO in terms of fungal growth was demonstrated at a level of 0.06%. Thyme and sage EOs exhibited in vitro anti-proliferative activity on two melanoma cell lines, namely A375 human melanoma and B164A5 mouse melanoma alone, as well as in combination. SEO was most effective in terms of decreasing the cell viability of murine and human melanoma cell lines when compared to TEO.

Keywords: *Salvia officinalis*; *Thymus vulgaris*; *Fusarium graminearum*; A375 human melanoma; B164A5 mouse melanoma

1. Introduction

Sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) are medicinal aromatic plants of the Lamiaceae family grown on a large scale in southern and eastern Europe. The importance given to the



Evaluations of thyme extract effects in human normal bronchial and tracheal epithelial cell lines and in human lung cancer cell line



Marinelli Oliviero ^{a,1}, Iannarelli Romilde ^{a,1}, Morelli Maria Beatrice ^b, Valisi Matteo ^c, Nicotra Giovanna ^c, Amantini Consuelo ^d, Cardinali Claudio ^b, Santoni Giorgio ^a, Maggi Filippo ^{a,**}, Nabissi Massimo ^{a,*}

^a School of Pharmacy, University of Camerino, Camerino, MC, Italy

^b Dept. Experimental Medicine, University Sapienza, Rome, Italy

^c Epo s.r.l., Istituto Farmochimico Fitoterapico, Milano, Italy

^d School of Biosciences and Veterinary Medicine, Camerino, MC, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2016

Received in revised form

6 June 2016

Accepted 27 June 2016

Available online 29 June 2016

Keywords:

Thymus vulgaris

Anti-inflammatory

Normal bronchial and tracheal epithelial

cells (HBEpC/HTEpC)

Lung cancer

Thymol

NF-κB

ABSTRACT

Thyme (*Thymus vulgaris*) is used traditionally to prepare herbal remedies possessing expectorant, mucolytic, antitussive and antispasmodic properties.

The aim of the present study was to investigate the effects of a standardized hydroalcoholic extract of thyme on primary human airway (bronchial/tracheal) epithelial cell lines in a model of lung inflammation induced by LPS. In addition, the effects of thyme extract on human lung cancer cell line (H460) were analysed. Thyme extract showed significant anti-inflammatory properties by reducing the NF-κB p65 and NF-κB p52 transcription factors protein levels followed by the decrease of pro-inflammatory cytokines (IL-1 beta and IL-8), and Muc5ac secretion in human normal bronchial and tracheal epithelial cells. Moreover, the extract showed cytotoxic effects on H460 cancer cells, modulated the release of IL-1 beta, IL-8 and down-regulated NF-κB p65 and NF-κB p52 proteins.

Taken together, these results substantiated the traditional uses of thyme in the treatment of respiratory diseases. Thyme extract might be an effective treatment of chronic diseases based on inflammatory processes when hypersecretion of mucus overwhelms the ciliary clearance and obstructs airways, causing morbidity and mortality. Moreover thyme extract, evaluated in H460 lung cancer cell line, demonstrated to induce cell cytotoxicity in addition to reduce inflammatory cell signals.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammatory lung pathologies have become one of the most prevalent diseases in Europe and are relevant cause of morbidity,

mortality and health care expenditure. Many lung diseases are of inflammatory origin and the symptoms of these disorders are mediated by allergen-induced inflammatory reaction in the airways [1]. Whereby, the degranulation of resident mast cells and the release of pro-inflammatory mediators from lung epithelial cells, trigger and increase vascular permeability and infiltration of activated inflammatory cells [2]. As a consequence, chronic inflammation and destructive structural changes occur in the airways [3,4]. Despite the recommended therapy is based on inhalative anti-inflammatory drugs such as glucocorticoids that suppress the inflammatory processes and bronchodilators that act on reversing muscle contractility [5], the use of traditional herbal remedies in the treatment of respiratory diseases is widely adopted by world population [6]. In this regard, one of the most used herbal drugs is definitely thyme, encompassing several species belonging to the genus *Thymus* L. (Lamiaceae family) that are used throughout the

Abbreviation: Abs, Antibodies; HBEpC/HTEpC, Bronchial/tracheal epithelial cells; CF, cystic fibrosis; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; GCH, goblet cell hyperplasia; IL-1 beta, interleukin-1 beta; LPS, lipopolysaccharide; PI, propidium iodide; TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; NF-κB, Nuclear factor-κB.

* Corresponding author. University of Camerino, Section of Experimental Medicine, School of Pharmacy, via Madonna delle Carceri 9, 62032 Camerino, MC, Italy.

** Corresponding author. University of Camerino, School of Pharmacy, via Sant'Agostino 1, 62032 Camerino, MC, Italy.

E-mail addresses: filippo.maggi@unicam.it (M. Filippo), massimo.nabissi@unicam.it (N. Massimo).

¹ Contributed equally to this work.

Journal Pre-proofs

Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: comparison with endemic Iberian *Thymus* species

Meriem Taghouti, Carlos Martins-Gomes, Luís M. Félix, Judith Schäfer, João A. Santos, Mirko Bunzel, Fernando M. Nunes, Amélia M Silva

PII: S0308-8146(20)31224-3

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127362>

Reference: FOCH 127362

To appear in: *Food Chemistry*

Received Date: 8 January 2020

Revised Date: 10 April 2020

Accepted Date: 14 June 2020

Please cite this article as: Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Félix, L.M., Schäfer, J., Santos, J.A., Bunzel, M., Nunes, F.M., Silva, A.M., Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: comparison with endemic Iberian *Thymus* species, *Food Chemistry* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127362>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.

