

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOBIOCHIMIE MICROBIOLOGIE



THESE de DOCTORAT

En Sciences Biologiques Option: Microbiologie

Activités Biologiques, d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et d' *Origanum majorana*

Présentée par : AICHE – IRATNI Ghenima

Membres du Jury:

Pr. DJENANE Djamel : Président (Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou)

Dr. IRATNI Rabah : Directeur de thèse (United Arab Emirates University, UAE)

Pr. HOUALI Karim : Co-Directeur de thèse (Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou)

Pr. NABTI El Hafidh : Examineur (Université Abderrahmane Mira de Béjaia)

Pr. RIBA Amar : Examineur (Université M'hamed Bougara de Boumerdes)

Dr. OUELHADJ Akli : Examineur (Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou)

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, le Docteur IRATNI Rabah, qui m'a guidé dans la rédaction de ce manuscrit. Je le remercie vivement de m'avoir reçu dans son laboratoire et fait profiter de ses connaissances de culture cellulaire.

Mes remerciements vont également à mon co-directeur de thèse le Professeur HOUALI Karim. Je le remercie vivement de m'avoir poussée quand je n'y croyais plus et m'avoir fait confiance. Je tiens également à le remercier pour sa disponibilité malgré ces responsabilités administratives. Je tiens également à le remercier pour avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement l'ensemble du jury qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

- Monsieur DJENANE Djamel, Professeur à l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou d'avoir accepté de présider le jury.

- Monsieur NABTI El Hafidh, Professeur à l'université Abderrahmane MIRA de Béjaia d'avoir accepté d'examiner ce travail.

- Monsieur RIBA Amar, Professeur à l'université M'hamed BOUGARA de Boumerdes d'avoir accepté d'examiner ce travail.

- Monsieur OULHADJ Akli, Maître de Conférences A à l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma pensée va vers Fadhila BELKHEIR qui n'est plus de ce monde, que dieu ait son âme. Je la remercie pour sa contribution dans la traduction de la publication.

Je tiens à remercier vivement Nadia AMMAR-KHOUDJA pour son amitié et son aide précieuse. Je suis particulièrement reconnaissant à son égard pour son soutien permanent.

Mes remerciements chaleureux vont également à l'équipe du laboratoire de Monsieur HOUALI, Nacima MEGUENNI, Najet MESTAR-GUECHAOUI, Souad LAHCENE et Idir MOUALEK. Je les remercie pour leur amitié et leurs encouragements. Je les remercie vivement pour tous les moments agréables partagés ensemble. Je sais que je peux compter sur eux à tout moment.

Je tiens également à remercier Malika BENAMAR-MANSOUR pour toutes les critiques fructueuses apportées par la lecture de ce manuscrit. Je la remercie vivement pour tous les conseils qui m'ont beaucoup orientée.

Je tiens à remercier Malika BOUDIAF NAIT- KACI et Djamila ISSAOUN pour l'aide précieuse dans les analyses statistiques.

Je tiens à remercier particulièrement ma petite famille pour les efforts quotidiens de ces très longues années. Je les remercie particulièrement pour leur compréhension et leur patience.

Pour finir je tiens à dédier ce travail à ma très chère mère YEMMA Aldjia.

Résumé

Pistacia lentiscus L. et *Origanum majorana* L. sont deux plantes d'intérêt médicinal. Elles renferment des composés phytochimiques présentant des cibles moléculaires précises pouvant atteindre différents processus physiologiques.

L'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* a révélé une capacité antioxydante très intéressante. Il présente une capacité de piégeage du radical DPPH avec un IC₅₀ évalué à $9,89 \pm 0,37$ µg/ml, une capacité de chélation du fer avec un IC₅₀ de $54,06 \pm 12,16$ µg/ml, une capacité de piéger le peroxyde d'hydrogène atteignant $82,08 \pm 6,13\%$ pour une concentration de 700µg/ml et une capacité de réduction des ions molybdate estimée à 1,6 mg EAA/mg de matière sèche végétale. L'extrait végétal a présenté un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire face à un stress osmotique, un stress oxydant induit par l'acide hypochloreux et en présence de concentrations hémolytiques de saponine. L'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* a présenté un effet antibactérien modéré vis-à-vis des souches de références à savoir : *Escherichia coli* ATCC25 922, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352.

L'extrait éthanolique de feuilles d'*O. majorana* a présenté des effets anti prolifératifs sur les cellules du cancer humain du sein et du cancer humain du poumon. Il présente une diminution de la viabilité des cellules du cancer du sein humain pour des concentrations variant de 50 à 600µg/ml. Il présente également une activité des caspases 3/7 pour des concentrations de 450 et 600 µg/ml. Nous avons également observé une inhibition de prolifération des cellules cancéreuses par un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M ainsi qu'un effet inhibiteur du potentiel migratoire des cellules A549.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons dire que l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* et d'*O. majorana* présentent des activités anti oxydantes, anti hémolytiques anti prolifératives intéressantes, de ce fait, peuvent présenter une alternative dans le traitement de certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer.

Mots clé : Antioxydant, Anti cancer, antibactérien, érythrocyte, *Pistacia lentiscus* L., *Origanum majorana* L.

Summary

Pistacia lentiscus L. and *Origanum majorana* L. are two plants of medicinal value. They contain phytochemicals with specific molecular targets involved in different physiological processes. The leaf extract of *P. lentiscus* has revealed an interesting antioxidant capacity. It presents a trapping capacity of DPPH radical with an IC₅₀ estimated at 9.89 ± 0.37 µg/ml, a chelating ability of iron with IC₅₀ of 54.06 ± 12.66 µg/ml, an ability to trap peroxide hydrogen up to $82.08 \pm 6.13\%$ at a concentration of 700µg/ml and a capacity to reduce molybdate ions estimated at 1.6 mg EAA/mg plant dry matter. The plant extract was also able to stabilize erythrocyte's membrane against osmotic, oxidative stress induced by hypochlorous acid in the presence of concentrations of hemolytic saponin. Also, leaf extract of *P. lentiscus* exhibited a moderate antibacterial effect against reference strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus cereus* ATCC10 876 *Citrobacter freundii* ATCC8 090 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352.

On the other hand, the ethanolic extract of *O. majorana* leaves markedly and significantly reduced the viability of human breast and lung cancer cell lines at concentrations ranging between 50 and 600 µg/ml. A concentrations of 450 and 600 µg/ml of *O. majorana* induced apoptotic cell death revealed the activation of the executioner caspases 3/7. Furthermore, *O. majorana* L. extract induced a cell cycle arrest at G2 phase of the cell cycle. Finally, the extract also inhibited the migration capacity of the invasive lung cancer A549 cells.

Based on these results, we can state that leaf extract of *Pistacia lentiscus* and *O. majorana* L. possesses an antioxidant, hemolytic and antiproliferative effect and therefore shows promises as an alternative in the treatment of certain diseases such as cardiovascular disease and cancer.

Key words: Antioxidant, antibacterial, anti cancer, erythrocytes, *Pistacia lentiscus* L., *Origanum majorana* L.

ABREVIATIONS

AFR : Ascorbate Free Radical

AP-1 : Activator Protein 1

ASC : Ascorbic acid

ATTC: American Type Culture Collection

BAX B: Cell lymphoma-Associated X

CAT: Catalase

CDK: Cyclin Dependant Kinases

COX: Cyclooxygenase

DD : Death Domain

DED: Death Effector Domain

DHA: Dehydro Ascorbic Acid

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxide

DPPH: 2, 2-Diphenyl 1 -picrylhydrazyl

ENO: Endothelial Nitric oxide synthase

ERS : Estrogen Receptors

FGF: Fibroblast growth factor

HIF-1 α : Hypoxia-Induced Factor 1 α

IL-12 : Interleukin 12

JNK c: Jun N-Terminal kinase

LOX : Lipoxygenases

MMP: Matrix metalloproteinase

NF κ B: Nuclear Factor κ B

OxLDL: Oxidized low-density lipoprotein

PAF: Platelet Activating Factor

PDE: Phosphodiesterase

PGD₂: Prostaglandin D₂

PMRS: Plasma Membrane Redox System

RPMI: Roswell Parck Memorial and Institute

STAT: Signal Transducer and Activator Transcription

STAT-1: Signal transducer and activator of transcription

TIMP-2: Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2

TXA₂: Thromboxane A₂

VCAM: Vascular cell adhesion molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

XO : Xanthine oxydase

Sommaire

	Page
Introduction	01
1. <i>Pistacia lentiscus</i> L	02
1.1 Description botanique	03
1.2. Position systématique	04
1.3. Propriétés et usage thérapeutique de <i>Pistacia Lentiscus</i> L	05
1.4. Principaux composants phytochimiques isolés à partir de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	05
2. <i>Origanum majorana</i> L.	05
2.1. Description botanique	05
2.2. Propriétés et usages thérapeutiques	06
3. Métabolites secondaires	07
3.1. Classification	08
3.2. Activités biologiques	11
3.2.1 Activité anticancéreuse	12
3.2.2. Activité antioxydante	15
3.2.3. Activité anti hémolytique	18
3.2.4. Activité antibactérienne	22
3.2. Autres activités	24
Matériel et méthodes	27
1. Matériel	27
1.1 Matériel biologique	27
2. Méthodes	28

2. 1. Préparation de l'extrait sec aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	28
2.2. Préparation de l'extrait éthanolique d' <i>Origanum majorana</i> L.	29
2.3. Dosage des polyphénols totaux	29
2.4. Activités biologiques	30
Résultats et discussion	40
1. Taux de polyphénols totaux présent dans l'extrait aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L	40
2. Activité antioxydante de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	42
2.1. Capacité de piégeage des radicaux libres	43
2.2. Capacité réductrice	46
3. Effet protecteur de l'extrait aqueux vis-à-vis de la cellule érythrocytaire	49
3.1. Innocuité de l'extrait vis-à-vis de la cellule érythrocytaire	49
3.2. Effet protecteur de l'extrait aqueux face à un stress osmotique	50
3.3. Effet protecteur de l'extrait face à un stress oxydant	54
4. Effet antibactérien de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	60
5. Analyse de l'effet anti cancer de l'extrait éthanolique d' <i>Origanum majorana</i> L.	63
5.1. L'extrait éthanolique d' <i>Origanum majorana</i> L. inhibe la prolifération de cellules du cancer du sein et du poumon	63
5.2. <i>Origanum majorana</i> L. induit la mort cellulaire par activation de la voie apoptotique	67
5.3. <i>Origanum majorana</i> L. induit un blocage G2/M du cycle cellulaire dans les cellules du cancer du poumon A549	68
5.4. L'extrait éthanolique d' <i>Origanum majorana</i> L. inhibe le potentiel migratoire des cellules de cancer de poumon 549	70
Conclusion	92

Annexes

Publication 1

Publication 2

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Aspect botanique des différentes parties aériennes de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	3
2	Diagramme phylogénique du genre <i>Pistacia</i>	4
3	Différentes parties aérienne d' <i>Origanum majorana</i> L.	6
4	Structure de base des différentes classes de polyphénols	9
5	Principaux mécanismes moléculaires et effets cellulaires des composés phytochimiques	11
6	Voies de signalisation de l'apoptose	12
7	Mécanismes impliqués dans l'activité anticancéreuse du resveratrol	13
8	Mécanisme d'action du curcumin sur les différents stades de développement du cancer	13
9	Propriétés structurales et activité antioxydante de quelques flavonoïdes	15
10	Principaux complexes membranaires érythrocytaires de lutte pour le maintien de la balance oxydative	19
11	Action du resveratrol et de la quercitrine sur le complexe PMRS	19
12	Interaction de flavonoïde avec les phospholipides membranaires	20
13	Mécanisme du carvacrol sur la membrane cytoplasmique	22
14	Mécanisme réactionnel intervenant entre le radical DPPH et un antioxydant (AH)	29
15	Proportion des différentes fractions de polyphénol	37
16	Capacité de piégeage du radical DPPH et du peroxyde d'hydrogène en fonction de la concentration de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	40
17	Comparaison de la capacité de piégeage du radical DPPH par l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. et celle de l'acide ascorbique	41
18	Comparaison de la capacité de piégeage du radical peroxyde d'hydrogène par l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. et l'acide ascorbique	42
19	Capacité de réduction du molybdène et du fer en fonction de la concentration de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	43

20	Evolution de la réduction du fer et du molybdène par l'extrait végétal et l'acide ascorbique	45
21	Fragilité osmotique en absence et en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	48
22	Représentation graphique de l'équation de Boltzmann	49
23	Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de l'acide Hypochloreux	52
24	Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de l'acide hypochloreux en présence et en absence de différentes concentration de l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	53
25	Pourcentage d'hémolyse en présence de différentes concentrations de Saponine	55
26	Pourcentage d'hémolyse lié à la présence de saponine en absence et en présence de l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	56
27	Effet des différentes concentrations de l'extrait de feuilles d' <i>Origanum Majorana</i> L. sur la viabilité des cellules du cancer humain du sein et du poumon	60
28	Observations au microscope optique de l'extrait de feuilles d'O. majorana sur la morphologie des cellules du poumon et du sein	62
29	Activité des caspases 3 /7 en fonction du temps au contact de différentes concentrations de l'extrait de feuilles d' <i>Origanum majorana</i> L.	63
30	Pourcentage de cellules A549 aux différents stades du cycle cellulaire en présence de différentes concentrations de l'extrait de feuilles d' <i>Origanum majorana</i> L.	64
31	Test de migration cellulaire	65

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Analyse comparative des teneurs en polyphénols totaux de l'extrait aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	38
2	Principales propriétés antioxydante de l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. et de l'acide ascorbique	46
3	Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	47
4	Différents paramètres H, H50 et Ds en présence et en absence de l'extrait de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	50
5	Diamètres des zones d'inhibition	57
6	Concentrations minimales inhibitrices	58

Introduction

Les extraits naturels de plantes contiennent des substances actives auxquelles on attribue de nombreux effets biologiques. Et aujourd'hui, l'efficacité de la médecine par les plantes est reconnue et démontrée scientifiquement (MOHD NOR *et al.*, 2016). Les plantes produisent de nombreux métabolites secondaires avec une diversité remarquable qui constitue une richesse à exploiter. A cause des effets indésirables des médicaments de synthèse, un grand nombre de scientifiques s'intéressent à la mise en évidence des rôles précis de ces métabolites secondaires dans différents mécanismes cellulaires, tels que le maintien de l'équilibre de la balance oxydative, le maintien de l'intégrité membranaire et dans la prolifération cellulaire.

