

## Study of anti-eczema activity of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum* and *Mentha spicata* from Morocco

### [ Etude de l'activité anti-eczémateuse des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum* et *Mentha spicata* du Maroc ]

Rachid Ismaili, Abdeslam Lamiri, and Khadija Moustaid

Laboratoire de Chimie appliquée et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan1 Km 3, B.P. 577, Settat, Maroc

Copyright © 2016 ISSR Journals. 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.

**ABSTRACT:** Contact dermatitis is a common skin disease in Morocco, which represents about 20% of dermal diseases treated in Moroccan hospitals. In this study, our aim was to investigate the anti-eczema activity of essential oils of three Moroccan aromatic and medicinal plants: *Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* and *Citrus limonum* vis-a-vis the contact dermatitis which is a manifestation allergic to the skin, in response to contact with a foreign substance called allergen. It is characterized by irregular lesions sometimes microvesiculeuses or dry. These lesions are characterized functionally by intense itching and scratching force, they may be infected. The three oils studied, have shown efficacy in the treatment of contact dermatitis.

**KEYWORDS:** *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Mentha spicata*, essential oil, anti-eczema activity.

**RESUME:** L'eczéma de contact représente une dermatose très fréquente au Maroc et qui représente environ 20 % des maladies dermatiques traitées en milieu hospitalier marocain. L'objectif de ces travaux est d'étudier l'activité anti-eczémateuse des huiles essentielles de trois plantes aromatiques et médicinales marocaines : *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum* et *Mentha spicata* vis-à-vis de l'eczéma de contact qui est une manifestation allergique au niveau de la peau, en réaction au contact d'une substance étrangère dite allergène. Cette affection se caractérise par des lésions déchiquetées, parfois microvésiculeuses ou sèches. Ces lésions sont caractérisées sur le plan fonctionnel par un prurit intense et à force de grattage, elles peuvent s'infecter. Les trois huiles étudiées, ont montré une efficacité dans le traitement de l'eczéma de contact.

**MOTS-CLEFS:** *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Mentha spicata*, huile essentielle, l'activité anti-eczémateuse.

## 1 INTRODUCTION

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine. Les plantes médicinales renferment un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [1]. De ce fait, plusieurs études récentes se sont intéressées à la médecine traditionnelle [2]. En effet, les vertus thérapeutiques des plantes médicinales et aromatiques ont été expérimentées depuis des siècles et la valorisation de leurs huiles essentielles dans différentes applications notamment en tant qu'anti-inflammatoires, antiseptiques, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides, insectifuges, tonifiantes, stimulantes, et calmantes, a été rapportée [3], [4]. Le Maroc est doté d'une biodiversité végétale, avec un grand nombre de plantes médicinales utilisées dans le traitement de l'eczéma de contact qui représente l'une des

maladies dermatiques les plus fréquentes au niveau national [5], [6]. Cette maladie se définit comme une réaction immunitaire d'hypersensibilité retardée qui est induite par l'activation dans la peau de lymphocytes T spécifiques de l'haptène [7] qui est une substance chimique différente des constituants de l'organisme, de faible masse moléculaire, réactogène mais qui n'est pas immunogène quand elle est seule [7]. Une haptène peut devenir immunogène, après fixation à un porteur qui est le plus souvent une protéine [7].

L'objectif de cette étude est tout d'abord l'extraction des huiles essentielles du *T. vulgaris*, *M.spicata* et du *C. limonum*. Ces plantes ont été ciblées après une enquête ethnobotanique dans plusieurs villes marocaines.

Pour tester l'activité anti-eczémateuse de ces huiles nous avons utilisé des souris albinos pour concevoir un modèle eczémateux et des lapins albinos pour la réalisation du test d'irritation cutanée.

## **2 MATERIEL ET METHODES**

### **2.1 MATERIEL VEGETAL**

Les échantillons de *T. vulgaris* ont été récoltés dans la province de Tafilelt, *C. limonum* dans la province d'Agadir et *M. spicata* dans la province de Settat. Les récoltes ont été réalisées pendant le mois d'Avril. Les feuilles du thym, de la menthe ainsi que les fruits du *C. limonum* ont été coupés à la main et mises dans des sacs cartonnés, transportés immédiatement au laboratoire et stockés à T°C ambiante jusqu'à utilisation (Maximum une semaine).

