

# Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* Desf.

S. Krimat, Amadou Hamath Dia, C. Tigrine, D. Dahmane, A. Nouasri, Pov

DANS **PHYTOTHÉRAPIE** 2019/2 Vol. 17 , PAGES 58 À 65  
ÉDITIONS **JLE**

ISSN 1624-8597

DOI 10.3166/phyto-2019-0137

Date de mise en ligne : 27/09/2024

Article disponible en ligne à l'adresse

<https://stm.cairn.info/revue-phytotherapie-2019-2-page-58?lang=fr>



Découvrir le sommaire de ce numéro, suivre la revue par email, s'abonner...  
Scannez ce QR Code pour accéder à la page de ce numéro sur Cairn.info.



**Distribution électronique Cairn.info pour JLE.**

Vous avez l'autorisation de reproduire cet article dans les limites des conditions d'utilisation de Cairn.info ou, le cas échéant, des conditions générales de la licence souscrite par votre établissement. Détails et conditions sur [cairn.info/copyright](https://cairn.info/copyright).

Sauf dispositions légales contraires, les usages numériques à des fins pédagogiques des présentes ressources sont soumises à l'autorisation de l'Éditeur ou, le cas échéant, de l'organisme de gestion collective habilité à cet effet. Il en est ainsi notamment en France avec le CFC qui est l'organisme agréé en la matière.

# Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* Desf.

## Chemical Analysis, Antioxidant, Anti-inflammatory, and Cytotoxic Activities of Hydromethanolic Extract of *Origanum glandulosum* Desf.

S. Krimat · H. Metidji · C. Tigrine · D. Dahmane · A. Nouasri · T. Dob

© Lavoisier SAS 2017

**Résumé** L'extrait hydrométhanolique des parties aériennes d'*Origanum glandulosum* Batt. et Trab. a été étudié pour sa composition chimique par analyse CLHP et ses activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique. L'analyse chromatographique a révélé la présence de trois acides phénoliques et de huit flavonoïdes. Les résultats de pouvoir antioxydant qui ont été réalisés par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et de  $\beta$ -carotène-acide linoléique indiquent que l'extrait possède une forte activité. Les résultats ont montré aussi que l'extrait de la plante a une excellente activité anti-inflammatoire dans les deux modèles in vivo (l'œdème de la patte induit par la carragénine et l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton). De plus, cet extrait a été trouvé comme possédant une bonne toxicité contre les larves d'*Artémia* ( $LC_{50} = 17,64 \mu\text{g/ml}$ ).

**Mots clés** *Origanum glandulosum* Desf. · Activité anti-inflammatoire · Activité cytotoxique · Activité antioxydante · Analyse par CLHP

**Abstract** The hydromethanolic extract of the aerial parts of *Origanum glandulosum* Batt. et Trab. was investigated for its chemical composition by HPLC (High-performance liquid chromatography) analysis; its antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities were also investigated. The chromatographic analysis revealed the presence of three phenolic acids and eight flavonoids. The tests for antioxidant activity that were performed using 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and  $\beta$ -carotene–linoleic acid methods indicated that

the extract exhibited high antioxidant activity. The results also revealed that the plant extract had an excellent anti-inflammatory activity in two in vivo models (carrageenan induced paw edema and croton oil induced ear edema). In addition, this extract was found to show good toxicity against brine shrimp nauplii ( $LC_{50} = 17.64 \mu\text{g/ml}$ ).

**Keywords** *Origanum glandulosum* Desf. · Anti-inflammatory activity · Cytotoxic activity · Antioxidant activity · HPLC analysis

## Introduction

Le genre *Origanum*, appartenant à la famille des Lamiacées, regroupe environ 38 espèces qui sont largement répandues dans les régions euro-sibérienne et irano-sibérienne. Cependant, la majorité des espèces, environ 75 % sont concentrées dans le pourtour méditerranéen, en particulier dans les régions méditerranéennes de l'Est. En Algérie, le genre *Origanum* regroupe trois espèces : *Origanum majorana* (L.), *Origanum glandulosum* (Desf.) et *Origanum floribundum* (Munby). L'espèce *Origanum glandulosum* Desf. (Syn : *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum*) est une plante spontanée endémique d'Afrique du Nord (Algérie et Tunisie). Elle est commune dans tout le Tell. On la trouve surtout dans les broussailles et les garrigues [1–3].

En médecine traditionnelle, *Origanum glandulosum* jouit d'une grande faveur populaire en Algérie et en Tunisie comme remède contre la toux, la fièvre, les affections respiratoires et les douleurs rhumatismales [4–6]. Des études pharmacologiques ont confirmé que les huiles essentielles et les extraits phénoliques de cette espèce exercent diverses activités biologiques (antioxydante, antibactérienne, antifongique, antidiabétique, insecticide, anticholinestérase et neuroprotective) [7–16].