Le stress oxydant est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Il est démontré que cette situation est potentiellement impliquée dans de nombreuses pathologies ou associés à des complications. Pour échapper à ce stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre de la balance oxydant/antioxydant. Les substances naturelles d'origine végétale, notamment les polyphénols, grâce à des mécanismes bien établis, sont doués d'activité antioxydante et présentent un intérêt sans équivoque (CHALOPIN *et al.*, 2014).

L'apoptose est un processus génétiquement programmé aboutissant à la destruction d'une cellule. Une défectuosité de ce processus représente l'une des causes majeures du développement d'un cancer. Les agents chimio- thérapeutiques présentent de nombreux inconvénients. En effet, ils sont très toxiques pour une large gamme de cellules normales et sont souvent associés à des effets indésirables en plus du fait que de nombreuses cellules cancéreuses finissent par développer une résistance à ce type de traitement. Par conséquent, les produits d'origine végétale ont émergés comme une alternative. Ces composés sont mis en évidence pour leur rôle pro-apoptotique et antiprolifératif sur les cellules cancéreuses ainsi que leur action sur les différentes phases de la division cellulaire (KIM *et al.*, 2016).

Les molécules phytochimiques ont également un rôle dans le maintien de l'intégrité

membranaire. Cette intégrité membranaire est une propriété fondamentale pour la plus part des cellules, plus particulièrement pour la cellule érythrocytaire. Le globule rouge est l'unique transporteur de l'O₂ et du CO₂, il est caractérisé par la résistance et la déformabilité membranaire. Ces propriétés sont assurées par des mécanismes membranaires très élaborés. Un grand nombre de travaux ont mis en évidence le rôle de composés phytochimiques dans le traitement de maladies hémolytiques. Des mécanismes d'action de ces composés dans le maintien de l'intégrité membranaire érythrocytaire ont été proposés (PAZZINI *et al.*, 2015).

Enfin, l'émergence de bactéries multi résistantes, suite à l'utilisation abusive des antibiotiques, a poussé les chercheurs à trouver de nouvelles molécules alternatives d'origine naturelles lesquelles ont démontré leur aptitude à inhiber la croissance bactérienne (DZOTAM *et al.*, 2016).

Objectifs du travail :

P. lentiscus et *O. majorana* sont deux plantes d'intérêts médicinales. Le choix de ces deux plantes est largement justifié par leur usage traditionnel local ainsi que par le grand intérêt porté par des travaux de recherches rapportés par la littérature. Deux aspects principaux ressortent dans notre travail :

- La détermination des activités biologiques des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et *O. majorana* ; à savoir l'activité anti-oxydante, anticancéreuse et antibactérienne.
- La détermination du pouvoir protecteur des extraits de feuilles de *P. lentiscus* vis-à-vis de différents stress, à savoir le stress oxydatif, le stress osmotique et le stress induisant la déstabilisation de la structure membranaire. Pour cela nous avons choisi le globule rouge comme model cellulaire.

1. *Pistacia lentiscus* L.

Pistacia lentiscus est un arbuste qui appartient à la famille des Anacardiaceae, sclérophylle et sempervirent. Il est très largement représenté dans le pourtour méditerranéen. Cette espèce est très connue et employée par la population locale pour ses nombreuses vertus thérapeutiques notamment antiulcéreuses, anti-inflammatoires et antibactériennes.

La région montagneuse de Kabylie est une région aux conditions climatiques très variables. Ces facteurs sont favorables au développement d'une végétation adaptée à la sécheresse et à un déficit hydrique. L'une de ces espèces végétale est *P. lentiscus*, considérée comme l'une des plus tolérantes aussi bien à la sécheresse qu'à la salinité. Il est très adapté à la sécheresse dans tous les types de sol. Le terme *Pistacia* est issu du grec pistaké qui signifie arbre à résine et *lentiscus* vient du latin *lentus* qui veut dire visqueux (OZTURK *et al.*, 2010).

1.1 Description botanique

P. lentiscus se présente sous forme d'arbrisseau pouvant atteindre 3m, parfois arbuste ne dépassant pas 6m. Le genre *Pistacia* possède une aire de distribution tropicale ou subtropicale. Il compte quatre régions phylogéographiques : méditerranéenne, urotouranienne, sino-japonaise et mexicaine. On le retrouve dans des climats subhumides et arides (YI *et al.*, 2008).

Les feuilles de *P. lentiscus* sont typiques aux xérophytes. Elles sont caractérisées par des feuilles persistantes paripennées à 4-10 folioles elliptiques. Elles sont coriaces et luisantes et le pétiole est nettement ailé. Le système racinaire est à croissance rapide et très pivotant. L'appareil reproducteur est représenté par des fleurs apétales mâles et femelles poussant sur des arbustes différents. Le caractère dioïque et la présence de fleurs nues, fait de *Pistacia* un genre particulier de sa famille. Les fleurs mâles se présentent avec 5 sépales

et 5 étamines et les fleurs femelles avec 3 ou 4 sépales entourant l'ovaire. La floraison se fait en avril et mai. Les fleurs brunâtres constituent de denses drupes spiciformes qui sont, à l'origine rouges puis noires à maturité (AL-SAGHIR et PORTER, 2012). La figure 1 illustre l'aspect botanique des différentes parties aériennes de *P. lentiscus*.



Fleurs femelles

Fleurs males

Fruits immatures

Figure 1 : Aspect botanique des différentes parties aériennes de *Pistacia lentiscus* L.

1.2. Position systématique

Actuellement l'étude taxonomique la plus complète est celle de Zohary. Ce genre est réparti en quatre sections et définit onze espèces. L'évolution de la phylogénie du genre *Pistacia* montre qu'il est monophylétique et dérive de deux sections *Pistacia* et *Lentiscell* (AL-SAGHIR, 2010). Le diagramme suivant représente la phylogénie du genre *Pistacia*. Le genre *Pistacia* est représenté en Algérie par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus* L., *Pistacia therebinthus* L., *Pistacia verra* L. et *Pistacia atlantica* L.

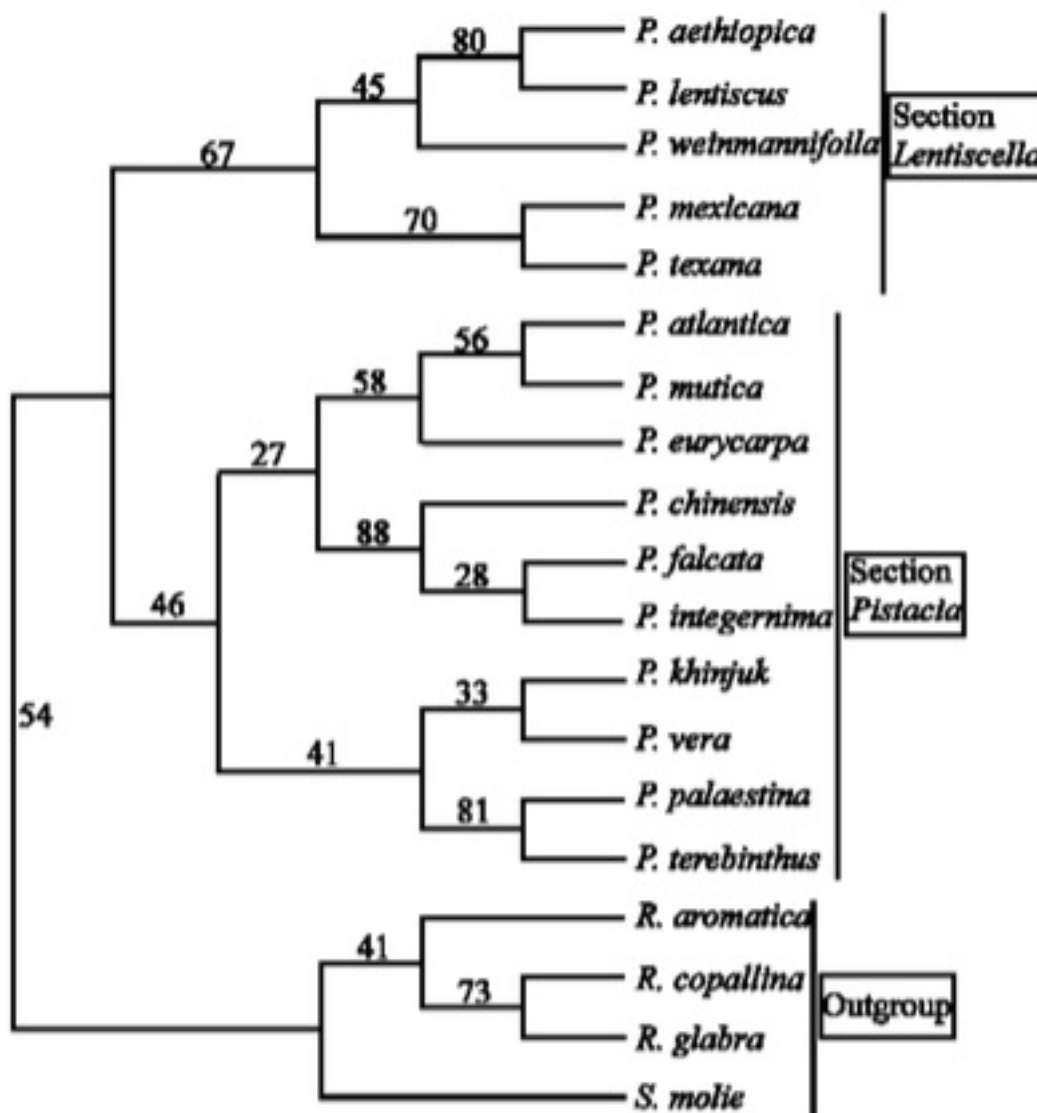


Figure 2 : Diagramme phylogénique du genre *Pistacia* (AL-SAGHIR, 2010).

1.3 Propriétés et usage thérapeutique de *Pistacia Lentiscus* L.

P. lentiscus fait partie de la pharmacopée traditionnelle locale. Son usage dans la médecine populaire est largement justifié par son potentiel antioxydant, antimicrobien et anti-inflammatoire (BENHAMMOU *et al.*, 2008). Un grand nombre d'études ethnobotaniques rapportent l'utilisation traditionnelle des feuilles de *P. lentiscus* L. par voie orale sous forme de décoction dans le traitement d'un grand nombre de pathologies telles que les troubles gastro-intestinaux, hépatique et inflammatoires (JANAKAT et AL-MERIE 2002 ; AZAIZEH *et al.*, 2008 ; BOZORGI *et al.*, 2013).

1.4. Principaux composants phytochimiques isolés à partir de *Pistacia lentiscus* L.

Les composés phytochimiques (métabolites secondaires) du pistachier peuvent être extraits à partir de différentes parties de l'arbre. Par hydrodistillation des feuilles, de l'huile essentielle peut être extraite. Une analyse par spectroscopie de masse révèle plus d'une centaine de composés représentés majoritairement par le myrcène, le limonène et le β gurjunène. En outre, l'huile essentielle provenant des fruits est caractérisée par une forte proportion d' α -pinène, de limonène et de terpinéol. A partir du tronc du pistachier exsude un mastic appelé gum. Cette partie de la plante est la plus étudiée. Elle renferme un très grand nombre de composés bioactifs d'intérêt médical et pharmacologique. L'huile essentielle provenant du mastic a également été étudiée. Son analyse a mis en évidence la présence de composés biologiquement actifs tels que l' α -terpinéol. Parmi les composés majoritaires identifiés nous pouvons citer : α et β pinène, β myrcine et le camphène (DJENANE *et al.*, 2011 ; ARAB *et al.*, 2014).