### **2.2 MATERIEL BIOLOGIQUE**

Douze lapins albinos de sexe mâle de souche californienne et dont le poids est compris entre 1,5 et 2 Kg ont été élevés à l'animalerie de l'institut Pasteur et ont reçus comme nourriture du blé, orge, maïs et des carottes et comme boisson de l'eau;

Quatre vingt sept souris albinos de sexe mâle de souche swiss et dont le poids est de  $18 \pm 0,4$ g ont été élevés à l'animalerie de l'institut Pasteur et ont reçus comme nourriture un mélange de blé, orge et maïs et comme boisson de l'eau ;

### **2.3 PREPARATION DES HUILES ESSENTIELLES**

Les huiles ont été préparées par hydrodistillation, en utilisant un appareil de type Clevenger [8], dans un ballon de 5 litres contenant 2 litres d'eau distillée et surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur et 2 cm de diamètre reliée à un réfrigérant.

#### **L'huile de thym :**

520 g de feuilles du thym ont été utilisées, et 4,6 ml d'huile a été récupérée après 5 heures d'hydrodistillation.

#### **L'huile de menthe :**

510 g de feuilles de menthe ont été utilisées, et 3,9 ml d'huile a été récupérée après 5 heures et 30 minutes d'hydrodistillation.

#### **L'huile du citron :**

700,2 g d'écorce du fruit de citron et 5 ml d'huile a été récupérée après 6 heures d'hydrodistillation.

Les extractions ont été répétées trois fois pour chaque huile afin de récupérer des volumes considérables. Après l'élimination des traces d'eau par du sulfate de sodium anhydre, les huiles obtenues ont été stockées dans des petits flacons opaques et mises dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation.

### **2.4 VALIDATION DU MODEL ECZEMATEUX**

Vingt quatre souris ont été réparties en huit lots, acclimatées aux conditions du laboratoire pendant dix jours, après la répartition des souris à raison de trois par boîte. Les souris témoins ont reçu uniquement de l'eau distillée, tandis que les autres souris ont été traitées par application dermatique deux fois par jour (matin et soir) par un mélange formol, eau distillée à différentes dilutions (1/100 ; 5/100 ; 10/100 ; 15/100 ; 20/100 ; 25/100 ; 30/100 ;  $V_{\text{Formol}}/V_{\text{Eau}}$ ) et à un volume de 1ml par application au niveau de la partie postérieure des oreilles. Une série d'observation a été effectuée jusqu'à l'apparition du principal signe d'eczéma de contact qui est représenté par l'association érythème, œdème et squame. Chaque dilution a été appliquée sur trois souris afin de minimiser l'erreur expérimentale.

## 2.5 DETERMINATION DE L'INDICE D'IRRITATION PRIMAIRE CUTANEE DES HUILES DU THYM, MENTHE ET CITRON [9], [10]

Les huiles essentielles ont été appliquées sur la peau de neuf lapins albinos répartis en trois lots (zones scarifiées et zones non scarifiées), et chaque lapin a subi les opérations suivantes :

- La veille de l'application des huiles, la peau des lapins a été tondue pour avoir une surface d'environ 14 cm x 14 cm, et en évitant toute irritation ;
- Le lendemain, ont été effectués à la droite de l'axe vertébral à l'aide d'une aiguille pour scarification, trois scarifications parallèles sur une longueur de 2,5 cm espacées de 0,5 cm. Les scarifications de l'épiderme sont réalisées sans atteindre le derme ;
- Les huiles ont été appliquées sur la peau après les avoir déposées à l'aide d'une seringue à raison de 0,5 ml. Les huiles essentielles et la pièce de gaze ont été maintenues en contact avec la peau sur chacune des deux zones avec une bande de fixation. La compresse de protection a été mise en place et l'ensemble a été maintenu par un pansement. Le pansement et les pièces de gaze ont été enlevés 1h après l'application ;
- Les observations ont été faites sur les deux zones scarifiées et non scarifiées, après 1h, 24h et 48h afin de calculer les indices d'irritation primaire cutanée.