S. Krimat (✉) · H. Metidji · D. Dahmane · A. Nouasri · T. Dob  
Laboratoire de molécules bioactives et valorisation de biomasse,  
ENS-kouba, Alger, Algérie  
e-mail : krimatsoumia.2012@gmail.com

C. Tigrine  
Laboratoire d'ethnobotanique et de substance naturelle,  
ENS-kouba, Alger, Algérie

La plante est très riche en huile essentielle et particulièrement en monoterpènes avec dominance caractéristique de thymol, de carvacrol, de *p*-cymène et de  $\alpha$ -terpinène. Elle renferme également divers types de composés phénoliques (acides phénoliques, flavanones, flavones, flavonols et cyclolignans) [13–16].

La présente étude a pour but d'analyser l'extrait hydro-méthanolique (EHM) d'*Origanum glandulosum* afin d'identifier quelques composés phénoliques présents dans cette espèce et aussi de déterminer son pouvoir antioxydant et pour la première fois ses activités anti-inflammatoire et cytotoxique.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les parties aériennes d'*Origanum glandulosum* ont été récoltées au mois de juin 2011 à Béni Ourtilane, wilaya de Sétif, pendant la floraison. La plante a été botaniquement authentifiée au département de botanique de l'École nationale supérieure d'agronomie (El-Harrach, Alger). Après la récolte, elle a été nettoyée et mise à sécher à température ambiante et à l'ombre dans un endroit aéré puis coupée grossièrement et conservée dans des sacs en papier.

### Préparation de l'extrait hydrométhanolique

L'extrait hydroalcoolique a été obtenu par macération dans un mélange méthanol/eau (70/20 v/v) pendant 48 heures à la température ambiante du laboratoire et à l'abri de la lumière. L'ensemble a été ensuite filtré, et le solvant frais a été ajouté au résidu. Cette macération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant. Les filtrats réunis ont été ensuite évaporés sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à 40 °C pour obtenir un EHM sec.

### Analyse de l'extrait hydrométhanolique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP-UV/DAD)

L'analyse de notre échantillon a été effectuée à l'aide d'un appareil Agilent 1260 infinity équipé d'un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD). Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4,6 mm). La température a été maintenue à 22  $\pm$  0,8 °C et le volume d'injecteur choisi était de 5  $\mu$ l. Les solvants utilisés sont de qualité CLHP, et le débit a été fixé à 1 ml/min. Les conditions chromatographiques consistent en un gradient A : acétonitrile/B : acide acétique 0,2 % avec le gradient suivant : 0 minute : 95 % A + 5 % B ; 30 minutes : 5 % A + 95 % B. La détection a été effectuée à 270, 320 et 370 nm.

Les acides phénoliques et les flavonoïdes contenus dans l'extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention et des spectres UV obtenus par ceux des standards.

## Étude de l'activité antioxydante

### Test sur DPPH

La méthode de Braca et al. [17] a été utilisée pour la détermination de l'activité de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Brièvement, 1,5 ml de différentes concentrations de l'extrait préparé dans du méthanol (comprises entre 5 à 1 000  $\mu$ g/ml) ont été ajoutés à un volume égal de la solution méthanol/DPPH fraîchement préparée (0,004 % m/v). Le mélange réactionnel a été agité au vortex et maintenu à l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance a été ensuite lue à 517 nm contre le blanc contenant l'extrait sans DPPH. Le  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) et le BHT (hydroxytoluènebutylé) ont été utilisés comme standards. La manipulation a été répétée trois fois.

La capacité antiradicalaire des échantillons a été exprimée en pourcentage en suivant l'équation :

$$\% \text{ activité antiradicalaire} = [1 - (\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{témoin}})] \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{échantillon}}$  correspond à l'absorbance de l'échantillon ou du standard après 30 minutes.

$\text{Abs}_{\text{témoin}}$  correspond à l'absorbance du témoin contenant uniquement la solution DPPH.

La valeur d'IC<sub>50</sub>, la concentration de l'extrait nécessaire pour piéger 50 % de radicaux libres, a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction de différentes concentrations d'échantillons préparés.

### Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

Cette méthode a été réalisée selon le protocole décrit par Shon et al. [18]. Deux milligrammes de  $\beta$ -carotène ont été dissous dans 10 ml de chloroforme (grade CLHP). Un millilitre de cette solution a été introduit dans un ballon contenant au préalable 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été ensuite évaporé en utilisant un évaporateur sous vide. Cent millilitres d'eau distillée ont été ajoutés lentement au résidu ainsi obtenu avec agitation vigoureuse pour former une émulsion stable. 4,8 ml de l'émulsion ont été transférés dans des tubes et 0,2 ml de l'extrait (2 mg/ml dans le méthanol) ou d'antioxydant de référence (BHT,  $\alpha$ -tocophérol) ont été ajoutés. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence de l'échantillon (témoin) a été suivie à 470 nm à des intervalles de temps réguliers pendant deux heures (0, 30, 60, 90, 120 minutes). L'absorbance a été lue contre le blanc préparé

de la même manière sauf qu'il ne contient pas de  $\beta$ -carotène. L'expérience a été faite en triplicate.