2. *Origanum majorana* L.

2.1. Description botanique

Origanum majorana L., aussi connue sous le nom de Marjolaine ou Origan des jardins, est une herbacée qui appartient à la famille des Lamiacées ne dépassant pas 80 cm de haut.

C'est une plante d'une grande importance culinaire et médicinale du fait de l'élaboration d'essences aromatiques localisées dans les poils sécréteurs. Les espèces du genre *Origanum* sont originaires des régions tempérées s'étendant de l'Eurasie à la région méditerranéenne. Ils s'étendent jusqu'aux régions sibériennes et irano-turques. Ils poussent sur des sols calcaires et rocaillieux. La plante est caractérisée par la présence de nombreux rameaux qui portent des feuilles opposées et des fleurs de petite taille groupée en amas serrés à l'aisselle des feuilles. La figure suivante illustre les parties aériennes d'O. majorana.



Figure 3 : Différentes parties aériennes d'*Origanum majorana* L.

2.2. Propriétés et usages thérapeutiques

O. majorana est une plante très populaire utilisée dans notre région. Elle possède des applications très vastes tant dans le domaine alimentaire que celui de la médecine. Traditionnellement, les feuilles sont utilisées par voie orale (en tisane ou mastication) dans le traitement symptomatique de diverses pathologies telles que les troubles digestifs et les troubles respiratoires. En effet, les feuilles de cette plante possèdent un effet antalgique par son action sur les récepteurs acide gamma-aminobutyrique (GABA) (KHAKI *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont montré que *O. majorana* L. est riche en composés phénoliques. De ce fait, cette plante possède une capacité de chélation de radicaux libres élevée et par conséquent une activité anti-oxydante importante (MIRON *et al.*, 2011). Il a été montré que *O. majorana* contient des terpenoïdes représentés par le 4-ol terpènes et le γ terpinène (EL-AKHAL *et al.*, 2014).

Outre son activité antioxydante, *O. majorana* a démontré une activité antimicrobienne importante (BUSATTA *et al.*, 2008). D'autres études ont révélé que les extraits aqueux ainsi que les huiles essentielles de cette plante protègeraient contre les dommages causés au rein et au foie par l'acétate de plomb (EL-ASHMAWY, 2014). Une étude menée par AL-HARBI (2011) a montré que l'extrait d'*O. majorana* réduit l'effet secondaire du cyclophosphamide, composé anticancéreux, sans pour autant altérer son effet cytotoxique.

3. Métabolites secondaires

On désigne par métabolites secondaires toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement au processus de base de la cellule (nutrition, croissance et reproduction). Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Outre la très grande diversité chimique qu'elles représentent, ces molécules se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux (si on exclut la lignine). Elles se retrouvent normalement, dans des tissus ou organes particuliers ou à un stade de développement précis. A titre d'exemple, la teneur en morphine de la capsule du jeune pavot est de moins de 2%, mais atteint 25% dans le latex qui est exsudé lorsque la capsule est blessée (HOPKINS, 2003).

Selon les conditions environnementales, le développement végétal est en équilibre entre la croissance, favorisant le métabolisme primaire, et la différenciation qui favorise la synthèse des métabolites secondaires. D'une manière générale, les stress environnementaux provoquent des cascades réactionnelles conduisant à la transcription des gènes de facteurs de transcription qui génèrent la synthèse de protéines spécifiques qui activent à leur tour la transcription d'autres familles de gènes codant pour des enzymes impliqués directement dans la synthèse des métabolites secondaires (JOËT *et al.*, 2012).

Du point de vue structural, les métabolites secondaires ont des structures très diversifiées. Ils sont majoritairement de taille et de masse faible comparée aux métabolites primaires. Ils sont à l'origine de l'odeur et de la pigmentation du végétal. A nos jours, plus de 45 000 structures différentes ont été isolées. Ils exercent une action déterminante sur l'adaptation. Ils participent à la tolérance à des stress variés et jouent donc un rôle essentiel dans les relations entre les plantes et leur environnement (RAMIREZ-ESTRADA *et al.*, 2016).

Des études se sont intéressées aux paramètres qui influencent la biosynthèse des métabolites secondaires. Cette synthèse répond aux stimuli de l'environnement. Ainsi, une variation d'éclairage induit une diminution de la synthèse des anthocyanes alors qu'une exposition aux rayons UV induit une stimulation et une accumulation de la quercitine.

Le rôle des métabolites secondaires est également mis en évidence dans l'adaptation des végétaux. Ils sont impliqués dans le phénomène d'allélopathie. Ce phénomène se définit comme un effet positif ou négatif, direct ou indirect d'une plante sur une autre par le biais des composés libérés dans l'environnement. Leur synthèse est également liée aux différents stades du développement (FRIEDJUNG *et al.*, 2013).

3.1. Classification

Les métabolites secondaires constituent une remarquable diversité structurale dotée d'un large potentiel pharmacologique. La majorité de ces derniers existent dans la plante saine sous leur forme biologiquement active. Cependant, certains se trouvent sous forme inactive et ne sont activés qu'en réponse à une lésion tissulaire ou une attaque microbienne. Les principaux groupes de métabolites secondaires rencontrés dans les plantes et qui possèdent généralement une activité biologique sont : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes.

3.1.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzène, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une fonction ester, éther ou hétéroside. Ils ont tous un précurseur commun l'acide schikimique (BRUNETON, 1999). Les polyphénols interviennent dans la physiologie, dans les mécanismes de défense et dans la pigmentation de la plante. Plus de 8000 structures différentes ont été répertoriées, dont certaines sont ubiquitaires à toutes les plantes, alors que d'autres peuvent être spécifiques à des espèces en particulier. Au niveau cellulaire, les composés phénoliques sont répartis dans la vacuole et au niveau de la

paroi. Au niveau tissulaire, leur localisation est liée à leur rôle. Les anthocyanes, par exemple, sont répartis au niveau de l'épiderme des feuilles. Les polyphénols peuvent être classés sur la base d'éléments structuraux en quatre principales classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbène et les lignanes (BRUNETON, 1999). La structure de base des différentes classes de polyphénols est représentée dans la structure suivante.

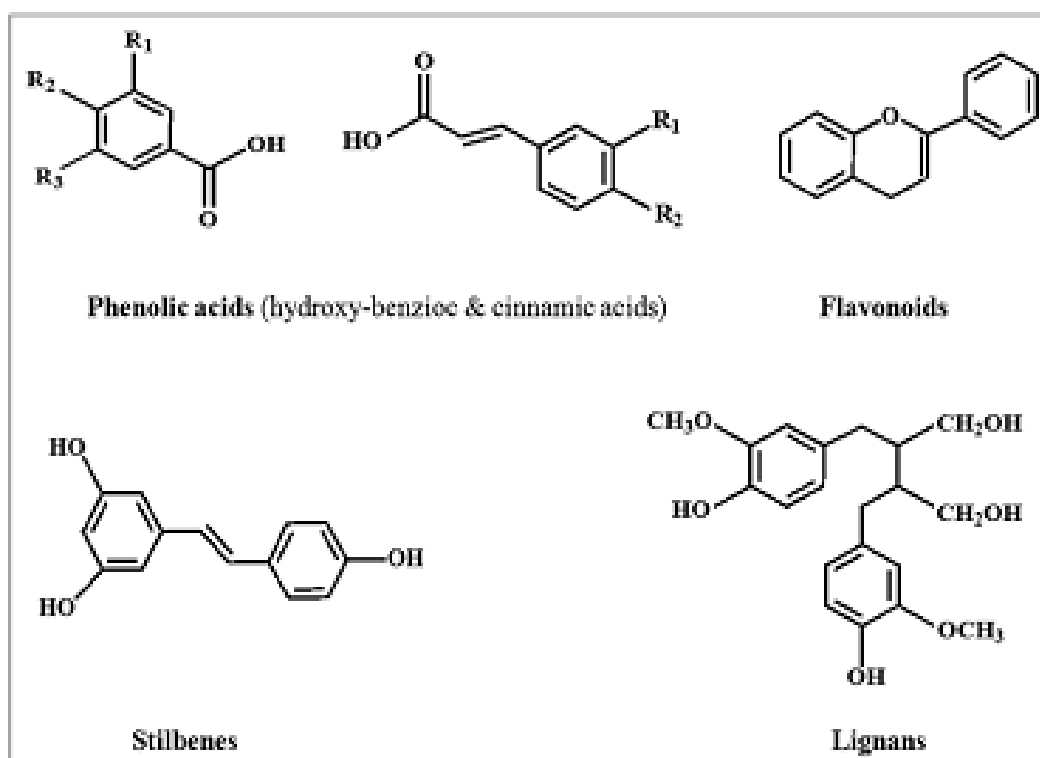


Figure 4 : Structure de bases des différentes classes de polyphénols (PANDEY *et al.*, 2009).

3.1.2. Les composés alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules de structures complexes cycliques et azotées, relativement stables plus ou moins basiques. De façon générale, ces métabolites sont caractéristiques des plantes supérieures. Exceptionnellement, on rencontre les alcaloïdes chez les bactéries. Certains animaux renferment également des structures alcaloïdales. La synthèse des alcaloïdes a lieu au niveau du réticulum endoplasmique, puis se concentre dans la vacuole. Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance puis sont véhiculés dans les différentes parties de la plante. Les alcaloïdes sont insolubles dans l'eau.

Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande

diversité structurale. Ils peuvent être classés en fonction de leur précurseur. On distingue ainsi trois grandes classes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent un atome d'azote dans un hétérocycle.

On distingue :

- Les alcaloïdes vrais, ils représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un azote dans un hétérocycle. Ils possèdent un large spectre d'activité biologique ;
- Les proto-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne dérivent pas d'acides aminés et pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques ;
- Les pseudo-alcaloïdes sont des acides aminés simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique.

Les alcaloïdes les plus utilisés comme médicaments dans la pharmacopée usuelle sont des dérivés de la morphine utilisés pour leur propriété analgésique (BRUNETON, 1999).

3.1.3. Les terpènes

Les terpènes ou isoprénoides sont des composés issus de la condensation de l'isoprène, cycliques ou acycliques. Ils sont généralement lipophiles. Ils peuvent être classés en fonction du nombre de carbone en mono terpène, sesquiterpène, di terpène, tri terpène, et tetraterpènes, au-delà, on parle de poly terpène. Ils jouent des rôles très variés pour la plante. Ce sont des composés protecteurs des végétaux face aux stress (BRUNETON, 1999).

3.2. Activités biologiques

Il est évident que les plantes peuvent réduire d'une manière considérable les risques

d'un grand nombre de maladies chroniques (maladies cardiovasculaires, hypertension, diabète et cancer). Ces activités biologiques sont dues à la présence de composés phytochimiques possédant des cibles moléculaires précises pouvant atteindre différents processus physiologiques, comme le montre la figure 5.

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales suggèrent que les composés phytochimiques, principalement les polyphénols pourraient prévenir des pathologies graves. En effet, ces composés peuvent interagir avec un grand nombre de systèmes physiologiques. Ils sont associés aux effets préventifs d'un grand nombre de pathologies comme les maladies cardiovasculaire et maladies inflammatoires. Leur rôle dans la prévention du cancer a également été mis en évidence. Ces différentes manifestations biologiques impliquent des propriétés très variées impliquant la propriété antioxydante, antiproliférative et anti thrombogénique (STANGL *et al.*, 2007).