Un groupe de trois lapins a été utilisé comme témoin et ils ont reçu uniquement de l'eau distillée.

## 2.6 ETUDE SYMPTOMATIQUE ET PLASMATIQUE DE L'ACTIVITE ANTI-ECZEMATEUSE DES HUILES

Pour l'étude de chaque huile, sept lots de souris albinos ont été préparés, formés chacun de trois souris.

- Lot N°1 représente les témoins qui sont traités uniquement par de l'eau distillée ;
- Lot N°2 est traité par l'huile de paraffine ;
- Lot N°3 est traité par du Diprosone 0,05% crème ;
- Lot N°4 est traité par la solution S<sub>1</sub> ;
- Lot N°5 est traité par la solution S<sub>2</sub> ;
- Lot N°6 est traité par la solution S<sub>3</sub> ;
- Lot N°7 est traité par la solution S<sub>4</sub>.

Les solutions S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>, ont été préparées, en ajoutant 15 ml de chaque huile à 25 ml de l'huile de paraffine et à partir de ce mélange, 20 ml a été prélevé, et qui représente la solution S<sub>1</sub>, 20 ml de l'huile de paraffine a été ajouté au 20 ml restante et à partir de ce mélange, 20 ml a été prélevé ce qui constitue la solution S<sub>2</sub> et de la même façon les solutions S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> ont été préparées.

Les souris ont été traitées par du formol à 30% jusqu'à l'apparition de l'eczéma de contact au niveau de la partie postérieure des oreilles. Un traitement journalier par les différentes solutions (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>) a été réalisée à raison de 0,5 ml deux fois par jour. A la fin de l'étude symptomatique les souris ont été sacrifiées, et le sang récupéré a été conservé dans des tubes sous anticoagulant et mis au réfrigérateur à 4°C et immédiatement utilisé pour l'analyse biochimique.

## 2.7 ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel « SPSS Statistics 20 ». Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM (erreur standard sur la moyenne). La variabilité des paramètres étudiés a été testée selon les traitements par les huiles essentielles. Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs a été effectuée et la significativité des différences a été déterminée au risque d'erreur 0,001 ; 0,01 ; 0,05.

## 3 RESULTATS ET DISCUSSION

### 3.1 RENDEMENTS DE L'HYDRODISTILLATION EN HUILES ESSENTIELLES

Les rendements de l'hydrodistillation en huiles essentielles des plantes étudiées sont représentés sur le tableau I.

Tableau I. Rendements de l'hydrodistillation en huiles essentielles du *T. vulgaris*, *M. spicata* et du *C. limonum*

| PLANTES ÉTUDIÉES       | RENDEMENTS EN HUILES ESSENTIELLES (%) |
|------------------------|---------------------------------------|
| <i>Citrus limonum</i>  | 0,75                                  |
| <i>Mentha spicata</i>  | 0,72                                  |
| <i>Thymus vulgaris</i> | 0,65                                  |

Les résultats obtenus sont variables par rapport à ceux trouvés par d'autres auteurs, pour le *C. limonum*, le rendement trouvé est de 0,75%, donc supérieur à celui obtenue par S. Makuba [11], qui est de 0,5%, pour la *M. spicata* notre rendement était de 0,72% tandis que pour Adjou et Soumanou [12], il est de 0,96% et enfin pour la *T. vulgaris*, le rendement était de 0,65% ce qui est inférieur à celui trouvé par F. Carolina [13], qui est de 1,76%.

Ces variations peuvent être dues à des facteurs abiotiques, tels que le climat spécifique des régions d'origine des échantillons, des facteurs géographiques comme l'altitude, le type de sol et la saison des cueillettes.

### 3.2 VALIDATION DU MODEL ECZEMATEUX

Le formol à différentes dilutions a été appliqué sur la partie postérieure des oreilles des souris albinos pendant vingt jours. Les dilutions 1/100 ; 5/100 et 10/100 ( $V_{Formol}/V_{Eau}$ ), n'ont pas provoquées d'eczéma de contact durant toute la période d'application, la dilution 15/100 ( $V_{Formol}/V_{Eau}$ ) a provoqué des érythèmes au bout de dix-huit jours et pour les dilutions 20/100 et 25/100 ( $V_{Formol}/V_{Eau}$ ) ont provoquées des érythèmes et œdèmes au dixième jour, tandis que les trois signes d'eczéma de contact, qui sont l'érythème, l'œdème et la squame, n'ont apparu qu'à la dilution 30/100 ( $V_{Formol}/V_{Eau}$ ) et cela au bout de six jours.

Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature comme déjà décrit par Maison et Pasquier [14].

### 3.3 INDICES D'IRRITATION PRIMAIRE CUTANEE DES HUILES ESSENTIELLES

Les indices d'irritation primaire cutanée des trois huiles ont été calculés, les résultats ont été traités par le logiciel SPSS Statistics 20 et ils sont représentés sur la Figure 1.

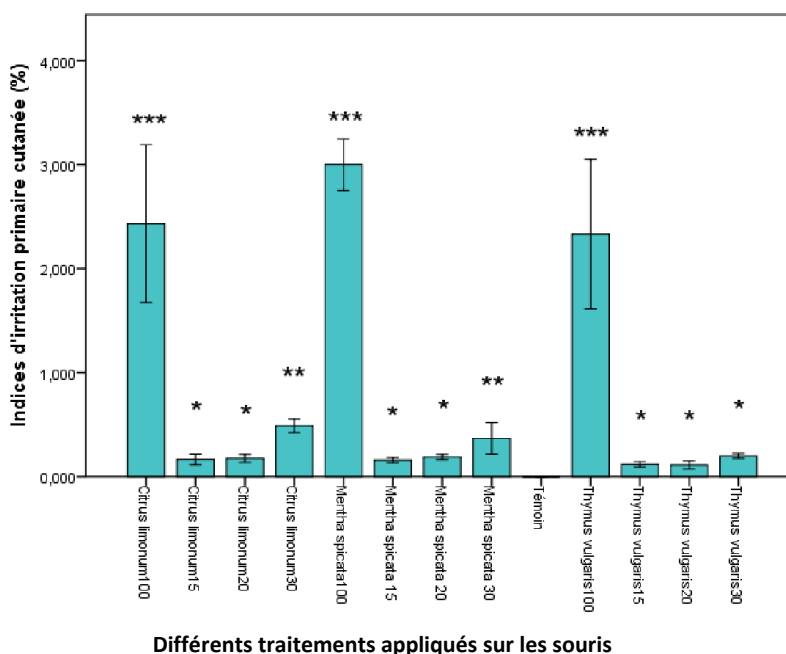


Figure 1. Indices d'irritation primaire cutanée des différents traitements

D'après les résultats présentés sur la Figure 1, on a pu constater que les trois huiles ne sont pas irritantes aux concentrations suivantes : 30/100 ; 20/100 et 15/100 ( $V_{\text{Huile Essentielle}} / V_{\text{Huile de Paraffine}}$ ), tandis qu'elles sont allergisantes à l'état pur ce qui est en accord avec les résultats trouvés par d'autres auteurs [15].

### 3.4 ETUDE SYMPTOMATIQUE ET PLASMATIQUE DE L'ACTIVITE ANTI-ECZEMATEUSE DES HUILES ETUDIEES

Selon les résultats obtenus (tableau II), les trois huiles présentent une efficacité variable vis-à-vis de l'eczéma de contact.

L'essence du thym a permis 100% de guérison, suivie par l'huile essentielle de la menthe, tandis que l'huile du citron a montré l'activité anti-eczémateuse la plus faible.