Le taux de blanchiment de  $\beta$ -carotène (R) a été calculé selon une cinétique de premier ordre, tel que décrit par Al-Saikhan et al. [19] :

$$R_t = [\ln(Abs_{t_0}/Abs_t)]/t$$

R<sub>t</sub> : le taux de blanchiment de  $\beta$ -carotène aux temps 30, 60, 90 ou 120 minutes ;

In : logarithme naturel ; Abs<sub>t0</sub> correspond à l'absorbance initiale de l'émulsion, immédiatement après la préparation de l'échantillon ( $t = 0$  minute) ; Abs<sub>t</sub> : l'absorbance de l'émulsion aux temps 30, 60, 90 ou 120 minutes.

Le pourcentage de l'activité antioxydante a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante}\% = [(R_{\text{témoin}} - R_{\text{échantillon}})/R_{\text{témoin}}] \times 100$$

R<sub>témoin</sub> et R<sub>échantillon</sub> sont des taux moyens de blanchiment de témoin et d'échantillons (extrait et standards), respectivement.

## Étude de l'activité anti-inflammatoire

### Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux d'expériences fournis par l'institut Pasteur (Alger) sont des souris albinos (la souche Swiss), adultes de deux sexes pesant 20 à 25 g. Dès leur réception, les souris ont été placées dans des cages standardisées et maintenues dans une animalerie à température constante ( $25 \pm 1$  °C), soumises à un cycle de 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité. Pendant la période d'acclimatation (une semaine avant d'être utilisées dans les différentes expériences), les souris avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréah, Alger).

### Recherche de la toxicité

La dose létale moyenne (LD<sub>50</sub>) des extraits d'*Origanum glandulosum* n'est pas connue dans la littérature consultée ; ainsi, la recherche d'une éventuelle toxicité de ses extraits est nécessaire pour réaliser les études in vivo. L'EHM de cette plante a été préparé dans une solution physiologique (NaCl 0,9 %) contenant 3 % DMSO à des doses de 100, 500, 1 000 mg/kg de masse corporelle.

Ces extraits ont été administrés par gavage gastrique (voie orale) aux groupes de six souris, qui ont été ensuite mises à l'observation durant 72 heures concernant les symptômes de toxicité et le taux de mortalité [20].

## Œdème de la patte induit par la carragénine

La méthode de l'œdème à la carragénine de Winter et al. [21] a été utilisée. Un œdème aigu a été induit par l'injection de 0,05 ml d'une suspension de 1 % de carragénine dans du sérum physiologique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite. L'épaisseur de la patte a été mesurée par un pied à coulisse numérique avant l'injection de la carragénine et quatre heures après à des intervalles de temps de zéro, une, deux, trois et quatre heures. Une heure avant l'injection de la carragénine, des lots de six souris avaient reçu, par voie orale, les différents traitements suivants :

- un lot témoin recevant de l'eau physiologique ;
- un lot traité par l'aspirine (produit de référence) : 100 mg/kg ;
- deux lots traités par l'EHM à 100 et 200 mg/kg.

L'activité anti-inflammatoire a été calculée en pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'œdème} = [(E_t - E_0)_{\text{souris témoin}} - (E_t - E_0)_{\text{souris traitée}}] / (E_t - E_0)_{\text{souris témoin}}$$

E<sub>t</sub> = épaisseur de la patte après quatre heures.

E<sub>0</sub> = épaisseur de la patte immédiatement après l'injection de la carragénine.

## Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'étude de l'activité anti-inflammatoire en utilisant ce modèle a été réalisée selon le protocole décrit par Sosa et al. [22]. L'inflammation cutanée a été induite sur la surface interne du pavillon de l'oreille droite de la souris, et cela par l'application de 10  $\mu$ l d'une solution acétonique de l'huile de croton (5 %). L'oreille gauche non traitée a servi de témoin. Cinq microlitres de différentes doses de la solution de substance à étudier ont été appliqués localement à l'oreille droite 30 minutes avant le dépôt de la solution de l'huile de croton. Les différents lots de souris ( $n = 6$ ) ont été traités comme suit :

- un lot témoin ne recevant que la solution de l'huile de croton ;
- un lot recevant l'aspirine (0,5 mg/oreille) + la solution de l'huile de croton ;
- deux lots recevant l'EHM (1 et 2 mg/oreille) + la solution de l'huile de croton.

Quatre heures après l'induction de l'inflammation, les souris ont été sacrifiées. Les oreilles droite et gauche ont été alors sectionnées au ras de leur implantation. À l'aide d'une perce bouchon de 5,5 mm de diamètre, un morceau du pavillon de l'oreille a été prélevé au niveau de la marge en pointe et pesé immédiatement.

