

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université
BELHADJ BOUCHAIB – Ain Temouchent
Faculté des Sciences et technologie
Département de Biologie

Mémoire de Master

Filière : Biologie

Option : Biochimie

Thème

**Propriété antioxydante des extraits des
feuilles d'*Origanum vulgare* (Origan) d'Ain
Temouchent**

Présente par :

- *M^{elle} Zemmour Racha*
- *M^{elle} Tahar Belarbi Fatima Zohra*
- *M^{elle} Mohamed Belhadj Wiam*

Devant le jury composé de :

Dr. Abi-Ayad M.	(MCB) UAT.B.B (Ain-Temouchent)	Présidente
Dr. Madani K.	(MAA) UAT.B.B (Ain-Temouchent)	Examinatrice
Dr. Bentabet N.	(MCA) UAT.B.B (Ain-Temouchent)	Encadreur

Année universitaire : 2021-2022

Remerciement

*Au terme de ce travail nous remercions **Dieu** le tout puissant de nos avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement et très particulièrement notre promotrice et notre Encadreur **M^{me} Bentabet N.** Maitre de conférences A à l'université Belhadj Bouchaib, pour son aide, ses conseils, son orientation et sa grande gentillesse. Qu'elle sache que sa disponibilité, ses qualités humaines exceptionnelles et sa rigueur scientifique ne nous ont pas laissé indifférente. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance.*

*Nous sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres de jury pour **M^{me}. Abi-Ayad M** Maitre de conférences classe B et **M^{me} Madani K**, Maitre assistante classe A à l'université Belhadj Bouchaib, pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant d'examiner notre travail.*

*On tient particulièrement a exprimé notre vive reconnaissance à **Mlle Mohamed Aggad Fatima Zohra** de nous avoir accueilli et accompagné au sein du laboratoire.*

Nous remercions également exprimés à tous le personnel du laboratoire

*Notre reconnaissance va également au Chef de Département de biologie **M. Bennabi** et a tous les enseignants de ce Département.*

Enfin, nous remercions s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Nous avons le plaisir de dédier ce modeste travail :

A Allah unique, éternel, le tout puissant et son prophète Mohamed (SAW)

A nos très chers parents pour leur amour, leur sacrifice, leur encouragement, pour tout ce qu'ils nous ont apporté et les valeurs qu'ils nous ont enseignées, pour leur soutien et leur confiance notamment durant nos études.

Que DIEU leur procure bonheur, santé et longue vie, merci papa et maman.

A nos adorables frères et sœurs, grands et petits

A toute nos familles présentes pour nous

A tous nos amis (es), et à tous ceux qui me sont chers

A toute la promotion Biochimie et toute l'équipe du laboratoire

A la doctoresse qui nous a suivie et aidé durant ses expériences scientifiques au Laboratoire

Une dédicace spéciale à notre Chère Professeur mme Bentabet. N pour nous avoir encadré

Durant notre mémoire mais surtout pour son soutien et sa présence à nos côtés

Racha, Fatima et Wiam

Sommaire

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
Synthèse Bibliographique	4
<u>Chapitre 1: <i>Origanum vulgare</i></u>	5
1.1. Histoire	5
1.2 Nomenclature et classification	5
1.3 Présentation botanique.....	5
1.4 Présentation géographique	6
1.4.1. Au monde.....	6
1.4.2 En Algérie	7
1.5 Composition chimique.....	7
1.6 Utilisation traditionnelle.....	9
<u>Chapitre 2: L'activité antioxydante</u>	10
2.1 Définition de l'activité antioxydante	9
2.2 Le stress oxydatif	9
2.2.1 Les radicaux libres.....	9
2.2.2 Mécanisme de production et d'élimination des ROS dans l'organisme.....	10
2.3. Propriétés antioxydantes.....	11
2.4 Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante	11
2.4.1 Test DPPH	11
2.4.2 Test TEAC	122
2.4.3 Test ORAC.....	133
2.4.4 Test FRAP.....	133
2.4.5 Test TRAP	144
2.4.6 Test à l'hémolyse des globules rouges	144
Matériel et méthodes	155
1. Matériel végétal.....	16
2. Méthodes.....	16

2.1. Préparation des différents extraits de d' <i>Origanum vulgare</i>	16
2.2. Tests phytochimiques.....	18
3. Evaluation de l'activité antioxydante, <i>in vitro</i> , des extraits de feuilles d' <i>Origanum vulgare</i> .	18
3.1. Réduction du fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>)	19
3.2. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	22
Résultats et discussion	23
1. Rendement d'extraction	24
2. Tests phytochimiques.....	24
3. Activité antioxydante	27
3.1. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)	27
3.2. Test de piégeage du radical libre DPPH	30
Conclusion	33
Références bibliographiques	35

Résumé

L'Algérie est un pays riche en plantes aromatiques dont plusieurs sont endémiques telles que l'espèce *Origanum vulgare* (famille des Lamiacées). Les huiles essentielles et les extraits d'origan sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et participe à la préservation de plusieurs produits alimentaires.

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation des feuilles de cette plante médicinale présente dans la région d'Ain Témovent, en vue d'identifier ses molécules bioactives possédant des propriétés antioxydantes. Dans ce contexte, cette investigation est fondée sur un ensemble d'expériences réalisées sur trois extraits aqueux obtenus après macération, infusion et décoction des poudres de feuilles, tels que les tests phytochimiques puis l'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits bruts aqueux par deux méthodes à savoir le pouvoir réducteur du fer FRAP et le piégeage du radical DPPH.

Les résultats obtenus ont montré un rendement d'extraction important estimé à 39.5% pour l'extrait aqueux obtenu par décoction. Concernant les tests phytochimiques, une teneur considérable des trois extraits aqueux en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les terpenoïdes, les tanins, les quinones et les composés réducteurs a été enregistrée.

Les résultats ont montrés que l'extrait obtenu par décoction présente une capacité à réduire le fer très importante et qui reste supérieure à celle de l'acide ascorbique avec une DO égale à 2.793 à la concentration de 25mg/ml. Selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH, l'extrait obtenu par la méthode d'infusion a présenté une excellente activité antioxydante par rapport aux deux autres extraits testés avec une IC50 égale à 2.83 mg/mL.

En conclusion, la présente étude révèle une preuve biologique qui soutient l'efficacité d'utilisation des feuilles d'*O. vulgare* comme remède traditionnel contre plusieurs pathologies.

Mots clés : *Origanum vulgare*, Extrait aqueux, Métabolites secondaires, Activité antioxydante, Acide ascorbique.

Abstract

Algeria is a country rich in aromatic plants, several of which are endemic, including the species *Origanum vulgare* (Lamiaceae family). Essential oils and oregano extracts are widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries and participate in the preservation of several food products.

The present study is part of the valuation of the leaves of this medicinal plant present in the region of Ain Témouchent, in order to identify its bioactive molecules with antioxidant properties. In this context, this investigation is based on a set of experiments carried out on three aqueous extracts obtained after maceration, infusion and decoction of leaf powders, such as phytochemical tests and then the evaluation of the antioxidant power of the different raw aqueous extracts by two methods namely the reducing power of iron FRAP and the trapping of the radical DPPH.

The results obtained showed a significant extraction yield estimated at 39.5% for the aqueous extract obtained by decoction. Regarding the phytochemical tests, a considerable content of the three aqueous extracts in flavonoids, terpenoids, tannins, quinones and reducing compounds was recorded.

The results showed that the extract obtained by decoction has a very significant capacity to reduce iron and which remains higher than that of ascorbic acid with an OD equal to 2.793 at a concentration of 25mg/ml. According to the DPPH free radical scavenging method, the extract obtained by the infusion method showed excellent antioxidant activity compared to the other two extracts tested with an IC₅₀ equal to 2.83 mg/mL.

In conclusion, the present study reveals biological evidence that supports the efficacy of using leaves of *O. vulgare* as a traditional remedy for several pathologies.

Keywords : *Origanum vulgare*, Aqueous extract, Secondary metabolites, Antioxidant activity, Ascorbic acid.

الملخص

الجزائر بلد غني بالنباتات العطرية ، والعديد منها مستوطن ، بما في ذلك نوع (*Origanum vulgare*) عائلة (Lamiaceae) تستخدم الزيوت الأساسية ومستخلصات الأوريغانو على نطاق واسع في الصناعات الدوائية والتجميلية وتشارك في حفظ العديد من المنتجات الغذائية.