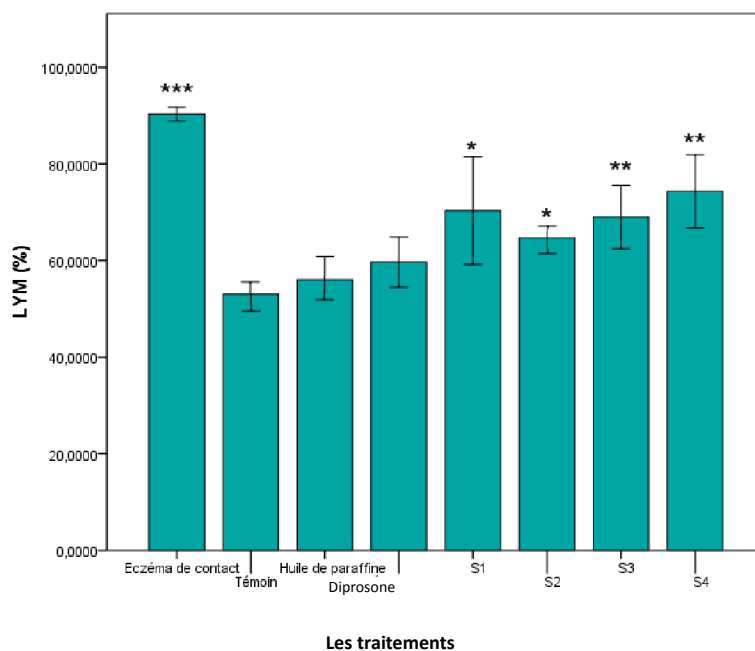
**Tableau II. Etude symptomatique de l'activité anti-eczémateuse des huiles essentielles du thym, menthe et citron.**

|                       |                | EFFICACITE |        |         |       |
|-----------------------|----------------|------------|--------|---------|-------|
|                       |                | NULLE      | FAIBLE | MOYENNE | FORTE |
| Témoin                |                | +          |        |         |       |
| Diprosone 0,05% crème |                |            |        |         | +     |
| Huile de paraffine    |                | +          |        |         |       |
| <i>T. vulgaris</i>    | S <sub>1</sub> |            |        |         | +     |
|                       | S <sub>2</sub> |            |        |         | +     |
|                       | S <sub>3</sub> |            |        | +       |       |
|                       | S <sub>4</sub> | +          |        |         |       |
| <i>M. spicata</i>     | S <sub>1</sub> |            |        |         | +     |
|                       | S <sub>2</sub> |            |        | +       |       |
|                       | S <sub>3</sub> | +          |        |         |       |
|                       | S <sub>4</sub> | +          |        |         |       |
| <i>C. limonum</i>     | S <sub>1</sub> |            |        | +       |       |
|                       | S <sub>2</sub> | +          |        |         |       |
|                       | S <sub>3</sub> | +          |        |         |       |
|                       | S <sub>4</sub> | +          |        |         |       |

L'inflammation cutanée observée au cours de l'eczéma de contact est secondaire à l'activation des lymphocytes T (LT) spécifiques d'allergène au niveau du derme et de l'épiderme [16]. Une fois l'individu sensibilisé par voie cutanée ou muqueuse, les contacts ultérieurs avec l'allergène en cause peuvent induire des lésions d'eczéma [16]. Dans cette étude l'allergène choisit est le formol à 30% qui pénètre les couches superficielles de l'épiderme, est pris en charge par les cellules dendritiques. Cette prise en charge facilitée par l'existence d'IgE spécifiques membranaires aboutit à l'apprêtement des protéines et à l'expression de peptides d'allergènes dans les niches «présentoirs» des molécules du CMH de classe II et de classe I [16].

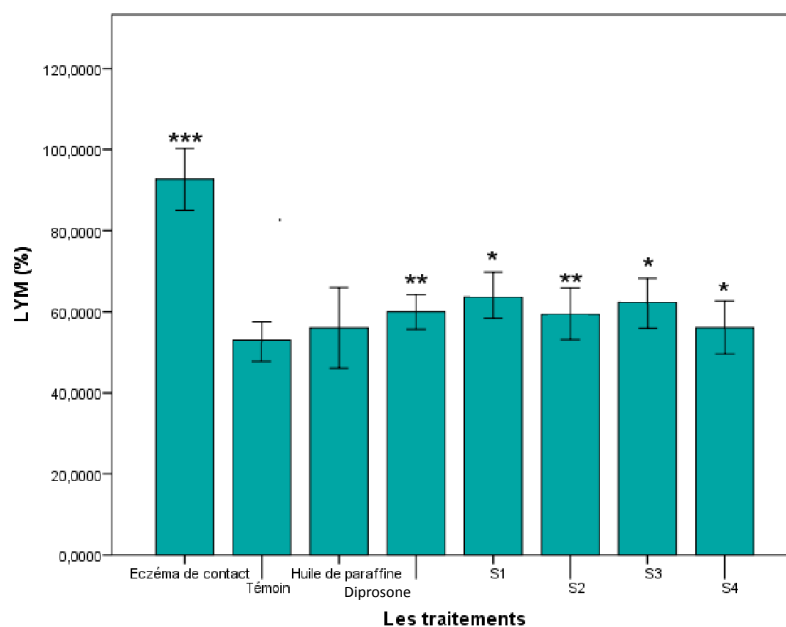
Les cellules dendritiques migrent dans le derme où elles sont alors capables de présenter les peptides aux LT spécifiques [16]. La nature des LT à l'origine des lésions est encore mal connue et celles retrouvées dans le sang sont majoritairement de type 2 (Th2), produisant de l'IL-4 et de l'IL-5 [16].