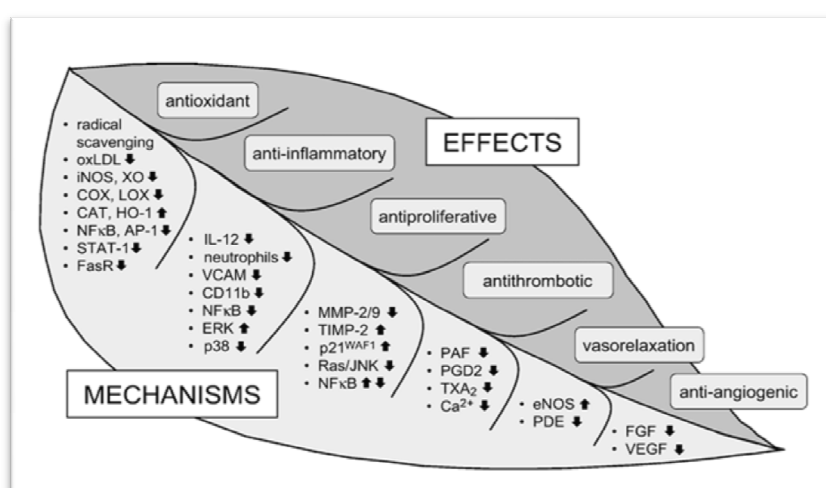


Figure 5 : Principaux mécanismes moléculaires et effets cellulaires des composés phytochimiques (STANGL, 2007)

3.2.1. Activités anticancéreuses

Le cancer est le terme global employé pour décrire une croissance cellulaire sans contrôle. De nombreux facteurs contribuent à son développement. Dans la plus part des cas, la dérégulation de la prolifération et la résistance à l'apoptose est des événements important qui détermine la progression vers le cancer. Il est également bien établi que

l'induction de l'inflammation par des infections bactériennes et virales augmente le risque du cancer. Le principal événement du contrôle de la prolifération cellulaire est la régulation de l'apoptose. Ce mode de mort physiologique est régulé par deux voies de signalisation. Ces deux voies sont représentées par la voie de récepteur de mort cellulaire et la voie mitochondriale. Ces signaux induisent le clivage des procaspases inactives pour donner des caspases actives. Ces enzymes sont des agents clé de l'apoptose (voir figure 6) (KEEBLE et GILMORE, 2007).

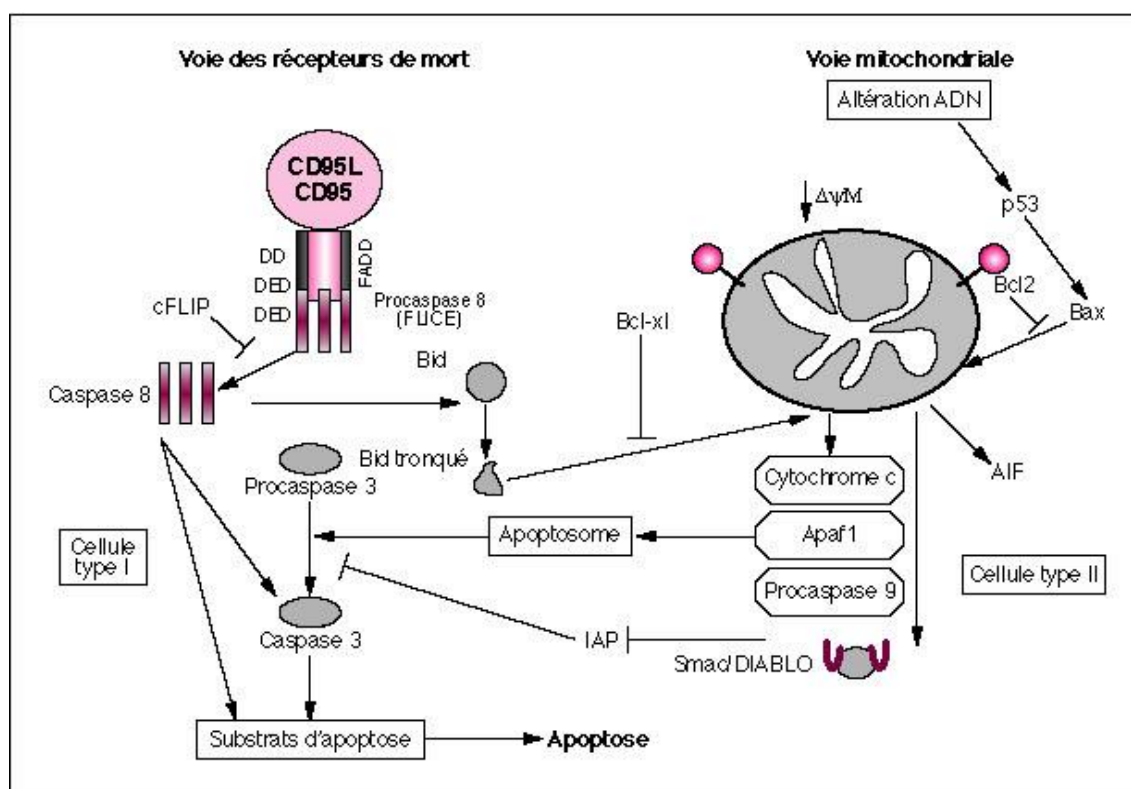


Figure 6 : Voies de signalisation de l'apoptose (KEEBLE et GILMORE, 2007).

Des études épidémiologiques suggèrent que la consommation régulière de fruits et légumes est associée à une faible incidence de nombreuses maladies chroniques y compris le cancer. Des médicaments anticancéreux d'origine végétale semblent non seulement plus efficaces, mais aussi avec moins d'effets secondaires que les drogues de synthèse.

Un certain nombre de composés phytochimiques ont été identifiés pour être chimio-préventifs en régulant ou en ciblant des molécules spécifiques. L'activité pléiotropique des

composés phytochimiques découle de leur composition chimique complexe. Ainsi, ils sont caractérisés par une aptitude à influencer de multiples voies de signalisation. Des mécanismes d'action d'extrait végétal sur le développement de cancer sont proposés. Des mécanismes impliqués dans l'activité anticancéreuse du resveratrol, un composé phytochimique de la famille des stilbène, dans différents processus cellulaires par une activation ou une inhibition des voies cellulaires sont illustrés dans la figure suivante.

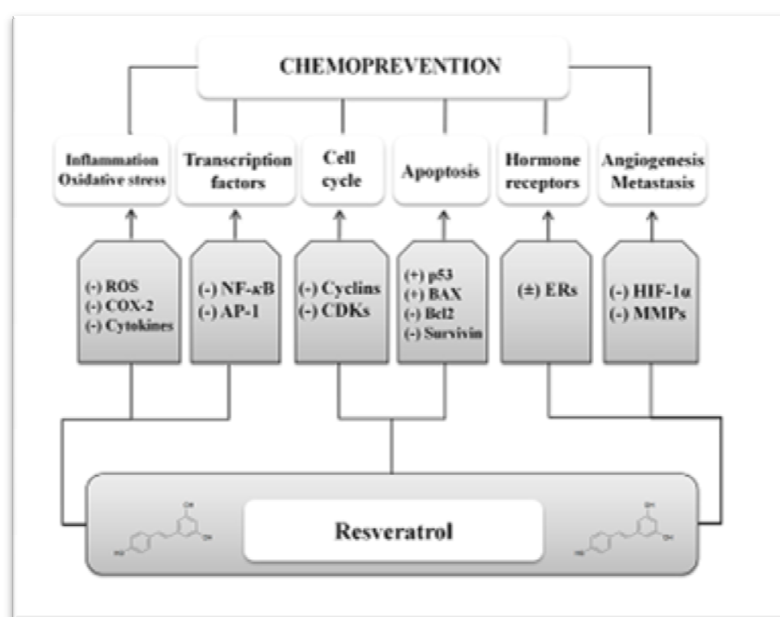


Figure 7 : Mécanismes impliqués dans l'activité anticancéreuse du resveratrol (VARONI et *al.*, 2016)

En modulant plusieurs voies de signalisation, les composés phytochimiques peuvent influencer différents stades le développement du cancer. Les voies de signalisation interférées par ces composés ciblées en fonction du stade de développement du cancer. La figure suivante illustre les mécanismes d'action du curcumin sur les différents stades de développement du cancer (HATCHER et *al.*, 2008).

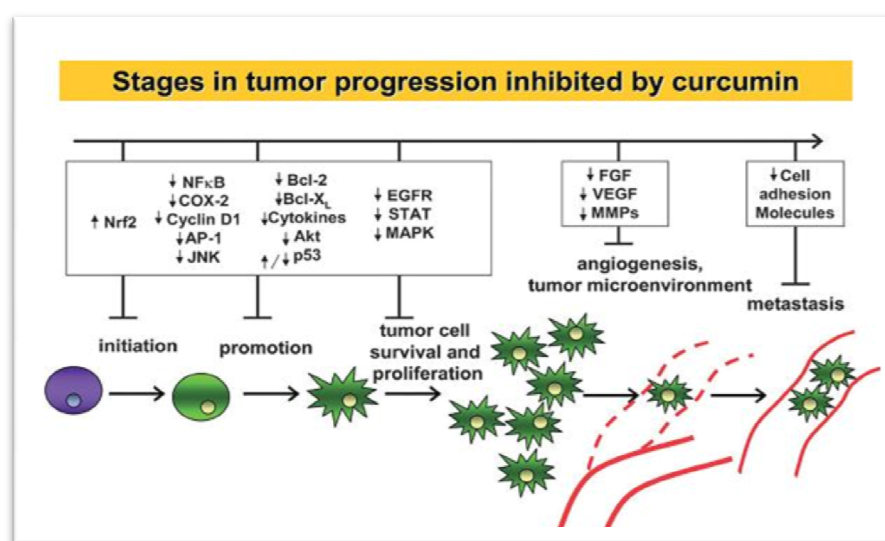


Figure 8: Mécanismes d'action du curcumin sur les différents stades de développement du cancer (HATCHER *et al.*, 2008).

3.2.2. Activité anti-oxydante

Les radicaux libres ou les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, qui possèdent un ou plusieurs électrons libres non appariés sur leur dernière couche. Cette propriété est à l'origine de leur grande réactivité et leur instabilité énergétique et cinétique. L'emploi du terme ERO désigne un ensemble large de molécules et englobe les ions superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les ions hypochloreux (HOCL), le radical hydroxyle ($HO^\cdot$) ainsi que les espèces réactives de l'azote telles que le monoxyde d'azote ($NO^\cdot$) et peroxydinitrite ($ONOO^\cdot$).

La responsabilité des radicaux libres dans les dommages tissulaires, de l'ADN et des protéines a été largement prouvée. Le stress oxydatif associé à la production d'ERO serait impliqué dans la physiopathologie du vieillissement, diabète, inflammation chronique, maladie d'Alzheimer, problèmes neurologiques et cancer. La consommation d'aliments riches en composés possédant une activité antioxydante permettent de neutraliser l'excès de radicaux libres, générés par les activités métaboliques cellulaires, et par conséquent protégerait les cellules contre les effets toxiques et contribueraient à la prévention des maladies mentionnées dans le paragraphe ci-dessus.

Des travaux récents se sont intéressés aux mécanismes d'action de ces composés phytochimiques dans la prévention et/ou le traitement de certaines pathologies. C'est ainsi que BENSALÉM et collaborateurs (2016) ont mis en évidence l'effet des flavonoïdes sur la prévention de l'altération de la mémoire liée au vieillissement. De même, KESSOKU et collaborateurs (2016) ont élucidé le mécanisme moléculaire des polyphénols dans la prévention du syndrome inflammatoire hépatique résultant d'une complication de l'obésité qui se manifeste par un déséquilibre du métabolisme lipidique qui induit une accumulation des lipides neutres dans le foie.

3.2.2.1. Action anti-oxydante, par transfert d'électrons et/ou protons, des métabolites secondaires dans le stress oxydatif

Le pouvoir antioxydant est très complexe. Il fait intervenir un transfert d'électrons et/ou de protons entre un antioxydant et un radical libre. Cette capacité est étroitement liée aux propriétés structurales et moléculaires de l'agent antioxydant. Ces caractères sont principalement : l'enthalpie électronique, l'indice de réactivité, la densité de spin et les caractéristiques géométriques de la molécule. Ces paramètres influencent directement sur le potentiel d'ionisation et la capacité à céder des protons.

BARZEGAR et ses collaborateurs (2011) ont comparé l'effet antioxydant de deux polyphénols le curcumin et le trolox. Ils ont mis en évidence l'influence du nombre de groupement O-H d'une molécule dans son activité anti-oxydante. Ils ont retrouvé un effet antioxydant du curcumin deux fois plus important que celui du trolox. Ils corrélaient cette différence à la présence des deux groupements OH et un groupement CH₂ au niveau du curcumin et la présence d'un seul groupement OH pour le trolox.

Synthèse bibliographique

La position des groupements OH influence également la capacité à céder un proton. La capacité à céder un proton est proportionnelle au nombre de carbone. En se basant sur les données structurales résumées dans la figure suivante, YANG et ses collaborateurs (2009) montrent que la quercétine est le meilleur antioxydant parmi les composés testés. Elle présente le plus grand nombre de groupements OH conjugués et une plus faible énergie de liaison.