الدراسة الحالية هي جزء من تبيين أوراق هذا النبات الطبي الموجود في منطقة عين تموشنت ، من أجل التعرف على جزيئاته النشطة بيولوجيًا بخصائصها المضادة للأكسدة. في هذا السياق ، يعتمد هذا البحث على مجموعة من التجارب التي تم إجراؤها على ثلاثة مستخلصات مائية تم الحصول عليها بعد نقع مساحيق الأوراق وتسريبها وتغليها ، مثل الاختبارات الكيميائية النباتية ثم تقييم القوة المضادة للأكسدة للمستخلصات المائية الخام المختلفة بمقدار اثنين. الطرق وهي تقليل قوة الحديد FRAP ومحاصرة DPPH الجذري.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها إنتاجية عالية تقدر بـ 39.5٪ للمستخلص المائي المتحصل عليه بالمرق. فيما يتعلق باختبارات الكيمياء النباتية ، تم تسجيل محتوى كبير من المستخلصات المائية الثلاثة في مركبات الفلافونويد والتربينويد والعفص والكينون والمركبات المختزلة.

أظهرت النتائج أن المستخلص الذي تم الحصول عليه عن طريق decoction له قدرة كبيرة على تقليل الحديد والتي تظل أعلى من تلك الموجودة في حمض الأسكوربيك مع الكثافة البصرية يساوي 2.793 بتركيز 25 مجم / مل. وفقاً لطريقة مسح الجذور الحرة DPPH ، أظهر المستخلص الذي تم الحصول عليه بطريقة نقيع نشاطاً ممتازاً مضاداً للأكسدة مقارنة بالمستخلصين الآخرين اللذين تم اختبارهما باستخدام IC50 يساوي 2.83 مجم / مل.

في الختام ، تكشف الدراسة الحالية عن أدلة بيولوجية تدعم فعالية استخدام أوراق *Origanum vulgare* كعلاج تقليدي للعديد من الأمراض.

الكلمات المفتاحية *Origanum vulgare* ، مستخلص مائي ، مستقلبات ثانوية ، نشاط مضاد للأكسدة ، حمض الأسكوربيك.

Liste des tableaux

Tableau N°01: Répartition géographique des deux espèces d'origan en Algérie.....	7
Tableau N°02: Principaux radicaux libres rencontrés en biologie	10
Tableau N°03: Aspect et rendement en extrait sec des différentes modes d'extraction.	24
Tableau N°04: Résultats des tests phytochimiques des extraits d' <i>Origanum vulgare</i>	Error!
Bookmark not defined.	
Tableau N°05: Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits d' <i>Origanum vulgare</i> et l'acide ascorbique.	32

Liste des figures

Figure N°01: Caractéristiques botaniques d' <i>Origanum vulgare</i>	6
Figure N°02: La partie florale d' <i>Origanum vulgare</i>	6
Figure N°03: Distribution du genre <i>Origanum vulgare</i> au monde	7
Figure N°04: Réaction de DPPH.....	12
Figure N°05: Structure de l'ABTS •	12
Figure N°06: Photo du matériel végétal	16
Figure N°07: Forme libre et réduite de DPPH.....	21
Figure N°08: Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d' <i>Origanum vulgare</i> par la méthode de FRAP comparé avec l'acide ascorbique	28
Figure N°09: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH. en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles d' <i>Origanum vulgare</i> et de l'acide ascorbique.....	31

Liste des abréviations

AAPH : 2,2-azobise (2-amidinopropane)

ABTS : 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazolin-6-sulfonate).

BAP : 2,2-azobis(2-amidinopropane).

C° : Degré Celsius.

D.O : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

FRAP : Ferric Reducing Ability of plasma ..

g : Gramme.

HPLC : High Performance Liquid Chromatography.

I% : Pourcentage d'inhibition ou activité antioxydante.

IC50 : Concentration Inhibition à 50%.

mg : Milli gramme.

ml : Millilitre.

µL : Microlitre.

nm : Nanomètre.

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity.

R% : Rendement des extraits.

ROS : Reactive oxygen Species (espèce réactive oxygénée)

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique.

TCA : Acide Trichloracétique.

TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity.

TRAP : Telomeric Repeat Amplification Protocol.

UV : Ultra-violet.

V : Volume par ml.

Introduction

Dans le monde, un grand nombre de plantes aromatiques possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Cependant, l'homme a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, ni de définir les molécules qui en sont responsables (**Mohammedi, 2006**).

Aujourd'hui, les traitements à base de substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans des nombreux produits de consommation. En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèse chimique présentent de multiples effets néfastes. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Il existe donc un besoin de production de substance bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour une utilisation dans un large champ (**Mahfouf, 2018**).

Entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale. La revalorisation d'herboristerie traditionnelle pourrait aboutir à l'homologation de nouveau médicament à base de plantes. La possibilité de concilier le meilleur de chaque discipline, traditionnelle et allophanique, est un grand progrès (**Mahfouf, 2018**).

Parmi les plantes médicinales algériennes les plus utilisées nous retrouvons le genre *Origanum* qui, regroupe environ 38 espèces dont environ 75% sont concentrées dans le pourtour méditerranéen, en particulier dans les régions méditerranéennes de l'Ouest. En Algérie, le genre *Origanum* regroupe trois espèces : *Origanum majorant*, *Origanum floribundum* et *Origanum vulgare*. L'espèce *Origanum vulgare* 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.

En médecine traditionnelle, *Origanum vulgare* 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. Des études pharmacologiques ont confirmé que les huiles essentielles et les extraits phénoliques de cette espèce exercent diverses activités biologiques à savoir antioxydante, antibactérienne, antifongique, antidiabétique, insecticide, anticholinestérase et neuroprotectrice (**krimat et al., 2017**).

Les extraits de cette plante regroupent de multiples métabolites qui sont dotés de propriétés antioxydantes les rendant intéressants comme nouveaux produits pharmaceutiques, ou comme des alternatives naturels qui peuvent remplacer les molécules synthétiques douées des mêmes propriétés (**Machu, 2009**).

Dans ce contexte et afin de mettre en valeur la plante *Origanum vulgare* présente dans la région d'Ain Temouchent, nous avons opté pour la valorisation de ses feuilles par l'étude de leurs composition phytochimique et pouvoir antioxydant.

Notre travail est scindé en plusieurs parties :

- Une synthèse bibliographique comportant trois chapitres : dont le premier est consacré à l'étude botanique d'*Origanum vulgare*, sa répartition géographique et sa composition chimiques et un deuxième chapitre qui porte sur l'activité antioxydante.
- Une partie expérimentale consacrée à la préparation des extraits aqueux (décocté, infusé et macérât), suivie d'une gamme de tests phytochimiques, ainsi qu'une évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits par deux méthodes de référence.
- Une dernière partie qui présente les résultats obtenus dans notre pratique accompagnée d'une discussion et une conclusion pour terminer notre travail.

Synthèse
Bibliographique

Chapitre 1 : *Origanum vulgare*

1.1.Histoire

L'origan est connu depuis l'antiquité en grec et en Italie où elle est utilisée pour ses vertus aromatiques en cuisine. Et pour ses vertus médicinales mais également il jouait un rôle symbolique d'apporter la joie lors des mariages pour apporter la paix et le bonheur aux mariés.

1.2.Nomenclature et classification

Le terme origan vient de 2 mots Grec « OROS » Qui signifiait montagne et « ganos » qui signifie « éclat ». Ce mot signifiant « ornement des montagnes » (Figueredo, 2007). La classification taxonomique D'après Deysson 1967, est comme suite :

Embranchement	: Spermaphytes
Sous-Embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Sous-classe	: Gamopétales
Série Superovariées	: Tétracycliques
Super ordre	: Tubiflorales
Ordre	: Lamiales
Famille	: Lamiaceae
Sous-famille	: Népétoïdées
Genre	: <i>Origanum</i>

La famille des Lamiaceae comprend 187 genres et 3 000 espèces. Elle est la plus homogène de la sous classe des gamopétales, et la plupart des genres sont riches en huiles essentielles (Atlan, 1987). L'ancien nom des lamiaceae était Labiées qui dérive du nom latin "labium" qui signifie lèvre, en raison de la forme particulière des corolles.

1.3.Présentation botanique

Origanum vulgare est une plante herbacée vivace et d'après Ietswaart 1980, la plante a une taille variable allant d'environ 30 à 80 cm de haut et fleurit de Mai à Octobre (Figure N°01).

Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, portent les feuilles ovales opposées et espacées. Celles-ci possèdent des glandes sécrétrices sessiles non apparentes. Les fleurs blanches ou rose sont groupées en inflorescences. Chaque fleur est située à l'aisselle d'une bractée ovale, et

dépassant le calice. Le fruit est constitué d'akènes. La floraison se prolonge de mai à octobre (Teuscher et al., 2004) ; (Figueredo, 2007) (Figure N°02).



Figure N°01: Caractéristiques botaniques d'*Origanum vulgare* (Bouhaddouda, 2016)



Figure N°02: La partie florale d'*Origanum vulgare*

1.4. Présentation géographique

Le genre *Origanum* a été découvert par **Ietswaart** en **1980**. Il a divisé en 3 groupes, 10 sections regroupent 38 espèces, 6 sous- espèces, 3 variétés et des hybrides naturels.