L'activité anti-inflammatoire topique a été calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'œdème} = \frac{[(PD - PG)_{\text{souris témoin}} - (PD - PG)_{\text{souris traitée}}]}{(PD - PG)_{\text{souris témoin}}}$$

PD = poids de l'oreille droite.

PG = poids de l'oreille gauche.

### Étude de l'activité cytotoxique par le test de « Brine shrimp »

Ce test permet de déterminer l'activité cytotoxique des produits testés par leurs effets sur les larves de crevettes d'eau salée : *Artemia salina*.

Les œufs de crevettes ont été fournis par le Centre national de recherche, de développement et de la pêche (CNRDPA), Tipaza. Selon la méthode décrite par Turker et Camper [23], environ 1 g d'œufs de crevettes a été placé dans un récipient rectangulaire en plastique muni d'une source d'oxygène contenant initialement 1 l d'eau de mer préparée en dissolvant 36 g de sel de mer dans 1 l d'eau distillée. L'ensemble du matériel a été maintenu à 25 °C sous une intensité lumineuse ( $\approx 60$  W). Après 10 à 12 heures, les œufs ont commencé à éclore, et les jeunes larves ont été obtenues au bout de 24 heures. Ces larves peuvent être utilisées de 48 à 72 heures après le début de l'éclosion.

L'EHM a été mis en suspension dans l'eau salée de manière à obtenir une concentration de 10 000  $\mu\text{g/ml}$ . Des dilutions décroissantes ont été ensuite réalisées (1 000, 100, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ ). 2,5 ml de chaque dilution ont été ajoutés aux tubes à essai contenant chacun dix larves d'*Artemia salina*. Une solution saline sans extrait ajouté a été utilisée comme témoin. La manipulation a été répétée trois fois. Après 24 heures d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante, les larves survivantes ont été comptées à l'aide d'une loupe binoculaire, et le pourcentage de mortalité a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ mortalité} = (\text{NLM}/\text{NLT}) \times 100$$

Soit : NLM : nombre de larves mortes ; NLT : nombre de larves testées.

La dose LD<sub>50</sub> est déterminée à partir de la courbe de régression qui exprime le pourcentage des larves tuées en fonction du logarithme de la dose de l'échantillon testé.

### Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de logiciel XLSTAT. Pour cela, nous avons effectué une analyse de variance Anova, à un facteur, suivie du test Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les moyennes ont été considérées comme significativement différentes pour une valeur de  $p$  inférieure à 0,05.

## Résultats et discussion

### Analyse par chromatographie liquide à haute performance

L'analyse de l'EHM indique qu'*Origanum glandulosum* est une plante riche en métabolites secondaires signalés par un chromatogramme comprenant 63 pics, et la comparaison des temps de rétention et des spectres UV de ces pics avec ceux des standards nous a permis d'identifier 11 composés : trois acides phénoliques et huit flavonoïdes (Tableau 1).

Quatre publications ont rapporté la composition phénolique d'*Origanum glandulosum*. La première étude réalisée par la technique CCM indique la présence de l'acide caféique, de l'acide rosmarinique et quelques familles chimiques (flavonoïdes 3- et 5-hydroxylés et aglycones) dans l'extrait acétonique de la plante récoltée dans la région de Sétif, Algérie. Cette étude a aussi mis en évidence la présence de la quercétine par la spectroscopie RMN [15]. Skoula et al. [16] ont analysé l'échantillon d'*Origanum glandulosum* collecté dans la région de Blida, Algérie, en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Ces auteurs ont identifié cinq flavones (apigénine, 5,6,40-trihydroxy-7,30-diméthoxyflavone, 5,30,40-trihydroxy-7-méthoxyflavone, ladanein, 5,6-dihydroxy-7,30,40-triméthoxyflavone) et quatre flavanones (naringénine, ériodictyol, aromadendrine, taxifoline). De leur côté, Oukil et al. [14] ont rapporté la présence de l'acide gallique, de l'acide vanillique, de l'acide coumarique, de la rutine, de l'acide férulique et de la naringénine dans l'extrait méthanolique de la plante collectée dans la région de Boukhlifa (Béjaia, Algérie). Dans une étude plus récente, trois constituants majoritaires présents dans l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Origanum glandulosum* ont été déterminés comme étant l'acide rosmarinique, le globoidnan A et le globoidnan B [13].