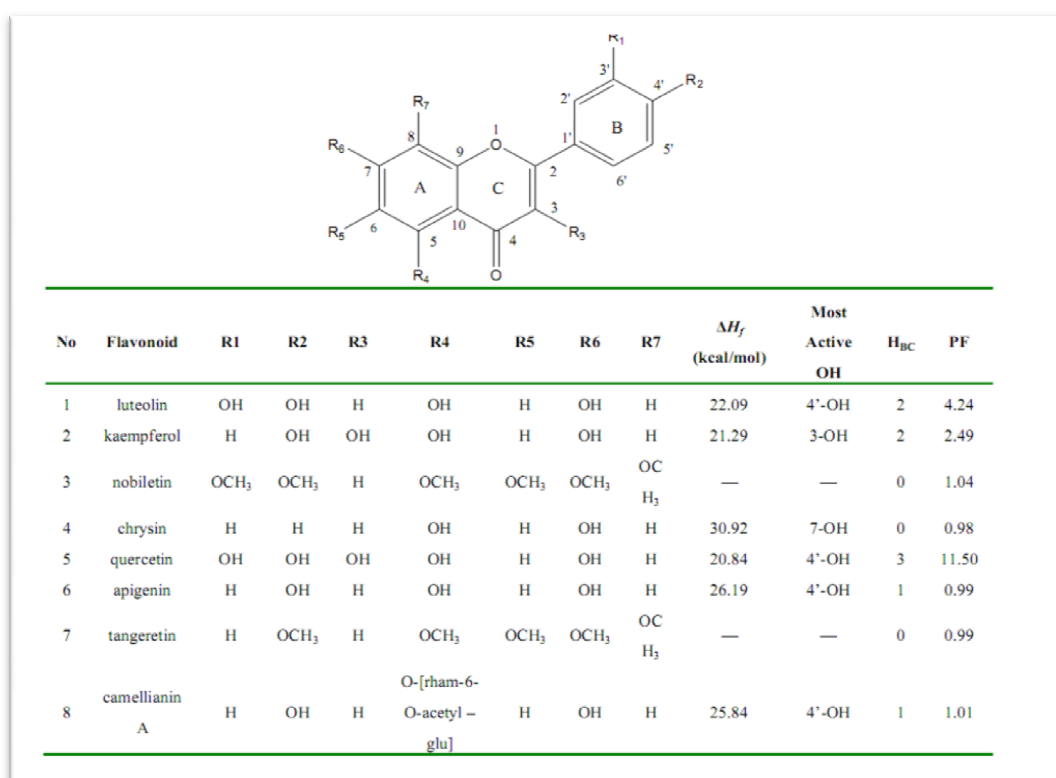


Figure 9 : Propriétés structurale et activité antioxydante de quelques flavonoïdes (YANG *et al.* 2009).

3.2.2.2. Action anti-oxydante des métabolites secondaires dans le stress oxydatif par chélation des ions métalliques

Les métaux de transition constituent une grande famille d'éléments chimiques. Ils représentent de bons réducteurs et forment des cations susceptibles de former des complexes stables avec un grand nombre de ligands. Le fer et le cuivre sont présents dans le système biologique en quantités non négligeables. Ils sont impliqués dans la réaction de

Fenton. Ils peuvent ainsi induire des pathologies liées à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Leur chélation représente donc une action antioxydante non négligeable (KONTOGLIORGHE *et al.*, 2015). Les groupements ayant un potentiel chélateur ont en général une affinité variable pour plusieurs ions métalliques dans l'ordre suivant $Fe \geq Cu \geq Al \geq Zn$. La chélation de ces métaux lourds peut se faire par fixation. Des sites de fixation d'ions métalliques sur des structures phytochimiques ont été mis en évidence par SUMANONT (2004) et AK et GULCIN (2008).

3.2.2.3. Action des métabolites secondaires sur les enzymes régulateurs du stress oxydant.

L'activité des polyphénols sur les enzymes régulateurs de la balance oxydative a fait l'objet de nombreux travaux. Ils sont à l'origine d'une induction significative des enzymes intervenant dans le système de détoxification dans le stress oxydatif, notamment la superoxydedismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase. L'effet hépato protecteur lié à la consommation d'extrait de feuilles de *P. atlantica* *contre* un stress oxydatif est directement corrélé avec une augmentation de la synthèse des enzymes de détoxification du stress oxydant (LIO *et al.*, 1993 ; TOLOOEI et MIRZAEI, 2015).

3.2.3. Action anti hémolytique des métabolites secondaires

L'érythrocyte ou globule rouge est une cellule sanguine, discoïde et biconcave, dépourvu de mitochondrie, de ribosomes et de noyau. Il peut être schématiquement représenté par une membrane contenant l'hémoglobine et des enzymes de protection contre l'oxydation. Pour assurer son rôle d'unique transporteur d'O₂ et CO₂, le globule rouge est principalement caractérisé par (i) une résistance membranaire et (ii) le maintien d'une forme biconcave qui lui assure une aptitude à la déformabilité.

3.2.3.1. Membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire apparait en microscopie électronique sous forme tri laminaire ; deux couches opaques et une couche claire. Elle est composée d'une bicouche de phospholipides ancrée sur un squelette interne. Elle est composée principalement de :

- Lipides

Les lipides les plus représentés sont les phospholipides, plus particulièrement les phosphatidylcholines, les sphingolipides et les stérols en particulier le cholestérol. La nature des acides gras qui rentrent dans la composition des phospholipides intervient dans la fluidité membranaire. La membrane est d'autant plus fluide que la proportion des acides gras polyinsaturés est importante. Le cholestérol inséré entre les phospholipides est également essentiel dans la modulation de la fluidité membranaire.

-Protéines

Protéines transmembranaires

Les protéines transmembranaires sont de deux types : protéines qui jouent un rôle dans la stabilité de la forme de l'érythrocyte en se fixant aux protéines intrinsèques du cytosquelette (Protéine 3, glycophorine A et glycophorine C) et les protéines qui jouent un rôle essentiel dans les échanges avec le milieu extérieure. Les plus importantes sont les ATP ases Na^+ , K^+ dépendantes et les ATP ases Ca^{2+} dépendantes.

Protéines du cytosquelette

Le squelette membranaire se situe le long de la face interne de la membrane. Il est sous forme d'un réseau protéique interne qui permet une restriction de la diffusion latérale des protéines membranaires ce qui assure une meilleure stabilité mécanique. Il agit à la fois sur la résistance et la fluidité et donc sur la capacité à la déformation de la cellule. Il est constitué de trois protéines : la spectrine, l'actine et la protéine 4.1.

Le globule rouge baigne dans un milieu riche en oxygène et dont la tension osmotique varie fréquemment. Il faut donc un système de régulation pour éviter une lyse osmotique. La régulation des flux ioniques et le maintien du potentiel redox est donc capitale

pour empêcher la lyse cellulaire par éclatement.

3.2.3.2. Mécanismes de maintien de l'intégrité de la membrane érythrocytaire

Le maintien du volume cellulaire dépend d'une balance entre le passage actif et le passage passif des électrolytes à travers la membrane érythrocytaire. Le maintien du gradient de concentration des différents ions à travers la membrane cytoplasmique érythrocytaire est directement lié aux propriétés biophysiques et physiologiques du globule rouge. Le maintien de la concentration de certains ions tels que le Ca^{2+} constante entre 30 et 60 mM à l'intérieur par rapport à une concentration extérieure de 1.8mM est assurée par une pompe Ca^{2+} -ATP ase. Un dysfonctionnement de ce transport à travers la membrane érythrocytaire conduit à son accumulation à l'intérieure de la cellule. Cet état est observé dans un grand nombre de pathologies incluant la drépanocytose et certaines anémies hémolytiques (VAN DUIJIN *et al.*, 2001).

Le globule rouge mature est particulièrement sujet aux dommages oxydatifs parce qu'il est constamment exposé à des niveaux élevés d'oxygène. En outre, le Fer libéré de l'hémoglobine peut être néfaste car il agit comme catalyseur pour la production de radicaux hydroxyles par les réactions de Fenton.

L'importance des mécanismes de protection du globule rouge est évidente à partir d'un examen des troubles hémolytiques humains dus à une variété de déficiences enzymatiques impliquant les voies qui maintiennent les molécules réductrices intracellulaires. L'érythrocyte peut éliminer les électrons qui peuvent être à l'origine du stress oxydatif par des mécanismes réactionnels qui expulsent ces électrons vers le milieu extérieur via des complexes enzymatiques tels que les complexes PMRS et AFR réductase (RIZVI *et al.*, 2009 ; VAN DUIJN *et al.*, 2001). Les principaux mécanismes intervenant dans la lutte contre l'agression oxydative sont illustrés dans la figure 10.

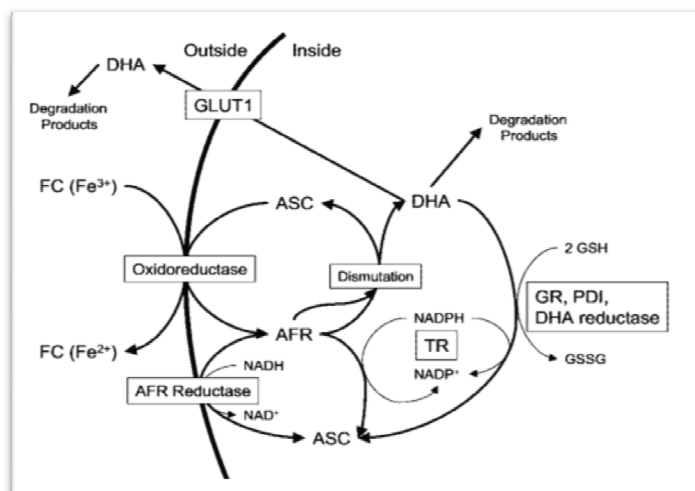


Figure 10 : Principaux complexes membranaires érythrocytaires de lutte pour le maintien de la balance oxydative (RIZVI *et al.*, 2009).

3.2.3.3. Mode d'action des métabolites secondaires sur le maintien de l'intégrité membranaire érythrocytaire

Un grand nombre d'études a montré l'effet des composés phytochimiques sur le complexe membranaire PMRS. Ils ont mis en évidence un site de fixation de polyphénols sur le site actif de la NADH-cytochrome réductase. Cette fixation induit l'activation de ce complexe (KESHARWANI *et al.*, 2012 et Fatima *et al.*, 2013). Un mécanisme réactionnel de l'action du resveratrol et de la quercetine deux polyphénols, sur les complexes membranaires du maintien de la balance oxydative est illustré dans la structure suivante :

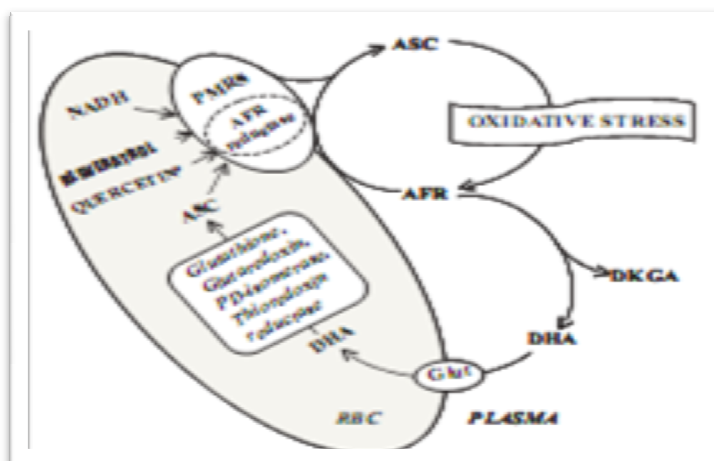


Figure 11 : Action du resveratrol et de la quercitrine sur le complexe membranaire PMRS (RIZVI et PANDEY, 2010).

Dans une étude sur l'effet protecteur des polyphénols sur des érythrocytes d'hypercholestérolémiques, DUCHNOWICZ et ses collaborateurs (2012) ont noté une modulation de la concentration du cholestérol membranaire qui a pour effet directe l'amélioration de la fluidité membranaire.

Les polyphénols peuvent également se localiser dans la couche lipidique externe. Cette fixation induit une modification d'agencement des lipides membranaires et d'un changement dans le degré de déshydratation. La localisation des polyphénols dans la phase lipidique hydrophile induit une modulation de la fluidité membranaire (BONARSKA-KUJAWA et *al.*, 2014). PAWLIKOWSKA-PAWLEGA et ses collaborateurs (2003) ont proposé un modèle de fixation de génistéine un flavonoïde (A), avec la tête hydrophile des phospholipides membranaires (B) tel que le montre la figure suivante :

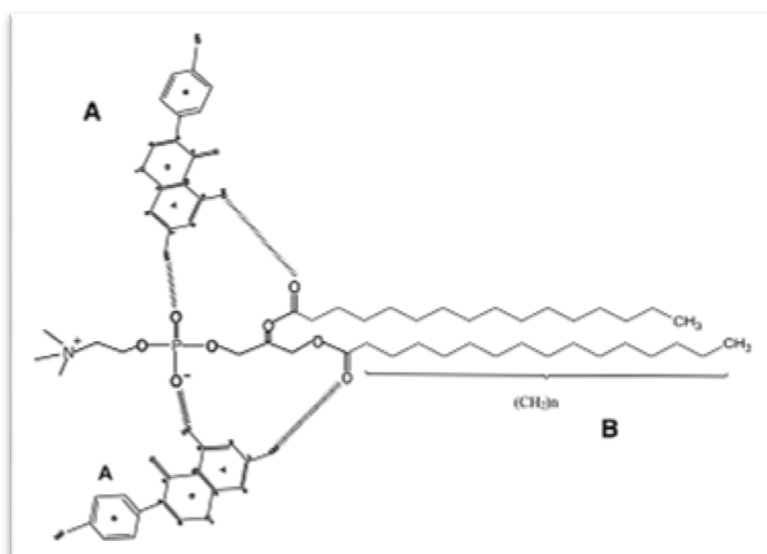


Figure 12 : Interaction de flavonoïde avec les phospholipides membranaires (PAWLIKOWSKA-PAWLEGA *et al.*, 2003).