1.4.1. Au monde

L'origan est une plante spontanée endémique qui pousse au nord de l'Afrique (Algérie et Tunisie) (**Ietswaart, 1980**). Très commune dans les endroits secs et ensoleillés tel que le Tell, elle pousse depuis le niveau de la mer jusqu'à 4000 m d'altitude, principalement sur les substrats calcaires (**Baba Aissa, 1990**). Elle est présente dans les îles de Canaries et dans l'Europe du nord, jusqu'à l'Asie de l'est et le nord d'Afrique. Elle est principalement répartie en Turquie qui est considérée comme le centre génique du genre *Origanum* et qui possède 16 espèces (**Baser, 1995**)

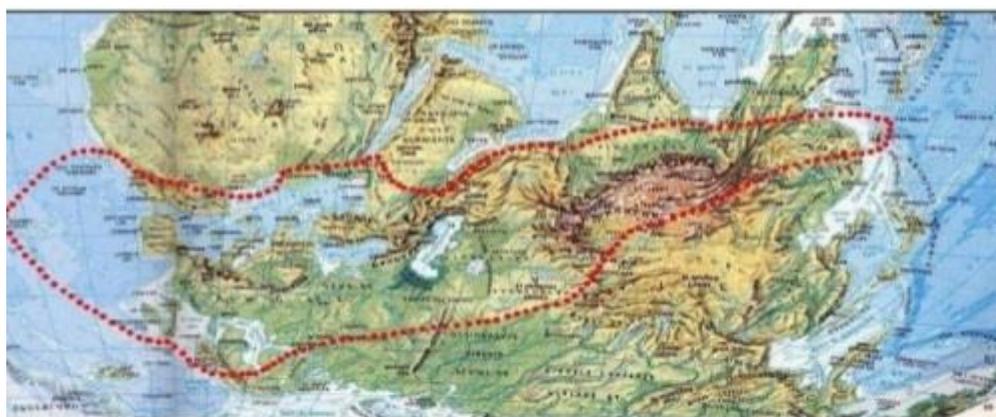


Figure N°03: Distribution du genre *Origanum vulgare* au monde

(Ietswaart,1980)

1.4.2. En Algérie

L'origan est une plante très répandue en Algérie représentée par 2 espèces d'*Origanum vulgare* *N°0ssp glandulosum*, et *Origanum floribundon* (Mahfouf, 2018) (Tableau N°01).

Tableau N°01: Répartition géographique des deux espèces d'origan en Algérie (Hazzit, 2008)

Espèce	Localisation caractéristique
<i>Origanum vulgare</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Commune dans tout le Tell. - Endémique Algéro-Tunisienne. - Pousse dans les garrigues et broussailles.
<i>Origanum floribundon mumby</i>	<ul style="list-style-type: none"> -Espèce rare qui pousse dans la partie nord centrale (Kabylie, Médéa, Blida). - Endémique d'Algérie. - Pousse en pâturage et surtout en montagne.

1.5.Composition chimique

L'origan renferme une essence de couleur jaune à brun foncé, d'odeur phénolique Agreste, très aromatique et de saveur amère, chaude et épicée. L'huile essentielle de l'origan est particulièrement pourvue en phénols : le carvacrol et son isomère, le thymol (Bardeau, 2009). L'essence d'origan est un liquide jaune/rouge très aromatique soluble dans l'alcool. Elle est riche en phénols _ carvacrol (jusqu'à 74%) ou thymol (jusqu'à 25%). Elle peut contenir aussi

des alcools libres et estérifiés, des carbures (ex : α -terpinène, origanène (Essence de chypre)). La plante renferme en plus, un glucoside hydrosoluble (0,50g/kg de Drogue sèche) et un saponoside acide (1,20g). Dans les parties souterraines de l'origan, on retrouve du stachyose thymol : terpenoïde utilisé comme antiseptique locale et antihelminthique. Il est également utilisé en association dans des spécialités à visée antiseptique bronchopulmonaire.

Le carvacol est tout simplement le plus puissant des phénols. Il a donc comme vertu d'être très réactif et il accentuera les effets du thymol. Les deux phénols agissant ensemble. Il Possède également des vertus antioxydantes, luttant contre le vieillissement cellulaire.

Malgré le fait que ces produits soit d'origine végétale, il reste néanmoins que l'huile essentielle d'origan doit être prise selon les indications d'un aromathérapeute. En effet, à de forte concentration, ou à prise prolongée, les phénols peuvent altérer les hépatocytes (**Mezianie, 2015**).

1.6. Utilisation traditionnelle

Les plantes de ce genre sont traditionnellement utilisées comme traitement des affections dermatologiques, comme trophiques protecteur dans le traitement des crevasses, dans les affections urinaires, et contre les piqûres d'insectes (**Bruneton ,1999**). En cas de rhume, l'origan est utilisé comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et ou pharynx, pour traiter les troubles respiratoires, la dyspepsie, les menstruations douloureuses, l'arthrite rhumatoïde (**Bruneton., 1999**). L'origan est Couramment utilisé dans les aliments, pour sa saveur et son arôme, en Industrie pharmaceutique et en cosmétique (**Tucker et Maciarello, 1994**).

Chapitre 2 : Activité antioxydante

2.1. Définition de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (Vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et les superoxydes (O_2^-) (Mahfouf, 2018).

2.2. Le stress oxydatif

Dans des conditions naturelles, le tissu sain a un système antioxydant de protection capable de détruire les radicaux libres en excès. Le complexe antioxydant/oxydant définit la balance oxydative équilibrée (Boulgroun et Ardjoun, 2019). Lorsqu'un déséquilibre entre la production d'espèce oxydante ou une forme réactive d'oxygène et le système antioxydant existe, cela est appelé un stress oxydatif (Pasquier, 1995).

2.2.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres des espèces chimiques sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique. Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxyde $ROO\bullet$, radical alkoxyde $RO\bullet$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Meziani, 2015). Les principaux radicaux libres rencontrés en biologie sont résumés dans le tableau N°02 (Catherine et Luc, 2005).

Tableau N°02: Principaux radicaux libres rencontrés en biologie (Catherine et Luc., 2005)

Radical libre	Molécule	Demi-vie (S)
Superoxyde	O ₂ *	?
Hydroxyle	*OH	10-9
Alkoxyde	RO*	10-6
Alkylperoxyde	ROO*	10-1
Monoxyde d'azote	*No	1-10

2.2.2. Mécanisme de production et d'élimination des ROS dans l'organisme

Les espèces réactives de l'oxygène à l'origine de la perturbation de l'homéostasie cellulaire peuvent être produites à la fois par des sources endogènes à travers le cytochrome P450 des Mitochondries, les peroxysomes et les cellules inflammatoires, et par des sources exogènes tel que le rayonnement, l'ozone, l'hyperoxie et les xénobiotiques.

Les mécanismes de défense contre la toxicité des espèces réactives de l'oxygène sont nombreux (Govindarajan et al., 2005) et proviennent de diverses sources également. La première source est endogène et est composée de protéines enzymatiques. Nous avons le complexe enzymatique superoxyde dismutase la catalase et le glutathion peroxydase qui jouent un rôle indispensable dans cette défense (Matés et Sánchez-Jiménez, 1999).

La seconde source, très importante, est l'alimentation et la médecine à travers lesquelles des petites molécules sont consommées. Ce sont les vitamines, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les acides phénols, les coumarines, les quinones, les alcaloïdes. Les parties les plus actives de ces molécules sont les hydroxyles libres, les noyaux aromatiques, les doubles liaisons éthyléniques souvent conjuguées, qui permettent de donner des électrons et de rester stables par mémorisation (Heim et al., 2002).

2.3. Propriétés antioxydantes

L'activité antioxydante des métabolites secondaires et plus précisément des polyphénols est liée à leur structure. Il existe une corrélation entre cette dernière et l'arrangement spatial des substituants. En effet, la position ainsi que le degrés d'hydroxylation influencent fortement cette activité (Heim et al., 2002) ; (Gonzalez et al., 2020).

Ces métabolites sont de puissants antioxydants. Ils sont impliqués dans cette activité via plusieurs mécanismes agissant à différents niveaux des réactions radicalaires, piégeage des radicaux libres, chélation des ions de métaux de transition, inhibition des enzymes génératrices d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et prévention de la peroxydation lipidique (Szymanowska et Baraniak, 2019) ; (Sanchez-Rodriguez et al., 2020).