**Tableau 1** Composés identifiés dans l'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum*

	Composés identifiés	Surface du pic (%)
Acides phénoliques	Acide coumarique	2,90
	Acide férulique	0,36
	Acide rosmarinique	6,34
Flavonoïdes	Quercétine	1,01
	Catéchine	1,30
	Rutine	1,63
	Naringénine-7-glycoside	6,36
	Lutéoline	0,69
	Lutéoline 7-glycoside	0,50
	Apigénine	0,39
	Apigénine 7-glycoside	0,97

Notre étude vient de confirmer la présence de sept composés phénoliques similaires à ceux trouvés dans d'autres études mentionnées ci-dessus qui sont l'acide rosmarinique, l'acide ferrulique, l'acide coumarique, la rutine, la quercétine, la lutéoline, l'apégénine, et elle rapporte pour la première fois la présence de la catéchine, de la lutéoline 7-glycoside, de la naringénine-7-glycoside et de l'apégénine-7-glycoside dans l'espèce *Origanum glandulosum*.

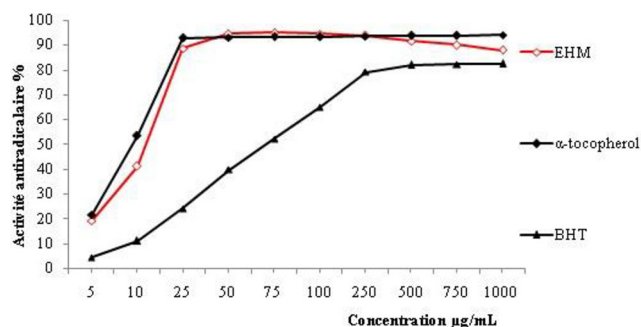
### Activité antioxydante

La méthode de piégeage du radical libre DPPH est largement utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des extraits végétaux. Dans cette technique, l'effet antioxydant peut être facilement évalué en suivant la diminution de l'absorption de DPPH à 517 nm [24].

Nos résultats représentés sur la Figure 1 montrent que l'EHM est capable de piéger le radical DPPH en fonction de ses concentrations, et son activité atteint plus de 90 % à 50 µg/ml. La valeur IC<sub>50</sub> calculée pour les trois échantillons indique que l'activité de notre extrait (IC<sub>50</sub> = 12,8 ± 0,2 µg/ml) est plus élevée par rapport au BHT (IC<sub>50</sub> = 72,16 ± 0,1 µg/ml), et elle est proche de celle de α-tocophérol (IC<sub>50</sub> = 9,55 ± 0,07 µg/ml) [p < 0,05].

La méthode de blanchiment du β-carotène consiste à mesurer la décoloration du β-carotène résultant de sa dégradation oxydative par les produits de décomposition de l'acide linoléique (radicaux peroxydes LOO•). Dans ce test, l'aptitude de différents échantillons à ralentir la vitesse de l'oxydation du β-carotène a été évaluée par mesure de la variation de l'absorbance dans le temps (Fig. 2).

D'après ces données, l'extrait de la plante est capable d'inhiber le blanchiment du β-carotène en piégeant les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique. Après 120 minutes, l'absorbance du témoin à 470 nm diminue vers une valeur plus basse, alors que cette diminution reste moins rapide dans l'extrait et les standards testés.



**Fig. 1** Activité antiradicalaire d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* et des antioxydants standard sur le radical libre DPPH

Les valeurs de l'activité antioxydante calculées en pourcentages indiquent que l'extrait d'*Origanum glandulosum* possède une bonne capacité inhibitrice (70,83 %), mais il reste moins actif par rapport aux BHT (96,92 %) et α-tocophérol (94,95 %).

Les deux tests utilisés nous montrent que l'EHM d'*Origanum glandulosum* est un bon donneur d'hydrogène, capable de piéger les radicaux libres (DPPH•) et les radicaux peroxydes (LOO•) résultant de l'oxydation de l'acide linoléique. Ces propriétés lui confèrent la capacité de lutter contre les effets nocifs des radicaux libres sur l'organisme ainsi que l'aptitude à protéger les lipides membranaires et les produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques contre la détérioration en arrêtant la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique.

L'analyse de cet extrait par CLHP révèle la présence de constituants antioxydants très puissants : l'acide rosmarinique, l'acide férulique et aussi l'acide coumarique. Concernant les flavonoïdes aglycones détectés dans notre espèce, on trouve la quercétine qui est une molécule connue comme un agent antioxydant naturel très intéressant. La présence de la lutéoline, de l'apigénine et de la catéchine peut expliquer aussi la forte capacité antioxydante de cette plante.

### Étude de l'activité anti-inflammatoire

#### Toxicité des plantes chez la souris

Au cours de cette étude, nous n'avons constaté aucun symptôme de toxicité et aucune mortalité chez les souris ayant reçu par voie orale l'EHM d'*Origanum glandulosum* aux doses de 100, 500 et 1 000 mg/kg. La LD<sub>50</sub> est donc supérieure à 1 g/kg. Ces résultats révèlent que l'utilisation des doses inférieures à 1 000 mg/kg ne présente aucun risque sur les animaux d'expérience.