3.2.4. Action antimicrobienne

Les extraits végétaux ont un large spectre d'activité. Leur action antibactérienne a largement été démontrée. Il en ressort que les bactéries Gram – sont moins sensibles que les bactéries Gram + car leur membrane externe contient des lipopolysaccharides qui créent une barrière contre les macromolécules et les composés hydrophobes (WALSH *et al.*, 2003 et STARLIPER *et al.*, 2015). Ces composés naturels renferment un grand nombre de principes actifs et leur principale cible est la membrane cytoplasmique (HYLDAARD *et al.*, 2012).

Le maintien de l'intégrité membranaire est un événement vital pour la cellule bactérienne. Une perturbation de sa structure ou de sa fluidité est à l'origine de la mort cellulaire. Un composé antibactérien peut donc induire des modifications de l'édifice membranaire ou modifier sa composition.

Le p-cymène est un métabolite secondaire largement rencontré dans le règne végétal. Il a une affinité pour la membrane cytoplasmique où il s'accumule. Ceci induit un gonflement et une perturbation de la structure de l'édifice membranaire. Il en résulte une perturbation de la perméabilité membranaire et la mort cellulaire par la fuite du contenu cytoplasmique.

Le carvacrol est un mono terpène qui traverse la membrane cytoplasmique, diminue le potentiel membranaire par la fuite du potassium intracellulaire tel qu'il est illustré dans la figure 10. La membrane devient ainsi perméable aux protons. Cette dissipation de gradient d'ions à travers la membrane cytoplasmique conduit à une altération du potentiel trans membranaire (ULTEE *et al.*, 2002).

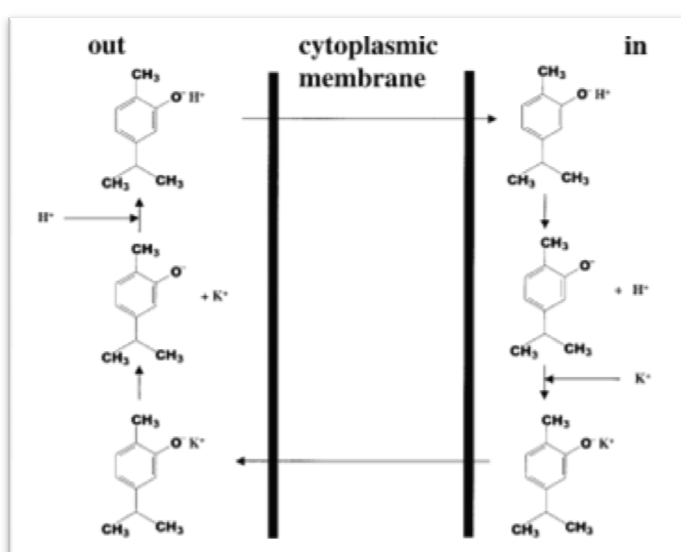


Figure 13 : Mécanisme d'action du carvacrol sur la membrane cytoplasmique bactérienne (ULTEE *et al.*, 2002).

La fluidité membranaire est étroitement liée à la composition en acide gras. Il est établi qu'une augmentation de la fluidité induit une augmentation de la perméabilité. Dans leurs travaux, TROMBETTA et collaborateurs (2005) ont montré l'action des mono terpènes dans la modulation de la composition lipidique membranaire. La perturbation de la fraction lipidique dépend des caractères physicochimiques de ces composés tels que la lipophilie et la solubilité dans l'eau. Elle dépend également de la nature et de la charge nette de la fraction lipidique (HEIPIEPER *et al.*, 1992).

Une fois la barrière membranaire franchie, les composés fortement électrophiles tel que les composés renfermant le groupement isothiocyanate réagissent facilement avec les constituants vitaux de la cellule. Ils peuvent atteindre des cibles vitales pour la cellule. MITH et collaborateurs (2015) ont montré l'action de l'huile essentielle d'*O. heracleoticum* sur l'inhibition de la transcription des gènes de virulence d'*Escherichia coli* O157 : H7.

3.2.5. Autres mécanismes d'actions

L'activité pléiotropique des composés phytochimiques découle de leur composition chimique complexe ainsi que de leur aptitude à influencer de multiples voies de signalisation cellulaires. Nous pouvons citer principalement :

3.2.5.1. Activité antiplaquettaire

L'activation plaquettaire est un événement clé impliqué dans le mécanisme de la pathologie de l'ischémie. Le rôle des composés phytochimiques dans ce phénomène a été démontré. Le rôle des polyphénols du thé dans cette pathologie est lié à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire en inhibant la synthèse des facteurs P38 et P115, facteurs impliqués dans la signalisation de la cascade de l'agrégation plaquettaire (STANGL *et al.*, 2007).

3.2.5.2. Action antivirale

Les antiviraux disponibles actuellement, y compris l'interféron alfa et les analogues nucléotidiques, ont montré leur limite. C'est dans ce sens qu'un grand nombre de travaux se sont intéressés à élucider les mécanismes antiviraux de certains composés naturels d'origine végétale. Dans un récent travail WU *et collaborateurs* (2016) a répertorié les mécanismes d'action des différentes classes de composés naturels d'origine végétale dans l'inhibition de la réplication du virus de l'hépatite virale B. Les composés phytochimiques tel que la quercitine peuvent inhiber l'entrée du virus grippal influenza A (VIA). Ainsi, la quercitine est proposée comme traitement prophylactique de l'infection au VIA. Les polyphénols extraits à partir d'huile d'olives extra-vierge ont présenté des effets anti cancer sur des lignées cellulaires de cancer du sein humain, par inhibition de l'activité de la protéine virale HER2.

3.2.5.3. Action antiparasitaire

Les composés phytochimiques ont montré des effets sur différentes cellules nuisibles. Ils présentent des actions herbicides et insecticide (MOREIRA *et al.*, 2014 ; GE *et al.*, 2015).

Les polyphénols flavonoïdes influencent le développement de *Trypanosome* par inhibition d'une enzyme clé : l'hydrolase nucléotidique (HA *et al.*, 2015). Des extraits de feuilles de *Pistacia* ont révélé une activité anti-leishmania au stade promastigote et réduisent ainsi de manière significative l'infection par le parasite (EZATPOUR *et al.*, 2015).

3.2.5.4. Action sur le métabolisme cellulaire

Les composés phytochimiques peuvent atteindre un grand nombre de cibles cellulaires. Ils peuvent remédier à un grand nombre de troubles métaboliques. KANG et collaborateurs (2015) ont montré l'effet d'extraits de *Smilax china* sur l'accumulation des lipides dans les adipocytes et donc son action sur le phénomène de l'obésité. Les triterpénoïdes et les flavonoïdes ont démontré leur effet hépato-protecteur grâce à leur action hypocholestérolémiante (REAZAEI-GOLMISHEH *et al.*, 2015 ; DJERROU, 2014). L'action sur l'activité métabolique peut être ciblée par une action directe sur les enzymes comme par exemple l'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase, enzyme clé du métabolisme de l'acide urique. Ainsi, les extraits végétaux sont considérés comme remède dans le traitement de l'hyper uricémie (ISLAM *et al.*, 2015 et HUO *et al.*, 2011). Deux flavonoïdes extraits à partir de feuilles de *P. integerrima* ont présenté une action inhibitrice de la phosphoesterase 1, enzyme clé de l'inflammation des muscles lisses des voies respiratoires (RAUF *et al.*, 2015).

Matériel et méthodes

Au cours de cette étude nous nous sommes intéressés aux effets bénéfiques que l'on peut retrouver en exploitant des composés naturels. Nous avons évalué les effets biologiques d'extraits de feuilles de deux plantes médicinales du pourtour méditerranéen à savoir *P. lentiscus* L. et *Origanum majorana*. Le choix de ces plantes est justifié par leur large utilisation en médecine traditionnelle. Les effets biologiques ciblés dans cette étude sont : (i) activité anti-oxydante (ii) effets cytotoxiques sur les cellules du cancer du sein humain et du cancer du poumon (iii) effets sur la croissance bactérienne.

Dans un second volet nous avons mis en évidence l'effet protecteur d'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. sur les cellules érythrocytaires vis-à-vis de différents stress à savoir le stress oxydant induit par l'acide hypochloreux (HOCl), le stress osmotique induit par des concentrations croissantes de chlorure de sodium (NaCl) et enfin le stress induit par des concentrations hémolytiques de saponine.

Nous avons jugé intéressant de quantifier la fraction la plus impliquée dans ces activités biologiques à savoir les flavonoïdes et les tanins qui représentent la fraction de polyphénols la plus active.

1. Matériel

1.1 Matériel biologique

1.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal, préalablement identifié, est constitué de feuilles de *P. lentiscus* et d'*O. majorana* récoltées respectivement dans la région de Tizi-Ouzou (Algérie) et dans la région de Tyr située au sud du Liban.

1.1.2. Souches bactériennes

L'extrait aqueux de *P. lentiscus* L. est testé pour son activité antibactérienne vis-à-vis

de souches de référence connues pour leur pathogénicité à savoir : *Escherichia coli* ATCC 25 922, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 43 300, *Bacillus cereus* ATCC10 876, *Citrobacter freundii* ATCC8 090 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4 352.

1.1.3 Hématies

Nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet protecteur de l'extrait aqueux sec de *P. lentiscus* L. vis-à-vis des globules rouges, considérés comme model universel dans l'étude de la cellule eucaryote. Les hématies sont récupérées à partir de sang de volontaires sains et sans aucun traitement médical. Le sang est récupéré dans des tubes héparines et conservé à 4°C pendant une durée maximale de 21 jours.

1.1.4 Lignées cellulaires cancéreuses

L'effet de l'extrait éthanolique d'*O. majorana* est testé sur des cellules du cancer humain. Nous avons testé les cellules MDA-MB 231, issues d'une tumeur mammaire humaine. Nous avons également testé les cellules A 549, lignée cellulaire issue d'une tumeur pulmonaire. Ces cellules sont conservées dans le milieu DMEM complémenté avec 10% de sérum foetal bovin et de 10U/ml de pénicilline/streptomycine.

2. Méthodes

2. 1. Préparation de l'extrait sec aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus*

Les feuilles ont été récoltées durant la période d'octobre à décembre (2014) dans différentes régions de la wilaya de Tizi-Ouzou (Makouda, Ouacif, Draa-El-Mizane et Mekla). Le matériel végétal est séché à l'abri de la lumière à la température ambiante. Le séchage dure environ 7 jours en moyenne. Après broyage avec un broyeur électrique, la poudre de feuille est tamisée. 20 g de poudre ainsi obtenue sont macérés dans 200 ml d'eau distillée. Le mélange est placé à 40°C sous une agitation de 8 tours/mn pendant 24 heures. Le mélange est ensuite filtré sur du papier Wattman N°1 et le filtrat obtenu est lyophilisé. On obtient

ainsi un extrait aqueux brut de *P. lentiscus* L. (EAP). Cet extrait végétal est conservé à l'abri de la lumière à 4°C.

2.2. Préparation de l'extrait éthanolique d'*Origanum majorana* L.

Après broyage et tamisage des feuilles d'*O. majorana* préalablement séchées, nous mélangeons 5 g de poudre végétale avec 100 ml d'éthanol à 70%. La suspension est placée à 4°C pendant 72 heures. Le mélange obtenu est filtré sur du papier Wattman N°1 puis évaporé avec un rotavapor. Le résidu obtenu constitue l'extrait éthanolique d'*O. majorana* (EEO).