2.4. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

Depuis ces dernières décennies, les tests d'activité antioxydante ont été largement développés pour évaluer l'efficacité de nouveaux composés. De nombreuses méthodologies sont disponibles, permettant d'évaluer les différents aspects physico-chimiques du potentiel antioxydant dans différentes conditions. Dans cette section, les méthodes expérimentales les plus répandues seront décrites.

2.4.1. Test DPPH

Le DPPH• (ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical stable à température ambiante et de couleur bleue caractéristique. Sa stabilité provient de la haute délocalisation des électrons π le long de la molécule. Il est un des premiers radicaux à avoir été utilisé pour étudier la relation structure/activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède dans sa structure un électron non apparié sur un atome du pont azote-azote. Sa particularité provient de la modification de ses propriétés d'absorption UV/Visible selon son état : la forme réduite absorbe à 515-518nm alors que sa forme oxydée ne présente pas de pic d'absorption.

L'efficacité d'un antioxydant peut être mesurée par sa capacité à réduire le radical. Ceci s'observait historiquement par le changement de couleur allant du bleu-violet (forme oxydée) au jaune (forme réduite) (Brand-williams et al., 1995).

Lors du transfert électronique, cette propriété peut dorénavant être quantifiée par spectroscopie UV/Visible en se focalisant sur l'absorption à 515-518 nm. Ce test est encore fréquemment utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant de polyphénols. Un avantage indéniable de ce test est qu'il permet également d'évaluer la cinétique de piégeage. Pour évaluer l'activité antioxydante, deux approches sont utilisées : d'une part, la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (Meo et al., 2013).

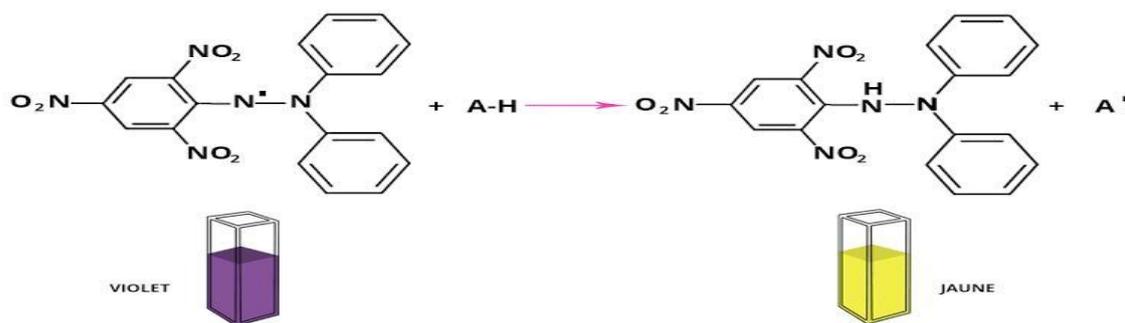


Figure N°04: Réaction de DPPH.

2.4.2. Test TEAC

La méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxydant Capacity*) permet de mesurer la capacité d'un candidat à piéger le radical cation ABTS•+ (obtenu à partir de sels d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La particularité de cette méthode est l'aspect compétitif puisque la mesure aura comparé la capacité d'un antioxydant de référence le Trolox. Il est important de noter que le Trolox est un analogue chimique de la vitamine E.

Le test TEAC est également une méthode colorimétrique où une décoloration de la Solution bleue-verte contenant ABTS•+ sera observée lors de la formation de ABTSH+ (Couleur bleue à verte). Cette décoloration pourra également être quantifiée par spectrophotométrie (Absorption UV/Visible) à 734 nm. La valeur TEAC obtenue par ce test correspond à la concentration de Trolox ayant la même activité que la concentration unitaire du composé à tester.

C'est une méthode, tout comme le DPPH, conceptuellement facile à mettre en place puisque seuls les réactifs et un spectrophotomètre sont nécessaires. Elle est, de plus, rapide et se corrèle bien avec des tests biologiques. En revanche, l'inconvénient majeur de cette méthode relève de

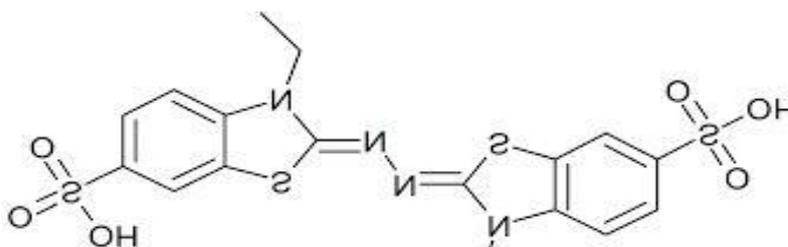


Figure N°05: Structure de l'ABTS •

l'instabilité des radicaux ABTS•+. Ces derniers doivent être générés extemporanément à partir de sels d'ABTS et la mesure doit être faite assez rapidement.

2.4.3. Test ORAC

Le test ORAC (ou Oxygen Radical Absorbance Capacity) est une méthode de mesure de la capacité antioxydante des échantillons biologiques *in vitro*. Cette méthode mesure la dégradation oxydative d'une molécule fluorescente après ajout d'un générateur de radicaux libres, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH). La dégradation thermique de cette molécule en présence d'oxygène va provoquer la génération de radicaux libres de façon régulière qui vont pouvoir attaquer la membrane des globules lors du transfert électronique. Deux systèmes révélateurs sont fréquemment utilisés : la fluorescéine et la α -phycoérythrine. La dernière est particulièrement pertinente des tests *in vitro* puisque c'est une fluoroprotéine.

Le principe est basé sur la mesure de la baisse de fluorescence. La génération de radicaux libres dégrade la molécule optiquement active, qui perd alors sa propriété à émettre, et ainsi aboutit à une perte de fluorescence du milieu. L'avantage principal de cette méthode est la capacité d'évaluer dynamiquement les capacités antioxydantes de composés. Elle permet notamment de déceler une latence d'action (Ou et al., 2001).

2.4.4. Test FRAP

Le test FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) est une méthode basée sur le Changement de coloration lors de la réduction du fer, de l'ion ferrique (Fe^{3+}) à l'ion Ferreux (Fe^{2+}) par transfert d'électrons.

Cette réduction se fait en présence d'un antioxydant. Étant donné la nature de la réaction de réduction, l'antioxydant doit présenter une capacité de donneur d'électron. Le transfert d'atome d'hydrogène ne sera pas le mécanisme privilégié. L'absorbance est mesurée à 593 nm.

Ce test est peu coûteux, simple, reproductible et rapide. Toutefois il n'est pas capable d'évaluer l'activité antioxydante des thiols (SH), incluant donc les polypeptides et les protéines à groupement cystéine (Pellegrini et al., 2003).

2.4.5. Test TRAP

Ce test TRAP (ou Telomeric Repeat Amplification Protocol) est spécifique de l'action des antioxydants sur les radicaux peroxydes ROO•. Ces radicaux vont être produits par des Générateurs de radicaux libres. Pour ce test, le BAP [2,2-azo-bis(2-amidinopropane) Chlorhydrate] ou le AAPH [2,2'-azobis (2- amidinopropane)] seront utilisés.

Cette méthode permet de quantifier les antioxydants non enzymatiques (glutathion...) Ainsi que de mesurer la capacité antioxydante du plasma et du sérum. En revanche, cette Méthode se base sur le fait que chaque antioxydant possède un temps de latence avant son action. Ainsi la corrélation avec d'autres méthodes d'évaluation est particulièrement Compliquée (**Pellegrini et al., 2003**).

2.4.6. Test à l'hémolyse des globules rouges

Ce test consiste à prélever sur de l'EDTA (ou Éthylène Diamine Tétra-Acétique) du Sang qui sera ensuite être centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes afin d'extraire un culot de globules rouges.

Ce culot sera lavé puis mis en contact avec le générateur de radicaux libre AAPH à 37°C. Quand les antioxydants endogènes seront consommés, les radicaux libres agiront alors sur les parois des érythrocytes entraînant alors leur éclatement. L'hémoglobine sera alors reléguée dans le milieu. Ce phénomène d'hémolyse sera suivi par spectrophotométrie à 545nm. Si dans le milieu sont présents des composés à activité antioxydante, l'hémolyse sera logiquement retardée. Cette méthode nécessite un étalonnage en utilisant la vitamine C comme référence.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des feuilles d'*Origanum vulgare* acheté de chez un herboriste de la Wilaya d'Ain Témouchent, située dans l'ouest d'Algérie. Ces feuilles ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées, ces dernières ont été réduites en poudre en utilisant un broyeur automatique puis soumises à l'extraction (**Figure N°06**)



Figure N°06: Photo du matériel végétal

2. Méthodes

2.1. Préparation des différents extraits de *d'Origanum vulgare*

Pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *d'Origanum vulgare*, des extraits bruts sont préparés à partir des feuilles de la plante.