Le dénombrement des lymphocytes, a permis d'étudier la réponse immunitaire avant et après le traitement de l'eczéma de contact par les huiles essentielles, les résultats obtenus ont été traités par le logiciel SPSS Statistics 20 et sont représentés sur les Figures 3, 4 et 5.



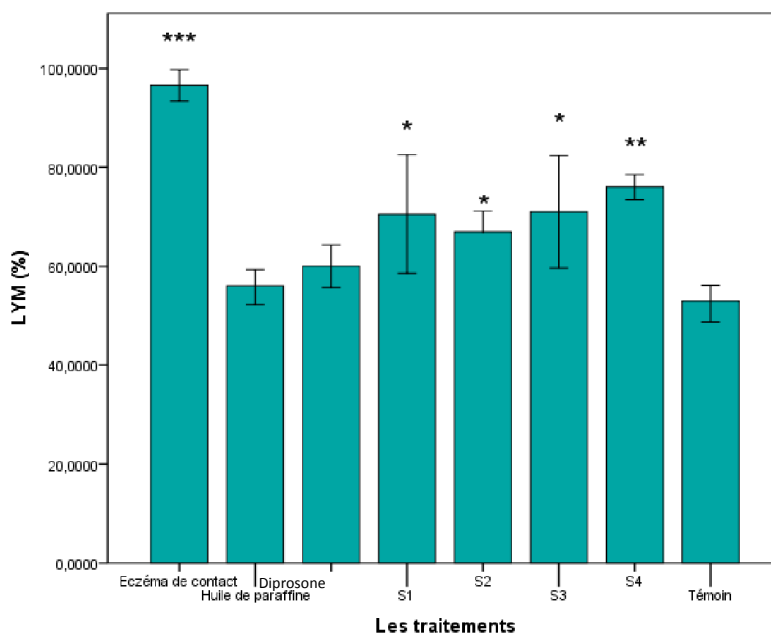
(\*\*\* ; \*\* ; \* effet significatif pour 0,001 ; 0,01 ; 0,05).

Figure 3. Taux des lymphocytes après les traitements par l'huile essentielle du citron



(\*\*\* ; \*\* ; \* effet significatif pour 0,001 ; 0,01 ; 0,05).

Figure 4. Taux des lymphocytes après les traitements par l'huile essentielle du thym



(\*\*\*; \*\*; \* effet significatif pour 0,001; 0,01; 0,05).

Figure 5. Taux des lymphocytes après les traitements par l'huile essentielle de la menthe

Le taux des lymphocytes a fortement augmenté après l'apparition de l'eczéma de contact chez les souris et il a subi des variations après chaque traitement :

**Traitement par du Diprosone 0,05% crème :** le taux des lymphocytes a baissé considérablement, ce qui explique d'avantage l'efficacité de ce médicament dans le traitement de l'eczéma de contact.

**Traitement par les solutions S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub> :** le taux des lymphocytes a diminué d'une façon significative.

L'analyse de la variance, révèlent des différences hautement significatives ( $P < 0,001$ ) entre les différents traitements, surtout pour les huiles du thym et de la menthe.