Les principales étapes de la préparation des l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique sont résumées en **annexe 1**

2.3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux contenue dans les extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. est déterminée par la méthode décrite par CAO et ses collaborateurs (1997), utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Ce réactif est un mélange complexe d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et de phosphomolybdène (H_3PMo_{40}) de couleur jaune. Ce dosage est basé sur l'oxydation des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu. Cette réaction entraîne la formation d'un complexe bleu qui absorbe à 765nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en polyphénols. 200 µl d'extrait végétal est mélangé avec 1ml de réactif de Folin (dilué au 1 /10) et 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange est agité et conservé à l'abri de la lumière pendant. La densité optique est mesurée à 765 nm. Une courbe étalon est réalisée en utilisant l'acide gallique comme standard. La teneur en polyphénols totaux de l'extrait végétal est exprimée en milligrammes (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière végétale sèche.

2.3.1 Dosage des tanins totaux

500 µl de l'extrait sec sont mélangés avec 1ml de sérum albumine bovin BSA. Après 24 heures d'incubation à 4°C, le mélange est centrifugé à 3000 tours/mn. Le précipité obtenu

est dissous dans 2 ml de tampon (SDS/TEA) en présence de 500 µl de FeCl₃ puis incubé à l'obscurité pendant 15mn à la température ambiante. Le même Protocole est réalisé pour différentes concentrations d'un standard (acide tannique) qui servira à réaliser la courbe étalon. La concentration de l'extrait végétal en tanins totaux est exprimée en microgrammes équivalent d'acide tannique /g de matière végétale.

2.3.2 Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée selon la méthode décrite par KIM (2003). 0,5ml d'échantillon est mélangé à 0,1ml de NaNO₂ auquel sont ajouté 0,1ml de AlCl₃ (10%). La solution est ajustée avec de l'eau distillée à 5 ml. Après 30 mn d'incubation à la température ambiante, un complexe brunâtre se forme. La densité optique est déterminée à 510 nm. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes.

Différentes concentrations d'un standard (la quercitine) sont utilisées pour établir la courbe étalon, laquelle servira à déterminer la concentration en flavonoïdes totaux qui est exprimée en microgrammes équivalents de quercitine/g de matière sèche végétale.

Les principales étapes de dosage des tanins et flavonoïdes totaux sont illustrées en **annexe 2**

2.4. Activités biologiques

2.4.1. Activité anti-oxydante

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis du stress oxydatif pour son implication dans différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et les inflammatoires. Ce stress peut être atténué par des agents antioxydants contenus dans les extraits végétaux. L'activité biologique de ces composés phytochimiques est liée aux différentes réactions chimiques dans lesquelles interviennent ces composés bioactifs. Dans le cas de l'effet antioxydant, ces réactions sont représentées par les réactions d'oxydoréductions, qui sont mises en évidence dans notre étude par le test de réduction du molybdène et la réaction du fer. En ce qui concerne les réactions de neutralisation des

espèces réactives de l'oxygène, elles sont mises en évidence par le test de neutralisation du radical DPPH et du peroxyde d'hydrogène.

2.4.1.1. Capacité de réduction du molybdène

La capacité réductrice du molybdate par l'extrait sec brut de *P. lentiscus* L. est évaluée par la méthode décrite par PRIETO et collaborateurs (1999). Cette technique est basée sur la capacité de l'extrait sec à réduire les ions molybdate Mo (VI) en molybdène Mo (V) qui forme un complexe vert caractérisé par un maximum d'absorption à 695 nm.

Une gamme de concentrations de l'extrait sec allant de 15,62 à 500 µg /ml est réalisée. A 0.1ml de chaque concentration de la gamme, on ajoute 1ml de solution du réactif (1,6M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). Le mélange est incubé à 95°C pendant 90 mn. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre la solution témoin qui contient 3 ml de réactif et 0.1 ml d'eau distillée incubé dans les mêmes conditions. La Capacité à réduire le molybdène de notre échantillon est déterminé en fonction de la concentration et comparée à la capacité réductrice de l'acide ascorbique.

2.4.1.2. Capacité de réduction du fer

La capacité de réduction du fer par l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. est basée sur la méthode décrite par FEJES et collaborateurs (2000). Cette méthode exploite la propriété des composés antioxydants (réducteurs) contenus dans l'extrait végétal à former un complexe coloré avec le ferrocyanure de potassium en présence du trichloracétique et du chlorure ferreux. L'intensité de la coloration est déterminée par spectrophotométrie à 700 nm. Elle est proportionnelle à la capacité réductrice du fer de l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. Cette méthode consiste à préparer une gamme de concentrations de notre extrait végétal allant de 15,62 à 500 µg/ml. Un ml de chaque concentration de la gamme est mélangé avec 2,5ml de la solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de

ferricyanure de potassium ($K_3[Fe(CN)_6]$). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20mn, puis la réaction est stoppée par addition de 2,5ml d'acide trichloracétique (10 %). Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 tours /mn pendant 10 mn. Ensuite, 5ml du surnageant sont mélangés avec 5 ml d'eau distillée et 1ml de $FeCl_3$ à 0,1%. La densité optique est mesurée à 700 nm contre un blanc préparé comme précédemment en remplaçant l'extrait végétal par la solution tampon qui servira de contrôle négatif. Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique.

La Capacité à réduire le fer de notre échantillon est déterminé en fonction de la concentration et comparée à la capacité réductrice de l'acide ascorbique.

Les principales étapes de la détermination de la capacité de l'extrait végétal à réduire le molybdène et le fer sont illustrées en **annexe 3**

2.4.1.3. La capacité de piégeage du radical libre DPPH

La mesure de la capacité de l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* à piéger le radical libre 2- diphényl- picrylhydrazyl (DPPH) en le réduisant à sa forme non radicalaire (forme hydrazine), est basée sur la méthode décrite par SADEGH et collaborateurs (2014) (voir figure 14).

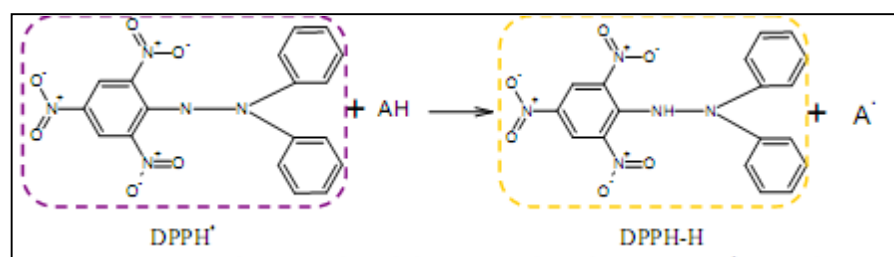


Figure 14. Mécanisme réactionnel intervenant entre le radical DPPH et un antioxydant (AH).

On prépare une série de dilution de l'extrait végétal à des concentrations allant de 5,75 à 12,5 $\mu g/ml$ et une solution de DPPH à 0,025 g/ml. Toutes les solutions sont préparées dans du méthanol. 0,25 μl de chaque dilution de l'extrait végétal est mélangé avec 0,75 μl de

la solution de DPPH fraîchement préparée. Parallèlement, un contrôle est préparé en mélangeant 0,25 µl d'éthanol avec un même volume de DPPH. Après une incubation de 30 mn à l'obscurité à la température ambiante la densité optique est mesurée à 517 nm. La capacité de piéger le radical DPPH par un antioxydant standard, l'acide ascorbique est également réalisée.

Les résultats sont exprimés en % de piégeage du radical DPPH. Ce pourcentage est déterminé selon la relation suivante :

$$\% \text{ de piégeage} = [(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance du test}) / \text{absorbance du contrôle}] \times 100$$

La capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par l'extrait aqueux de *P. lentiscus* L. est basée sur la méthode décrite par JAYAPRAKASHA et al (2004). On prépare une gamme de concentrations de l'extrait aqueux dans un tampon phosphate 0,1M (PH 7,3) à des concentrations allant de 200 à 700 µg /ml.

A 3,4 ml de chaque concentration préalablement préparée, on ajoute 0,6 ml de peroxyde d'hydrogène à 40 mM préparé dans le même tampon. Parallèlement, on prépare un contrôle dans lequel la solution d'extrait végétal est remplacée par le tampon phosphate. Après 10 mn d'incubation à la température ambiante, la densité optique est mesurée à 230 nm. Dans ce test, l'acide ascorbique constitue le contrôle positif. Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène est déterminé par la relation suivante :

$$\% \text{ de piégeage} = [(\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon}) / \text{absorbance du contrôle}] \times 100$$

Les principales étapes de détermination de la capacité de piégeage des radicaux libres sont illustrées en **annexe 4**

2.4.2. Activité anti-hémolytique de *Pistacia lentiscus* L.

L'étude de la résistance membranaire de l'hématie présente un intérêt particulier dans certaines pathologies hémolytiques qui influencent considérablement cette résistance. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet protecteur de l'extrait aqueux

de *P. lentiscus* L. vis-à-vis du globule rouge, considéré comme model universel dans l'étude de la cellule eucaryote.

2.4.2.1 Préparation des cellules érythrocytaires

Le sang de donneurs volontaires en bonne santé est récupéré dans des tubes héparinés et centrifugé à 2000 tours/mn pendant 10mn à 4°C. Le surnageant contenant le sérum est éliminé et le culot cellulaire est lavé trois fois avec une solution tampon Phosphate Buffer Saline (PBS) (KOGA *et al.*, 1998).

2.4.2.2. Analyse de l'innocuité de l'extrait végétal sur le globule rouge

L'intérêt d'une plante à visée thérapeutique exige au préalable une évaluation de sa toxicité. Pour cela nous nous sommes basés sur la méthode décrite par DUCHNOWICZ et collaborateurs (2012) avec quelques modifications. Un ml d'une gamme de concentration de l'extrait végétal allant de 125 à 1000 µg/ml est mis en contact avec 1ml de suspension de globules rouges (2%). Le mélange est incubé pendant 30 mn sous une agitation modérée. En présence d'une substance hémolytique, les hématies lysées libèrent l'hémoglobine qui absorbe à 540 nm. Parallèlement, un test contrôle négatif (A) est réalisé. Il est constitué d'un essai pour lequel le volume composé de l'extrait est remplacé par un même volume de PBS (0% d'hémolyse), ainsi qu'un contrôle positif (B) où le globule rouge est mis en présence d'eau distillée (100% d'hémolyse). Après une incubation, sous agitation modérée, à 37°C pendant 30 mn suivie d'une centrifugation à 2000 tours/mn, on détermine la densité optique du surnageant à 540 nm. Cette densité optique est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine libérée par hémolyse. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé par la relation suivante : % hémolyse = $\frac{\text{absorbance du test} - \text{absorbance A}}{\text{absorbance B} - \text{absorbance A}} \times 100$

2.4.2.3. Effet protecteur de l'extrait de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis de différents types de stress

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à trois types de stress : le stress oxydatif généré par différentes concentrations de HOCl, le stress osmotique par des concentrations variables de NaCl et le stress induisant des perturbations membranaires généré par des concentrations hémolytiques de saponine.

2.4.2.3.1. Effet protecteur vis-à-vis d'un stress oxydatif

Dans notre étude le stress oxydatif est généré par différentes concentrations de HOCl, à savoir : 0,15%, 0,075%, 0,0375 %. Un ml de globule rouge à 5% est incubé à 37°C pendant 15 mn en présence de 1ml d'extrait végétal à des concentrations allant de 125 à 1000 µg/ml, puis 1 ml de HOCl est ajouté au mélange. Toutes les suspensions sont préparées dans le PBS. Parallèlement un essai est réalisé dans lequel le globule rouge est placé en présence de l'agent oxydant et pour lequel le volume d'extrait végétal est remplacé par du PBS. Après 30 mn d'incubation sous une agitation modérée 5ml de PBS sont ajoutés au mélange. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé comme précédemment (SUWALSKY et *al.*, 2015).

2.4.2.3.2. Effet protecteur vis-à-vis d'un stress osmotique

Dans notre étude, le stress osmotique est généré par une variation de la concentration en NaCl par méthode décrite par CHIPPADA et collaborateurs (2011) avec quelques modifications. 40 µl de globules rouges lavés sont mis en suspension dans 1ml de NaCl à des concentrations de NaCl allant de 0 à 1,1% (contrôle) ou dans 1ml de NaCl solubilisé dans une suspension d'extrait végétal à différentes concentrations (250, 500, 1000 et 3000 µg/ml). Après une incubation, sous agitation modérée, à 37 °C pendant 30mn suivie d'une centrifugation à 2000 tours/mn, on détermine la densité optique du surnageant à 540 nm qui est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine libérée par hémolyse. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé comme précédemment décrit dans le paragraphe 4.2.2.2

2.4.2.3.3. Effet protecteur vis-à-vis de la saponine

La saponine est un agent hémolytique qui induit l'hémolyse par atteinte de l'intégrité membranaire en interagissant avec le cholestérol membranaire. Un ml d'une suspension érythrocytaire à 2% est mélangé avec 1ml de PBS contenant de l'extrait de feuilles de

P. lentiscus L. à 500 et 1000 µg/ml. Après 15 mn d'incubation à 37°C, 1ml de PBS contenant 100µg /ml de saponine est rajouté. Parallèlement, un test contrôle est réalisé dans les mêmes conditions mais en absence d'extrait végétal. Après une agitation modérée à 37°C pendant 30mn suivie d'une centrifugation à 2000 tours/mn, on détermine l'absorbance du surnageant à 540 nm. Le pourcentage d'hémolyse est déterminé comme précédemment décrit (SEEMAN et *al.*, 1978).