2.1.1 Macération

20 g de la matière végétale sont mises en contact avec 100mL d'eau distillée froide. L'ensemble est laissé macérer durant 24 h sous agitation continue. L'opération est répétée une deuxième fois avec renouvellement du solvant (eau) toutes les 24 heures. Les fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 50°C.

2.1.2 Infusion

20 g de la matière végétale sont mises en contact avec 100mL d'eau distillée chaude. L'ensemble est laissé infuser durant 24 h sous agitation continue. L'opération est répétée deuxième fois avec renouvellement du solvant (eau chaude) toutes les 24 heures. Les fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 50°C

2.1.3 Décoction

Nous avons utilisé la technique d'extraction sous reflux continue. 20 g de la matière végétale broyée sont mises en contact avec 100mL d'eau distillée froide et sont portés à ébullition. L'opération est répétée trois (03) fois en renouvelant le solvant toutes les 30 minutes. Les trois fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 50°C. Le produit est récupéré sous forme de poudre de couleur marron.

2.1.4. Le rendements des extraits secs

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec, en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre) en gramme, et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme ; selon l'équation suivante :

$$Rdt (\%) = [(P1 - P2) / P3] \times 100$$

P1 : poids du boite après le séchage ;

P2 : poids du ballon avant le séchage ;

P3: poids de la matière végétale initial.

2.2 Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les extraits des écorces de fruits d'*Origanum vulgare*.

□□ Les tanins (Karumi et al., 2004)

On ajoute 3 gouttes de FeCl_3 1% à 1 mL d'extraits. Après deux minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

□□ Les flavonoïdes (Karumi et al., 2004)

2mL de chaque extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d' HCL 37%, et avec 0.5 g de tournure de magnésium (Mg). Le test positif est marqué par l'apparition d'une couleur rouge ou orange qui caractérise les flavonoïdes.

□□ Les terpenoïdes

On ajoute 1 mL de chloroforme et 1.5 mL de H_2SO_4 concentrée à 2.5 mL de nos extraits. La présence des terpenoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

□□ Les stéroïls : réaction de Libermann-Burchard

On traite 1 mL d'extrait avec 2.5 mL d'anhydride acétique et 10 gouttes d' H_2SO_4 concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

□□ Les coumarines

A 1 mL de chaque extrait, on ajoute 1 mL d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0.5mL de NH_4OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines (Bruneton, 1999).

□□ Les alcaloïdes

2.5 mL d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 0.1 mL d'extrait, et incubés au bain- marie pendant 10 min. La solution obtenue est divisée en deux parties. On ajoute à l'une le réactif de Mayer et à l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Réactif de Mayer: Dissoudre 1.358g d' HgCl_2 dans 60 mL d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 mL d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100mL.

Réactif de Wagner : Dans 75mL d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 127g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 mL avec l'eau distillée.

□□ Les quinones libres

A un volume de 1mL de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (Oloyede, 2005).

□□ Les saponosides

On ajoute 1 mL d'eau distillée à 2 mL de chaque extrait, puis la solution est agitée pendant 1 minute. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse qui persiste durant 15 minutes. Le test est considéré comme positif si l'épaisseur de la mousse dépasse 1cm.

□□ Les composés réducteurs

On ajoute à 1 mL de nos extraits 0.5 mL de Liqueur de Fehling A et B puis on chauffe les tubes au bain marie à 100°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (Trease et Evans, 1987).

3. Evaluation de l'activité antioxydante, *in vitro*, des extraits de feuilles d'*Origanum vulgare*

3.1. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

3.1.1. Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (Oyaizu, 1986). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

3.1.2. Mise en œuvre pratique

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözleret al., 2008**.

1mL de l'échantillon à différentes concentrations (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5 et 3 mg/ml) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%, puis on incube les tubes à 50°C pendant 20 minutes.

Après refroidissement des tubes à température ambiante, on ajoute 2.5mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes. A 2.5mL du surnageant, nous avons ajouté 2.5mL d'eau distillée. Au mélange obtenu, 500µL d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3, 6 H_2O$) à 0.1% fraîchement préparée est additionnée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique et BHT sont utilisés comme des contrôles positifs dans cette expérience dans les mêmes conditions.

3.1.3. Expression des résultats

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des deux parties de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

3.2. Test de piégeage du radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl)

3.2.1. Principe

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•], qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (**figure N°07**) (**Parejo et al., 2003**).

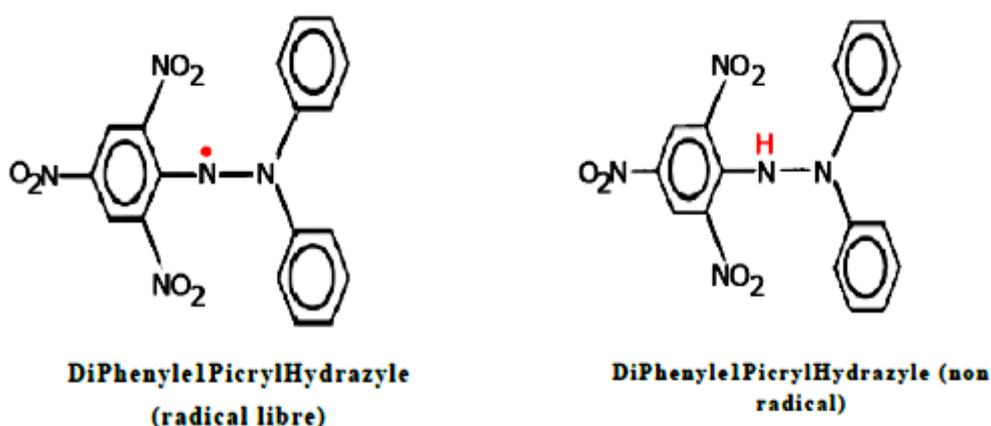


Figure N°07: Forme libre et réduite de DPPH

3.2.2. Mise en œuvre pratique

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par **Sanchez-Moreno et al., 1998**.

Un volume de 50 μL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/L) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 μL du méthanol avec 1,95 mL d'une solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50 μL de chaque concentration de l'extrait et 1,95 mL du méthanol.

3.2.3. Expression des résultats

□ Calcul des pourcentages d'inhibitions

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test effectué

□ *Calcul des concentrations 50 " IC50"*

IC50 (aussi appelée EC50 pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées en utilisant le logiciel Sigma-plot. **(Bertoncelj *et al.*, 2007) ; (Marxenet *al.*, 2007) ; (Scherer et Godoy, 2009) ; (Fabriet *al.*, 2009).**

Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction

Le rendement en extrait sec et l'aspect des extraits obtenus lors des différentes extractions ont été présentés dans le **tableau N°03**.

Tableau N°03: Aspect et rendement en extrait sec des différentes modes d'extraction.

	Rendement %
Infusion (filtrat 1 +2)	19
macération (filtrat 1+2)	14.5
Décoction (filtrat 1 +2)	39.5

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'extrait aqueux préparé par décoction représente le rendement le plus élevé, avec un pourcentage estimé à 39.5% suivi par l'extrait aqueux préparé par infusion à 19% tandis que l'extrait aqueux préparé sous forme de macérât a aboutis à l'obtention du plus faible rendement estimé à 19%.

Notre résultat reste supérieur à celui trouvé par **Nadji et al., (2019)** et dont le rendement du décocté des feuilles récoltées dans la région de Tizi-Ouzou ne dépassait pas les 16.66%.

Ces résultats traduisent une influence significative de la technique d'extraction utilisée sur le rendement. En général, les composés phénoliques des plantes sont des composés polaires, qui sont généralement extraits avec des solvants polaires tels que l'eau et le méthanol (**Kylli, 2010 ; Wissam et al., 2012**), puisque la solubilité des polyphénols est principalement affectée par la polarité des solvant utilisés (**Wissam et al., 2012**).

Le rendement de l'extraction au solvant dépend de divers facteurs y compris le type de solvants avec ces polarités variables, le temps et la température d'extraction, la composition chimiques de la partie de la grenade utilisée comme échantillon (**Sood et Gupta, 2015**), ainsi que l'influence du pH, l'influence du nombre d'extraction, l'influence de la température de stockage et de la procédure d'extraction choisie (**Wissam et al., 2012**).

2. Tests phytochimiques

Le screening phytochimique est un ensemble des méthodes et techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante et la détection des groupes chimiques responsables des effets thérapeutiques. Les tests de caractérisation sont basés en

partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration (Farnsworth, 1966).

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les trois extraits aqueux d'*Origanum vulgare* sont mentionnés dans le **tableau N° 04**. Nous remarquons que les extraits sont riches en tanins, flavonoïdes, terpenoïdes, quinones et les composés réducteurs. Les saponosides quand à eux se sont révélés présent avec une quantité moyenne jusqu'à faible dans l'infusé. Cependant, on a remarqué une absence totale en stérols, coumarines et alcaloïdes dans les trois extraits testés.