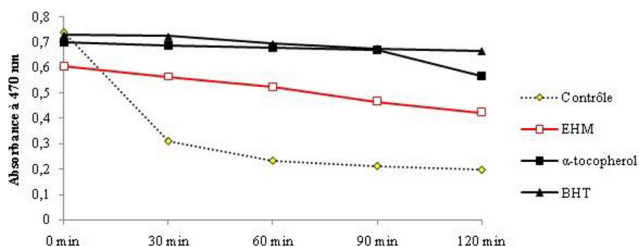
#### Activité anti-inflammatoire

L'inflammation aiguë est caractérisée par des symptômes classiques : la chaleur, la rougeur, le gonflement et la douleur. La mesure de l'œdème, induit par différents agents phlogistiques, constitue donc un excellent outil pour la quantification de l'inflammation.

Deux modèles d'inflammation in vivo ont été utilisés dans la présente étude : l'œdème de la patte induit par la carragénine et l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton.

#### Modèle d'œdème de la patte

Les résultats sont représentés sous forme de courbes mettant en valeur l'évolution de l'épaisseur de l'œdème en fonction du temps (Fig. 3). Chez les souris du lot témoin, l'injection

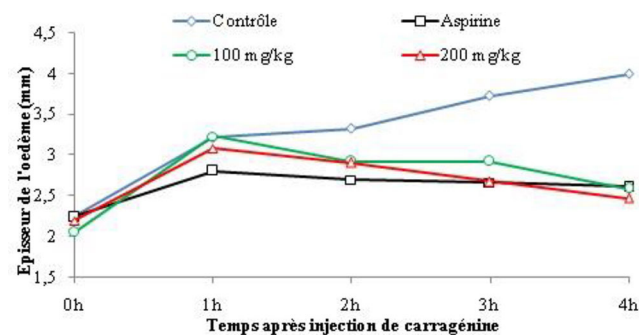


**Fig. 2** Cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène à 470 nm en absence et en présence d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* et des antioxydants standard

de 50  $\mu$ l de la solution de carragénine à 1 % sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure droite provoque une inflammation visible dans l'heure qui suit cette injection (l'épaisseur de l'œdème est de  $3,21 \pm 0,34$  mm), l'œdème augmente progressivement et atteint  $4,00 \pm 0,46$  mm au bout de quatre heures.

Cependant, l'administration par voie orale de nos extraits inhibe significativement le développement de l'œdème de manière dose-dépendante, avec une cinétique d'action semblable à celle de l'aspirine (molécule de référence) (Fig. 3). L'analyse statistique des résultats ne révèle aucune différence significative entre l'effet de l'aspirine (à 100 mg/kg) et celui de l'EHM (à 200 mg/kg) qui ont induit une inhibition respective de  $84,08 \pm 5,84$  % et  $83,44 \pm 5,06$  %.

La réaction inflammatoire induite par la carragénine est biphasique ; la phase initiale (une heure) est attribuée à la libération de l'histamine, de la sérotonine et des bradykinines. En conséquence, la perméabilité vasculaire est augmentée, ce qui facilite l'infiltration de neutrophiles et de l'accumulation du plasma dans l'espace interstitiel qui conduit à un œdème. Les facteurs d'activation des plaquettes et des métabolites de



**Fig. 3** Courbe de l'évolution de l'œdème de la patte (mm) en présence d'un prétraitement par voie orale une heure avant l'injection de la carragénine, chez huit lots de souris : lot témoin (eau physiologique) ; lot de référence (aspirine préparée à 100 mg/kg ; lots des extraits d'*Origanum glandulosum* préparés à 100 et à 200 mg/kg. Chaque point représente une moyenne de six animaux

l'acide arachidonique jouent également un rôle. L'induction de l'œdème pendant la phase tardive (après une heure) est associée à la production de la cyclo-oxygénase (COX) qui augmente la synthèse des prostaglandines (PGs) essentiellement les PGE<sub>2</sub>, la production de radicaux libres d'oxygène et l'infiltration massive de neutrophiles [25–27]. De ce fait, la réduction significative de l'épaisseur de l'œdème observée lors de prétraitement des souris par notre extrait indique que ce dernier contient des substances anti-inflammatoires dont le mécanisme d'action est probablement lié à l'inhibition de la synthèse des PGs par blocage des enzymes COX.

### Modèle d'œdème de l'oreille

Le modèle de l'œdème de l'oreille induit par des agents irritants permet d'identifier des composés anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens, qui peuvent être potentiellement utiles dans le traitement des maladies inflammatoires de la peau [28,29]. L'effet phlogénique de l'huile de croton est dû principalement au principe actif 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) qu'elle contient. Le TPA induit une réaction inflammatoire caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème. Cette réaction est déclenchée par l'activation de la protéine-kinase C (PKC), qui favorise une augmentation de phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique. L'oxydation enzymatique de ce dernier par les cyclo-oxygénases ou par les lipo-oxygénases conduit à la formation des éicosanoïdes, PGs, leucotriènes et cytokines [29].