#### 4 CONCLUSION

L'eczéma de contact est une pathologie fréquente au Maroc et dont l'étiologie peut être variée. Et dans le but de trouver de nouveaux traitements naturels, une enquête ethnobotanique a été menée dans plusieurs villes au niveau national en se basant sur des questionnaires distribués aux herboristes ainsi qu'au grand public, ce qui a permis de cibler trois plantes médicinales et aromatiques largement utilisées au niveau populaire dans le traitement des cas d'eczéma de contact et d'autres maladies dermatiques. Ces plantes sont *M. spicata*, *T. vulgaris* et *C. Limonum*. Après la récolte des échantillons et la préparation des huiles essentielles, on a fait des séries d'applications de ces huiles d'une façon journalière sur la partie postérieure des oreilles des souris albinos atteints d'eczéma de contact provoquées par le formol à 30%.

Les résultats obtenus, ont montré l'efficacité des trois huiles essentielles dans le traitement de l'eczéma de contact avec une activité plus élevée de l'huile de thym par rapport aux autres essences étudiées.

#### REFERENCES

- [1]. J. El amri, K. Elbadaoui, T. Zair, H. bouharb, S. chakir & T. Imolk Alaoui. Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 2014 ; 82:7481– 7492.
- [2]. I. Hmamouchi, M. Rachidi, F. Ezzahra Abourazzak, H. Khazzani, L. Bennani, F. Bzami, Leila El Mansouri, L. Tahiri, T. Harzy, R. Abouqal, F. Allali & N. Hajjaj-Hassouni. Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales marocaines en rhumatologie. *Revue Marocaine de Rhumatologie*, 2012 ; 22: 52-6.
- [3]. F. Haddouchi & A. Benmansour. Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire* : 2008, 8, 20-27.

- [4]. A. El Ouali Lami, F. EL-Akhal, W. Ouedrhiri, F. Ouazzani Chahdi, R. Guemmouh & H. Greche. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis* Les technologies de laboratoire, 8 N°31, 2013 ; 27-33.
- [5]. A. Lamiri, S. Lhaloui, B. Benjilali & M. Berrada. Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola Destructor* (Say). *Field Crops Res.*, 2001 ; 71, 9-15.
- [6]. P.V. Nielsen & R. Rios. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000 ; 60, 219-229.
- [7]. M. Vocanson, A. Hennino, A. Rozières, G. Poyet & J.-F. Nicolas. Les modèles expérimentaux d'eczéma de contact. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 47, 2007 ; 314–317.
- [8]. R. Ismaili, A. Lamiri & K. Moustaid. Study of Antibacterial Activity of Essential Oils of Three Aromatic and Medicinal Plants. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 2014; ISSN: 2278-0181 Vol. 3 Issue 8, 1247-1251.
- [9]. H. Zineb. Effet toxicologique de quelques plantes algériennes. Magister en toxicologie cellulaire, 2009 ; 52.
- [10]. E. Carré, V. Mermet, L. Steinberg<sup>1</sup>, M.-L. Valdeyron, F. Pirot & M. A. Denis. Mode d'analyse des dossiers techniques pour le choix des savons doux en établissement de santé, 2014 ; Volume XXII - N°1: 27-36.
- [11]. S. Makuba Teddy. Contribution a la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. Thèse de doctorat es-sciences, 2012.
- [12]. E. S. Adjou & M. M. Soumanou. Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes isolées da l'arachide. *J. Appl. Biosci.* 2013 ; 5555– 5566.
- [13]. F. Carolina Fa chini-Queiroz, R. Ku mmer, C. Fernanda Estevao-Silva, M. Dalva de Barros Carvalho, J. Maria Cunha, R. Grespan, C. Aparecida, B. Amado and R. Kenji Nakamura Cuman. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 ; 2.
- [14]. A. Maison & E. Pasquier. Le formaldéhyde. Point des connaissances, ED 5032. 3<sup>ème</sup> édition, 2008.
- [15]. M. Vocanson, A. Hennino, C. Chavagnac, A. Rosières, P. Saint-Mezard, H. Akiba, M. Satoh, D. Kaiserlian & J. Nicolas. Eczéma allergique de contact, comment ré-induire une tolérance ? *Médecine/sciences*, 2006 ; 22 : 158-63.
- [16]. L. Mainz. *Eur J Dermatol*, 2007 ; Jul-Aug ; 17(4) : 267-83.