Tableau N°04 : Résultats des tests phytochimiques des extraits d'*Origanum vulgare*.

<i>Métabolites secondaires</i>	Extraits aqueux		
	Infusion	Décoction	Macération
<i>Les tanins</i>	+++	+++	+++
<i>Les flavonoïdes</i>	+++	+++	+++
<i>Les terpenoïdes</i>	+++	+++	+++
<i>Les stérols</i>	-	-	-
<i>Les coumarines</i>	<i>Témoin</i>	<i>Témoin</i>	<i>Témoin</i>
	-	-	-
<i>Les alcaloïdes</i>	-	-	-
	-	-	-
<i>Les quinones</i>	+++	+++	+++
<i>Les saponosides</i>	+	++	++
Les composés réducteurs	+++	+++	+++

+++ : Fortement positif ; ++ : Moyennement positif ; + : Faiblement positif ; - : négatif

Les tests phytochimiques effectués sur les feuilles d'*O.vulgare* récoltées au niveau d'Ain Temouchent, ont révélé la richesse de cette plante en composés phénoliques et en composés terpéniques qui sont considérés comme des antioxydants naturels.

Nos résultats obtenus sont similaires à ceux trouvés par **Toubal et al. (2012)**, qui ont montré la présence des flavonoïdes, des anthocyanes, des stérols et triterpènes, des tanins, et des leucoanthocyanes dans les feuilles de l'origan.

Notre étude révèle l'existence des tanins catéchiques dans tous les échantillons analysés. Les tanins sont tenus comme bons remèdes dans le traitement des maladies respiratoires et contre la toux. Les tanins exercent une activité anti-diarrhéique certaine. Ses propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques sont clairement démontrées dans le traitement des diarrhées infectieuses et de dermatites. Les tanins possèdent une forte activité antioxydante et sont considérés comme de très bons pièges à radicaux libres car ils inhibent la formation de radicaux superoxydes (**Bediaga, 2011**).

Les quinones libres sont présentes en intensité importante dans les trois préparations d'extraits aqueux. Cette gamme de composés stimule le péristaltisme de l'intestin grêle et augmentent les mouvements péristaltiques du côlon. L'antraquinone est utilisée comme laxatif ou purgatif (**Müller-Lissner, 1993**).

Concernant les composés terpéniques nous avons mis en évidence la présence de saponosides, de stéroïdes, de stérols et triterpènes. Ces derniers forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines. Ils sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires et analgésiques (**Bruneton, 1999**).

Les saponosides qui été moyennement présents dans nos extraits possèdent des activités expectorante et anti-inflammatoire. De plus, ils possèdent également des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (**Bruneton, 1999**).

D'autre part les travaux de **Steinmetz et ses collaborateurs (1993)** ont mis en évidence l'activité antifongique de saponosides triterpéniques extraits du lierre sur les levures et les dermatophytes.

L'extrait éthérique d'*O.vulgare* contient des quinones qui sont considérés comme des laxatifs stimulants. D'autres activités antidépressives, anti-protazoaires, antivirales, antibactériennes, fongicides et antiallergiques des feuilles d'origan ont été décrites et plusieurs molécules du groupe ont une toxicité non négligeable (**Bruneton, 1993**) ; (**Hannebelle et al., 2004**).

3. Activité antioxydante

3.1. Test de la réduction du fer FRAP (*Ferric Reducing-Antioxidant Power*)

C'est une méthode de mesure de la capacité des substances de nos extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . C'est une technique rapide, facile et reproductible (**Karagozler et al., 2008**). La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Yang et al., 2008**).

Au cours de notre travail, nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles d'*Origanum vulgare* extrait par trois différentes méthodes à savoir l'infusion, la macération et la décoction en utilisant la méthode de FRAP. Les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. L'acide ascorbique qui est un puissant antioxydant, qui est utilisé comme témoin. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans la **figure N°08**, montrent qu'au niveau de chaque espèce, la réduction du Fe (3+) en Fe (2+) est plus importante au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en extrait

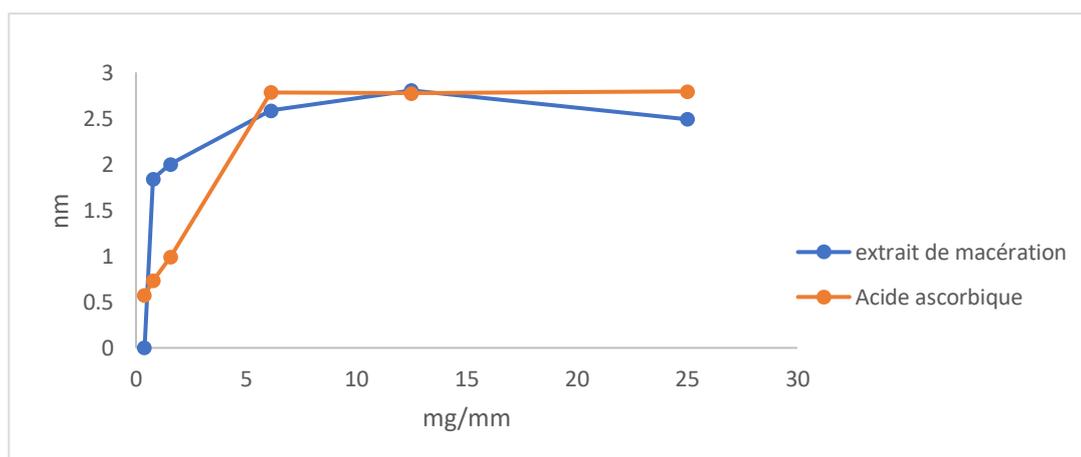
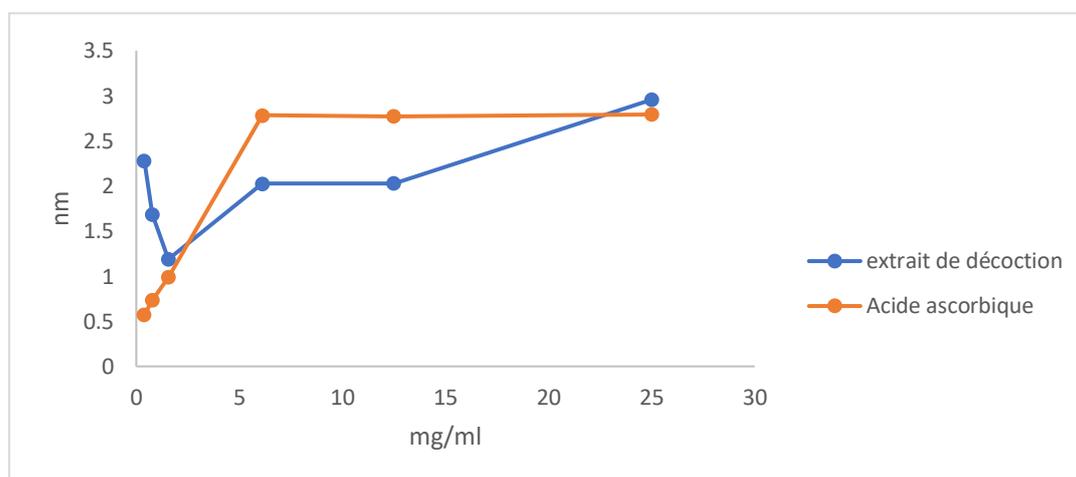
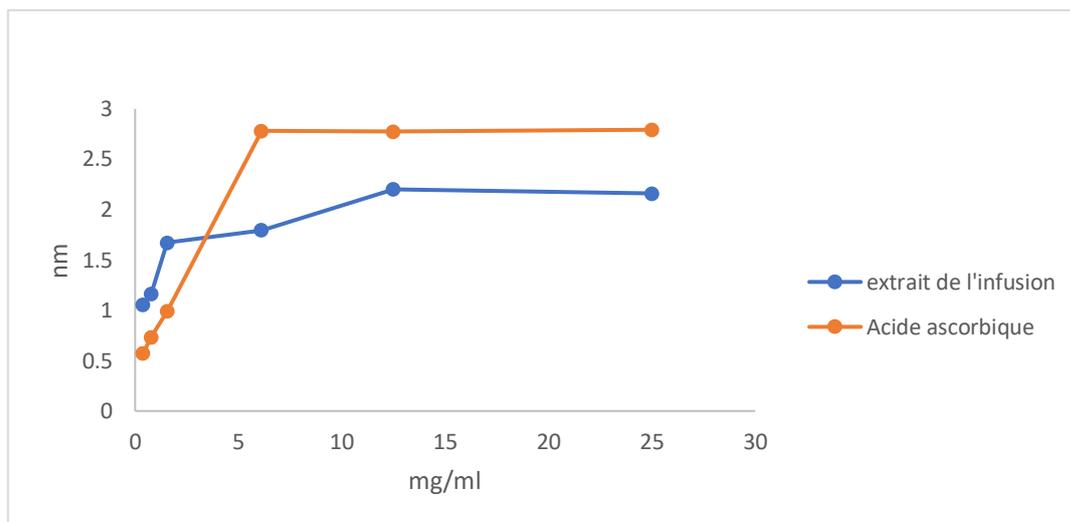


Figure N°08 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'*Origanum vulgare* par la méthode de FRAP comparé avec l'acide ascorbique

D'après les graphes représentés sur **la figure N°08**, nous remarquons que l'extrait obtenu par la technique de décoction présente une capacité à réduire le fer importante qui atteint sa valeur maximale avec un D.O de 2.957 à la concentration de 25 mg/ml suivie de la fraction de l'extrait de macération qui atteint une D.O maximal égale à 2.49 pour la même concentration.