Comme le montre le Tableau 2, quatre heures après l'application de l'huile de croton sur l'oreille droite par voie topique, les souris du groupe témoin ont développé un œdème d'un poids de 5,33 mg. Chez les souris du groupe traité localement par 0,5 mg d'aspirine, on remarque une réduction très significative ( $p < 0,05$ ) du poids de l'oreille par rapport à celui des souris du groupe témoin qui passe de 5,33 à 1,40 mg, ce qui correspond à une inhibition de l'inflammation de 73,73 %. Les extraits d'*Origanum glandulosum* ont montré une activité anti-inflammatoire dose-dépendante. Le traitement des souris par 2 mg d'EHM induit une diminution très significative ( $p < 0,05$ ) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin avec une inhibition de l'œdème de 72,98 %. Cette valeur ne diffère pas significativement de celle de l'aspirine (produit de référence).

Les résultats obtenus à travers ce test montrent que l'extrait d'*Origanum glandulosum* a une forte activité anti-inflammatoire, cela suggère que cet extrait pourrait agir sur la PLA<sub>2</sub>, la COX et/ou la lipo-oxygénase qui sont les principaux médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire induite par le TPA. Ces propriétés anti-inflammatoires seraient liées au profil chimique de cet

**Tableau 2** Effet de l'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris

Traitements	Dose (mg/oreille)	Différence du poids (oreilles gauche et droite) [mg]	% d'inhibition de l'œdème
Témoin	–	5,33 ± 0,30	–
EHM d' <i>Origanum glandulosum</i>	1,0	3,40 ± 0,50	36,21 (b)
	2,0	1,44 ± 0,30	72,98 (a)
Aspirine	0,5	1,40 ± 0,68	73,73 (a)

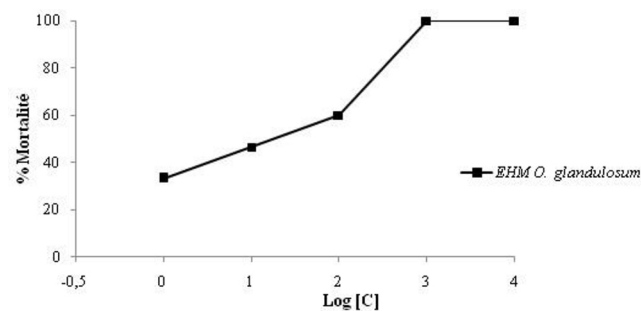
Les lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ( $p < 0,05$ )

extrait, particulièrement à la présence des composés phénoliques (lutéoline, quercitine, apéginine, catéchine, acide férulique, acide rosmarinique, acide coumarique) qui sont en effet de puissants antioxydants capables d'inhiber l'activité enzymatique.

### Activité cytotoxique

Après une exposition de 24 heures à l'extrait testé, le pourcentage de mortalité des larves a été déterminé. D'après les résultats obtenus, ce pourcentage croît en fonction de la concentration de l'extrait, et le maximum de mortalité (100 %) a été obtenu à partir de 1 000 µg/ml. Cela est bien illustré par la courbe représentée sur la Figure 4 qui présente les pourcentages de mortalité en fonction de logarithme des concentrations.

Selon Meyer et al. [30], les extraits végétaux sont toxiques (actifs) si leur valeur LD<sub>50</sub> est inférieure à 1 000 µg/ml, alors qu'ils sont non toxiques (non actifs) si elle est supérieure à 1 000 µg/ml. De plus, l'activité cytotoxique est considérée faible lorsque la valeur LD<sub>50</sub> est comprise entre 1 000 et 500 µg/ml, modérée quand elle est entre 500 et 100 µg/ml et forte quand elle est comprise entre 100 et 0 µg/ml. Dans la présente étude, l'extrait d'*Origanum glandulosum* a montré une valeur LD<sub>50</sub> inférieure à 100 µg/ml (17,64 µg/ml), indiquant ainsi la présence des composés for-



**Fig. 4** Courbe représentant le pourcentage de mortalité en fonction de la concentration de l'extrait hydrométhanolique d'*Origanum glandulosum*

tement cytotoxiques responsables de l'activité observée contre les larves d'*Artemia salina*.

Dans de nombreux cas, une corrélation générale de ce test avec des types spéciaux de bioactivités s'est avérée possible [31]. Plusieurs auteurs ont pu déterminer une corrélation positive entre la mortalité des larves d'*Artemia salina* et la cytotoxicité contre les cellules cancéreuses, démontrant ainsi l'utilité de ce test comme un préscreening antitumoral des extraits végétaux [32–34].

De ce fait, la cytotoxicité de notre plante laisse entrevoir l'existence des effets anticancéreux sachant que l'analyse par CLHP de notre extrait a permis de déceler la présence des substances anticancéreuses très puissantes telles que l'acide rosmarinique, l'acide férulique, l'acide coumarique, la lutéoline, la quercétine, l'apigénine et la catéchine.

### Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus a démontré l'intérêt de cette plante comme source de produits naturels et de composés à activités biologiques et pharmacologiques prometteuses pouvant faire l'objet de plusieurs applications pharmaceutique et agroalimentaire.

### Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

### Références

1. Quezel P, Santha S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris
2. Ietswaart JH (1980) A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf., Leiden Botanical series 4. Leiden University Press, The Hague
3. Ait-Youssef M (2006) Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press, Paris

4. Ruberto G, Baratta MT, Sari M, et al (2002) Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavor Frag J* 17:251–4
5. Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid DE (2008) Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie* 6:153–9
6. Baba Aïssa F (1991) Les plantes médicinales d'Algérie. Edman
7. Sari M, Biondi DM, Kaâbeche M, et al (2006) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavor Frag J* 21:890–8
8. Basli A, Chibane M, Madani K, et al (2012) Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie* 10:2–9
9. Mechergui K, Jaouadi W, Coelho JP, et al (2014) Chemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and volatile oil obtain by supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Int J Adv Res* 2:337–43
10. Béjaoui A, Boulila A, Boussaid M (2013) Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *J Med Plants Res* 7:2429–35
11. Khalfi O, Sahraoui N, Bentahar F, et al (2008) Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf.) essential oil from Algeria. *J Sci Food Agric* 88:1562–6
12. Erdogan-Orhan I, Belhatab R (2010) Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *Artemisia herba-alba*, *Artemisia fragrans*, *Marrubium vulgare*, *Marrubium astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Ind Crops Prod* 32:566–71
13. Basli A, Delaunay JC, Pedrot E, et al (2014) New cyclolignans from *Origanum glandulosum* active against b-amyloid aggregation. *Rec Nat Prod* 8:208–16
14. Oukil N, Bedjou F, Maiza-Benabdesselam F, et al (2011) Antioxidant activity and separation of phenolic compounds of *Origanum glandulosum* from north Algeria by high performance liquid chromatography (HPLC). *Afr J Biotechnol* 10:3451–4
15. Belhatab R, Larous L, Kalantzakis G, et al (2004) Antifungal properties of *Origanum glandulosum* Desf. extracts. *J Food Agric Environ* 2:69–73
16. Skoula M, Grayer RJ, Kite GC, et al (2008) Exudate flavones and flavanones in *Origanum* species and their interspecific variation. *Biochem Sys Ecol* 36:646–54
17. Braca A, Sortino C, Politi M, et al (2002) Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol* 79:379–81
18. Shon MY, Kim TH, Sung NJ (2003) Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaeaceae) extracts. *Food Chem* 82:593–7
19. Al-Saikhan MS, Howard LR, Miller JC (1995) Antioxidant activity and total phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J Food Sci* 60:341–7
20. Hilan C, Bouaoun D, Aoun J, et al (2009) Antimicrobial properties and toxicity by LD<sub>50</sub> determination of an essential oil of *Prangosa sperula* Boissier. *Phytothérapie* 7:8–14
21. Winter CA, Risley EA, Nuss GW (1962) Carrageenin induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1:544–7
22. Sosa S, Altinier G, Politi M, et al (2005) Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 12:271–7
23. Turker AU, Camper ND (2002) Biological activity of common mullein, a medicinal plant. *J Ethnopharmacol* 82:117–25
24. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprocess Technol* 4:217–33
25. Riahi RC, Tarhouni S, Kharrat R (2011) Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranéenne. *Arch Inst Pasteur Tunis* 88:1–4
26. Patil VV, Patil VR (2010) A comparative evaluation of anti-inflammatory activity of the bark of *Ficus bengalensis* in plants of different age. *J Basic Clin Pharm* 1:107–13
27. Kumari KD, Weerakoon TC, Handunnetti SM, et al (2014) Anti-inflammatory activity of dried flower extracts of *Aegle marmelos* in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 151:1202–8
28. Veras HN, Araruna MKA, Costa JG, et al (2013) Topical anti-inflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. *Phytother Res* 27:179–85
29. Oliveira RB, Chagas-Paula DA, Secatto A, et al (2013) Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Rev Bras Farmacogn* 23:497–505
30. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, et al (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Med* 4:31–4
31. Elhardallou SB (2011) Cytotoxicity and biological activity of selected Sudanese medicinal plants. *Res J Med Plants* 5:201–29
32. McLaughlin JLM, Rogers LL, Anderson JE (1998) The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J* 32:513–24
33. Badisa RB, Badisa VLD, Walker EH, et al (2007) Potent cytotoxic activity of *Saururus cernuus* extract on human colon and breast carcinoma cultures under normoxic conditions. *Anticancer Res* 27:189–94
34. Badisa RB, Darling-Reed SF, Joseph P, et al (2009) Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res* 29:2993–6