L'extrait de décoction possède une capacité à réduire le fer largement supérieur à celle d'Acide ascorbique (D.O égale à 2.793).

Nous remarquons que l'extrait aqueux préparé sous forme d'infusion a une faible capacité de réduction du fer avec des valeurs de densité optique qui ne dépassent pas la valeur de 2.160 comparée à l'acide ascorbique (2.793) et aux autres extraits testés.

Si on classe nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique à la concentration de 25 mg/ml, on obtiendra l'ordre suivant, décocté >acide ascorbique >macérât > infusé.

De ce classement, nous pouvons déduire que l'activité antioxydante de l'extrait des feuilles d'*Origanum vulgare* obtenu par la méthode de décoction est la plus importante en revanche les deux autres méthodes (macération, infusion) présentent de faibles activités par rapport au décocté. Ce résultat montre en effet, que le pouvoir réducteur des espèces est probablement dû à la méthode d'extraction à utiliser. La présence de métabolites secondaires au niveau des trois extraits étudiés explique leur fort pouvoir thérapeutique. Par conséquent, ces résultats justifient la large utilisation des feuilles d'Origan dans la médecine traditionnelle par la population locale. Effectivement, les tanins, les flavonoïdes, les saponosides et les terpènes possèdent plusieurs propriétés bénéfiques notamment antimicrobiennes, antioxydantes, antiinflammatoires, vasculo-protectrices, antiulcéreuses et anti diabétiques (**Bouhaddouda, 2016**).

L'activité antioxydante des ressources naturels est étudiée sans cesse, et plusieurs plantes aromatiques incluant des espèces d'Origan, ont données des résultats prometteurs (**Laguori et al., 1993**) ; (**Baratta et al., 1998**).

Ce test montre en effet, que le pouvoir réducteur des espèces est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques contenus dans ces extraits qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs désactivant des oxydants. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**) ; (**Kumaran et Karunakaran, 2007**).

3.2. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes (**Laguerre et al., 2007**). Cette activité peut être évaluée vis-à-vis du radical DPPH à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (**Majhenič et al., 2007**).

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des feuilles de la plante *d'Origanum vulgare* par la méthode de DPPH afin de déterminer la fraction la plus active où l'acide ascorbique et utilisés comme molécule de référence.

A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée dans la partie matérielle et méthodes. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées sur **la figure N°09**, qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50) de chaque extrait. Les résultats expérimentaux sont représentés dans les figures ci-dessous

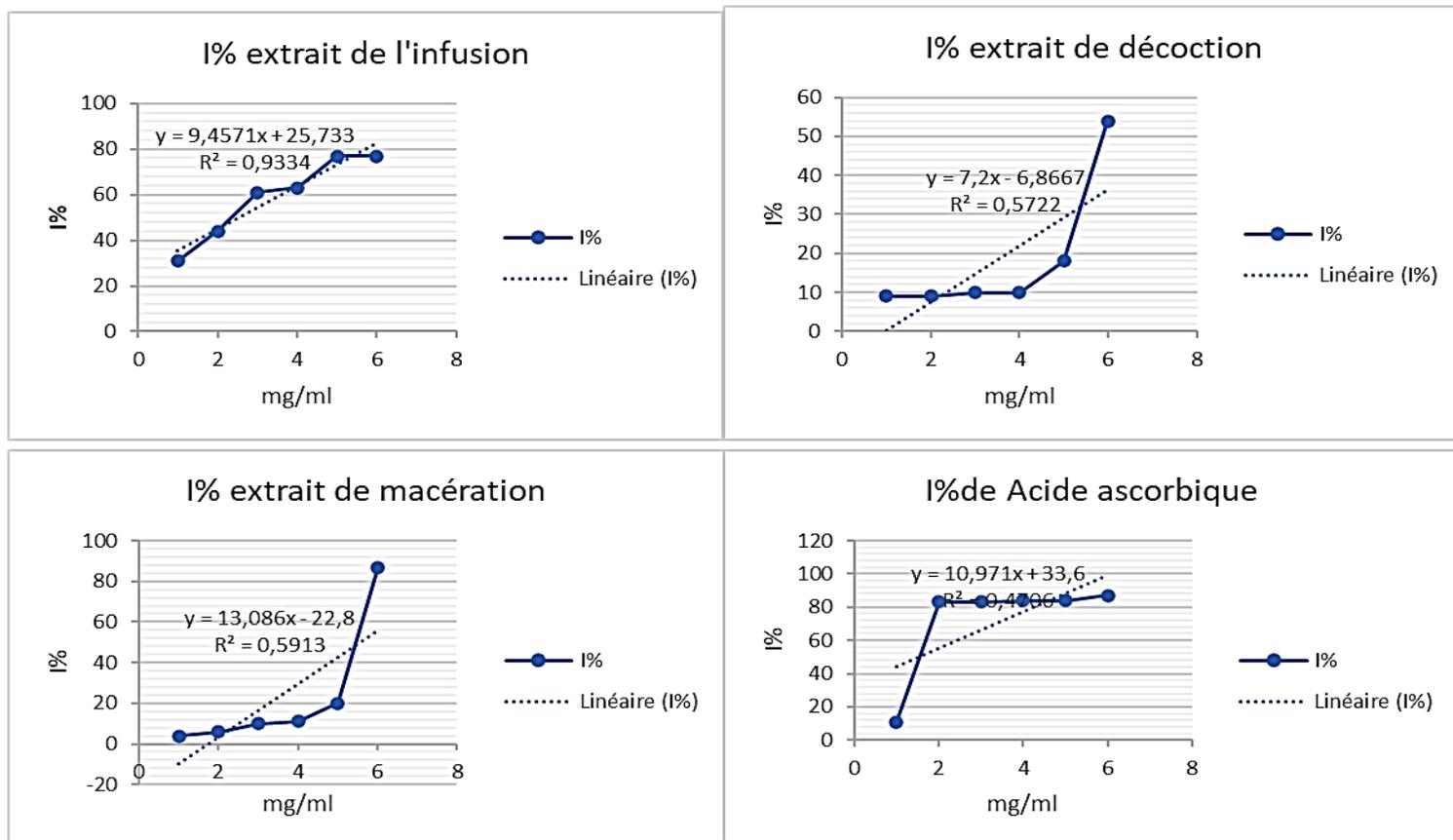


Figure N°08: Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH. en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles d'*Origanum vulgare* et de l'acide ascorbique.

Nous remarquons que l'extrait de l'infusion possède une activité très élevée de piégeage de radicale DPPH pare rapport des graphes qui correspondent à une courbe linéaire avec la présence d'une phase stationnaires qui définit la réduction totale du radical DPPH en sa forme no radicale cet extrait présente de concentration à 25 mg/ml de pourcentage d'inhibition 77%, l'acide ascorbique à 25mg/ml des pourcentage d'inhibition a 87%, a même concentration l'extrait macération produit pourcentage d'inhibition de 87% et extrait de décoction présente plus faible pourcentage d'inhibition de réduction à 54%.

A partir des graphes, nous constatons que l'extrait de l'infusion présente une activité de piégeage plus similaire à celle de l'acide ascorbique cependant l'extrait de macération, décoction une activité moins importante que l'acide ascorbique.

Ces activités pourraient être liées à la richesse des extraits en polyphénols. Car selon **Turkmen et al., (2007)**, les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques devrait être prise en considération dans l'activité biologique (**Bourgou et al., 2008**).

Les valeurs des IC50 trouvées pour tous les extraits testés d'*Origanum vulgare* sont représentées dans le **tableau N°05** sous forme d'histogramme.

Tableau N°05 : Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits d'*Origanum vulgaire* et l'acide ascorbique.

Les extraits	IC50 (mg/ml)
Infusion	2,8338
Macération	66,2175
Décoction	21,9887
Acide ascorbique	0,9687

L'effet scranvenger des extraits vis à vis du radicale DPPH, est exprimé par la concentration d'inhibition à 50%.

D'après les IC50 obtenus, nous constatons que l'acide ascorbique présente l'IC50 la plus faible estimée à 0.9687 mg/ml suivie par l'extrait préparé par infusion avec un IC50 égale à 2.8338 mg/ml et qui montre une activité très importante comparé aux autres extraits. Ces résultats obtenus permettent de classer les extraits par rapport au standard selon leur pouvoir antioxydant selon l'ordre décroissant suivant : acide ascorbique > infusé > macérât > décocté.

Conclusion

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'identification des métabolites secondaires et l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de feuilles de la plante médicinale de l'Ouest Algérien : *Origanum vulgare*.

Cette espèce végétale a présenté des rendements variables en extraits. Le rendement le plus élevé a été enregistré pour l'extrait aqueux obtenu par décoction (39.5%) suivi de l'extrait aqueux sous forme d'infusé (19%).

L'analyse phytochimique a montré que les feuilles d'origan renferment des composés majeurs tels que les tanins, les terpenoïdes, les stérols, les flavonoïdes et les quinones. L'activité antioxydante des différents extraits d'origan a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir : le test de réduction de fer et la méthode de réduction de radical libre DPPH. L'étude des effets antioxydants révèle que l'extrait obtenu par décoction présente une capacité à réduire le fer très importante et qui reste supérieure à celle de l'acide ascorbique avec une DO égale à 2.793 à la concentration de 25mg/ml. Selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH, l'extrait obtenu par la méthode d'infusion a présenté une excellente activité antioxydante par rapport aux deux autres extraits testés avec une IC50 égale à 2.83 mg/mL.

Ces résultats apportent des éléments d'une démarche qui s'inscrit dans le cadre de la recherche et qui nécessite de les approfondir par des essais *in vivo* et d'autres tests cliniques. Cette étude pourrait être complétée par d'autres essais afin de développer des approches appropriées dans le but d'une éventuelle application chez l'homme.

Références bibliographiques

- **Baratta M. T., Dorman H. J. D., Deans S. G., Figueiredo A. C., Barroso J. G., and Ruberto G. (1998).** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flav. Fragr. J.*, 13: 235-244.
- **Baser K.H.C., (1995).** Essential oils from aromatic plants which are used as herbal tea in Turkey. Actes de la 13ème Conférence internationale sur les saveurs, les parfums et les huiles essentielles tenue à Istanbul, Turquie, pp. 200-201
- **Figueredo G.(2007)-** Etude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne., thèse doctorat ., Université Blaise Pascal.
- **Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T (2007)** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of *Slovenian honey*. *Food Chem* 105: 822–828
- **Bouhaddouda N. (2016).** Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare et Mentha pulegium*. Thèse de Doctorat. Annaba: Université d'Annaba
- **Bourgou, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B. (2008).** Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biologies*, 331: 48–55.
- **Bardeau F., (2009).** *La médecine aromatique*. Robert Laffont, Paris. 335p.
- **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
- **Bruneton J., 1999.** - « Pharmacognosie » Plantes médicinales, Éd. Lavoisier, Techniques et documentation, Paris, 405.
- **Catherine.V, et Luc. R, (2005).** Le stress oxydatif Les radicaux libres, des composés à fonction biologique méconnue : à côté de leur action physiopathologique, ce sont des régulateurs avant d'être des destructeurs. *AMC. Pratique* N° 141,P.29, DOI:10.1016/S1261-694X(05)88111-8.
- **Di Meo F, Lemaury V, Cornil J, Lazzaroni R, Duroux J-L, Olivier Y, et al (2013).** *Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus Electron Transfer. J Phys Chem A.*117(10):2082-92.
- **Fabri RL, Nogueira MS, Braga FG, et al. (2009).** *Mitracapus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresour Technol* 100: 428–433.

- **Farnsworth, N. R. (1966).** Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of pharmaceutical sciences*, 55(3), 225–276.
- **Figueredo, G. (2007).** Etude chimique et statistique de la composition d'huile essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, thèse doctorat en chimie organique. Université Blaise Pascal (u.f.r. sciences et technologie) école doctorale des sciences fondamentales n° 525, 2007. p.47-49.
- **Hazzit, M. (2008).** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie, thèse doctorat en chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene .p30.
- **Hennebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F., (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- **Hubert J., Paul F., Daydé J., Berger M. (2006).** Composition variability in soy-derived dietary supplements designated for menopausal symptom prevention. *O.C.L.*, 13(4):in press.
- **Ietswaart, J. H., A. (1980).** Taxonomic Révision of the Genus *Origanum* (Labiatae). Leiden University Press (Leiden Botanical Series, vol. 4). The Hague/Boston/London, . Price : Hfl60, O.P.148-149
- **Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52 : 3389-3393
- **Karagözler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.G., Uygum, D.A. (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400-407
- **Krimat S., Metidji H., C.Tigrine, D.Dahmane, A.Nouasri, T.Dob, (2017).** Analyse chimique, activités antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique d'extrait hydrométhanolique d'*Origanum vulgare*, Lavoisier SAS, DOI 10.1007/s 1028-017-1134-z, .p.1.
- **Kumaran A, Karunakaran RJ. (2007).** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 40: 344-352.
- **Kylli, P. (2010).** *Berry phenolics : Isolation, analysis, identification, and antioxidant properties.*

- **Lagouri V., Blekas M.; Simidou T., Kokkini S. and Boskou D. (1993).** Composition and antioxydant activity of essential oils from oregano plants grown wild in Greece. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, (197), 20-23
- **Laguerre M., Leconte J., Villeneuve P., (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid. Res.* 46(5):244-82
- **Machu A. (2009).** *Origan vulgaire. Ed. Faculté libre des sciences et technologies. p: 6.*
- **Mahfouf. N, (2018).** étude de de l'espèce *Origanum vulgare* L., thèse doctorat en biologie, université chadli benjedid – el tarf, p8.p22.
- **Majhenic L., Kerget M.S., Knez Z., (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry.* 104: 1258–1268.
- **Marxen K, Vanselow KH, Lippermeir S, et al. (2007).** Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors* 7: 2080–2095
- **Mezyani.H, (2015).** Etude d'activité antioxydant des huiles essentielle de *Mentha aquatica* et *Origanum vulgare* seules et en association mémoire master en science biologique Université A. MIRA – Bejaia, P.11.P.13
- **Mohammedi Z. (2006).** Etude du pouvoirs Antimicrobien et Antioxydant des huiles essentielles et Flavanoïdes de quelques plantes de la region de Tlemcen. Thèse pour l'obtention du diplôme de magistère en biologie. Université Abon Bakr Belkaid Tlemcen. p : 155.
- **Müller-Lissner S.A., (1993).** Adverse effects of laxatives: fact and fiction, *Pharmacology*, vol. 47 Suppl 1, p 138-45
- **Nadji et al., (2019).** Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique des huiles essentielles à partir de *Cymbopogon schoenanthus* dans la region de ghardaïa
- **Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001).** Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J Agric Food Chem.* 49(10):4619-26.
- **OYAIZU M., (1986).** Studies on product of browning reaction from glucose amine. 44: 307-315.

- **Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., Codina, C. (2003).** Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73, 1667-1681 .
- **Pasquier, C. (1995).** stress oxydatif et inflammation, revue française des laboratoires, juin 1995, N°276.P.87, [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(95\)80364-5](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(95)80364-5)*
- **Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, et al (2003).** *Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nutr. 133(9):2812-9.*
- **Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Sci Food Agr* 76: 270
- **Scherer R, Goboy HT (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem* 112: 654–658.
- **Sood, A., & Gupta, M. (2015).** Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience*, 12, 100–106.
- **Steinmetz M.D., Elias R., Maillard C., Boudon G., Réglé P., Balansard G. et Ghastin C., (1993).** Recherche d'une activité antitumorale de saponosides triterpéniques. 2ème colloque Européen d'ethnopharmacologie et 11ème conférence internationale d'ethnomédecine. Heidelberg, 24-27. *Médicaments et Aliments : L'Approche Ethnopharmacologique*, 331-332.
- **Toubal O., Djahoudi A., HENCHIRI C. et Bouazza M., (2012).** Phytochemical Screening and Antimicrobial Evaluation of the Aqueous Extracts of *Ammoides verticillata*, an Endemic Species. *Journal of Life Sciences*, 6, 243-247.
- **Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F., Polat G., (2007).** Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*. 12: 484-496.
- **Wissam, Z., Ghada, B., Wassim, A., & Warid, K. (2012).** Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(Suppl 3), 675–682.
- **Yang, J., Guo, J., Yuan, J. (2008).** In vitro antioxidant properties of rutin, *LWT*, 41, 1060-1066.