2.4.3. Activité anti-cancer de l'extrait d'*Origanum majorana* L.

Dans notre étude l'activité anti cancer est déterminée pour l'extrait éthanolique d'*O. majorana* nous avons suivi la viabilité des cellules du cancer du sein humain MDA-MB-231 et les cellules du cancer du poumon A549 en présence de concentrations variables d'extrait éthanolique de feuilles d'*O. majorana* nous avons évalué l'activité des caspases, enzymes clé de l'apoptose en présence de l'extrait végétal. Nous avons également mis en évidence l'effet de ce dernier sur deux propriétés importantes des cellules cancéreuses, à savoir la division cellulaire et le pouvoir de migration.

2.4.3.1. Conservation des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont conservées en phase exponentielle de croissance dans un milieu de conservation composé de 10% de DMSO, 30% de sérum fœtal de veau et de 60% de milieu DMEM. La conservation se fait dans des tube de cryogénie à une densité cellulaire de 1 à 1,5 10⁶ cellules /ml. La congélation se fait progressivement à – 80°C pendant 24 heures puis dans l'azote liquide à – 196°C. Cette congélation lente permet d'éviter la formation de cristaux. Les conditions de culture doivent assurées un contrôle contre le risque de contamination bactérienne et fongique.

2.4.3.2. Mise en culture des cellules

A partir des tubes de conservation on réalise une decryogénéation rapide dans un bain

Marie à 37°C. Les cellules sont transférées dans des flacons contenant le milieu de culture complémenté de 10% de sérum bovin fœtal. Les cellules du cancer du sein humain MDA-MB-231 et les cellules du cancer du poumon A549 sont cultivées respectivement dans le milieu DMEM et le milieu RPMI. Les flacons possèdent une surface hydrophile permettant la fixation des cellules. Après 24 heures d'incubation à 37°C dans 5% de CO₂ et 95% d'humidité le milieu de culture est renouvelé et incubé à nouveau dans les mêmes conditions. Après incubation les cellules sont décollées par une suspension composée trypsine – EDTA. Ces cellules serviront aux différents tests.

2.4.3.3. Effet de l'extrait d'*Origanum majorana* L. sur la viabilité des cellules du cancer du sein, MDA-MB-231 et du cancer du poumon, A549

Les cellules du cancer humain du sein et du poumon sont cultivées dans le milieu de culture contenant 10% de sérum bovin fœtal pendant 24 heures à 37°C avec une atmosphère avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Cette étape permet la fixation des cellules. Ces cellules en phase exponentielle sontensemencées en triple dans des microplaques de 96 puits à une densité cellulaire de 5000 cellules/puits. Après 24 heures de culture, les cellules sont traitées avec des concentrations croissantes d'extrait éthanolique d'*O. majorana* (50, 150, 300, 450 et 600µg/ml). Un témoin est préparé en remplaçant l'extrait végétal par un même volume d'éthanol. Après 24 et 48 heures d'incubation en présence de l'agent cytotoxique, on ajoute le réactif de viabilité cellulaire. Ce réactif, en présence d'ATP émet une luminescence proportionnelle à l'ATP présent. Cette méthode permet de quantifier les cellules métaboliquement actives. Les résultats sont exprimés en % de viabilité, en comparant le groupe de cellules traitées avec les cellules non traitées (témoin) dont la viabilité est considérée être à 100%.

2.4.3.4 Mesure de l'activité des caspases

Les cellules du cancer du sein humain MDA-MB- 231 sontensemencées dans des puits d'une microplaque de 96 puits à une concentration de 5000 cellules /puits. Les cellules sont traitées avec des concentrations éthanolique d'*O. majorana* ou avec un même volume

d'éthanol (témoin). Après 24 et 48 heures d'incubation, l'activité des caspases est mesurée en ajoutant le réactif caspase –Glo. Ce réactif représente un substrat des caspases considérées, une fois clivé, ce dernier libère un composé fluorescent. L'activité des caspases est déterminée par la mesure des signaux luminescents qui est proportionnelle à la concentration de l'enzyme considérée. Les principales étapes du test de viabilité des cellules cancéreuses ainsi que le test de la détermination de l'activité des caspases sont illustrés en **annexe 5**.

2.4.3.5. Action sur le cycle cellulaire

L'effet de l'extrait éthanolique de feuilles d'*O. majorana* sur la division cellulaire est déterminé par une méthode optique : la cryométrie de flux. Cette méthode est basée sur la quantification de la fluorescence émise par l'ADN marqué par l'iodure de propidium. Brièvement, les cellules du cancer humain de sein sontensemencées pendant 24 heures puis mises en contact avec différentes concentrations de l'extrait végétal. Après incubation les cellules sont récupérées par centrifugation et lavées avec du PBS. Le culot obtenu est mis en suspension dans du PBS contenant 40µg/ml d'iodure de propidium et 25µg/ml de RNase. Le pourcentage de cellules réparties dans les différentes phases du cycle cellulaire est déterminé en utilisant le logiciel Flowjo. Les principales étapes de la détermination de l'activité de l'extrait végétal sur le cycle cellulaire sont illustrées en **annexe 6**.

2.4.3.6. Action sur le caractère migratoire des cellules du cancer du poumon

Les cellules du cancer du poumon sont cultivées dans des boîtes contenant six puits jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire confluent et incubées à 37°C. Une éraflure est effectuée sur la couche cellulaire avec la pointe d'une pipette de 1 mm de diamètre. Les boîtes sont lavées 2 fois avec du PBS pour se débarrasser des débris cellulaires. Puis les boîtes sont incubées dans le milieu RPMI frais contenant 10% de sérum fœtal à différentes concentrations de l'extrait végétal. Les cellules témoins sont exposées à 1% de DMSO. Après une incubation à 37°C des observations microscopiques sont réalisées. Les principales étapes

de la détermination de l'effet de l'extrait végétal sur la capacité migratoire des cellules cancéreuses sont illustrées en **annexe 7**.

2.4.4. Activité antimicrobienne

L'extrait aqueux de *P. lentiscus* L. est testé pour son activité antibactérienne vis-à-vis de souches de référence connues pour leur pathogénicité à savoir : *Escherichia coli* ATCC 25 922, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Staphylococcus aureus* ATCC 43 300, *Bacillus cereus* ATCC 10 876, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC4352.

L'essai antibactérien est réalisé en utilisant la méthode de diffusion sur disques (APPALASAMY *et al.*, 2014). Une suspension bactérienne standardisée est préparée à une concentration de 10^6 à 10^8 UFC/ml, en utilisant la densité optique à 620 nm qui doit être comprise entre 0,08 à 0,1. Cette suspension est ensemencée par stries à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton.

A la surface des milieux de culture préalablement ensemencés, on dépose des disques de 6mm de diamètre, imprégnés de 15 μ l d'extrait végétal de concentration de 10 mg/ml. A la surface de chaque boîte de Pétri, on dépose un disque d'antibiotique (témoin positif) et un disque imprégné d'eau distillée stérile (témoin négatif). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques. Les résultats sont exprimés en millimètres et représentent la moyenne de trois essais indépendants.

A partir de la précédente étude nous avons sélectionné les souches qui ont présenté des zones d'inhibition pour lesquelles on a déterminé la concentration minimale inhibitrice (CMI). Dans cette étude la CMI est déterminée par la méthode de diffusion sur disques. Pour cela nous avons préparé une série de disques de concentration de l'extrait sec de *P. lentiscus* allant de 10 à 0,0312 mg/ml et suivi les mêmes étapes décrites précédemment. La CMI correspond à la concentration qui précède le disque pour lequel on n'observe aucune zone d'inhibition. Les principales étapes de la détermination de la CMI sont illustrées en **annexe 8**.

Analyse statistique

Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants plus ou moins l'écart type. L'analyse statistique est réalisée par le test de STUDENT pour la comparaison des moyennes.

Résultats et discussion

1. Taux de polyphénols totaux présent dans l'extrait aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

L'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* est caractérisé par une teneur en polyphénols totaux de $119,77 \pm 3,2$ mg équivalent d'acide gallique/g de matière sèche végétale. Les deux principales classes de polyphénols à savoir les flavonoïdes et les tanins totaux sont représentés par une teneur de $60,56 \pm 8,01$ mg équivalent gramme de quercitine/g de matière sèche végétale et de $25,57 \pm 5,03$ mg équivalent gramme d'acide tannique/g de matière sèche végétale de flavonoïdes et tanins totaux respectivement. Ces teneurs représentent respectivement 50,56% et 21,34% tel que le montre la figure suivante.

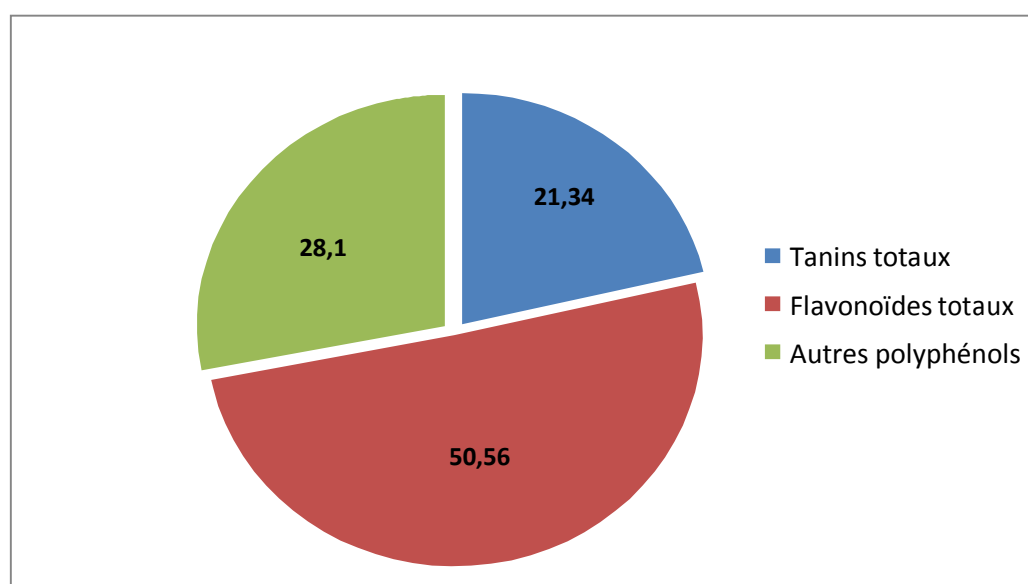


Figure 15 : Proportion des différentes fractions de polyphénols.

La comparaison de la teneur en polyphénols obtenue dans notre étude avec celles rapportées par la littérature s'avère difficile. Cette difficulté est liée aux différentes conditions d'extraction notamment la température, le temps et le ratio entre le volume d'eau et la masse de matière végétale ainsi que de la nature de la plante utilisée pour l'extraction.

Résultats et discussion

Au cours de cette étude nous avons réalisé une extraction aqueuse de feuilles de *P. lentiscus* avec un rapport de la matière végétale et de solvant (g/ml) de 1/10 sous une agitation de 8 rpm pendant 24 heures à 40°C. Le tableau suivant compare les teneurs en polyphénols obtenues par une extraction aqueuse de feuilles de quelques plantes avec des conditions d'extraction variables. En se basant sur ces données on constate que les conditions d'extraction sont très diversifiées et il en découle un écart important entre les teneurs en polyphénols totaux.

Tableau 1: Analyse comparative de la teneur en polyphénols totaux d'extraits aqueux de feuilles.

Plantes	<i>P.lentiscus</i> L. (cette étude)	<i>Strobilanthes crispus</i> L. (GHAZEMZADEH <i>et al.</i> , 2015)	<i>Datura innoxia</i> Mill (FATIMA <i>et al.</i> , 2015)	<i>Phyllanthus gomphocarpus hook.F</i> (BAHARI <i>et al.</i> , 2014)
Conditions				
Température (°C)	40	Non déterminée	Ambiante	Ebullition à 100
Temps	24 heures	2 semaines	24H30mn de sonication	30 mn
Ratio	1/10	1/10	1/10	1/10
Teneur en polyphénols (mg EAG/g)	119,77±32	49,99±0,6	29,91±0,12	208,77±3,79

D'après le tableau 1 on constate que les teneurs en polyphénols obtenues par une extraction aqueuse sont très hétérogènes. Elles varient en fonction de la plante et des conditions d'extraction. D'après ces observations nous pouvons stipuler que l'extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* est caractérisé par une teneur en polyphénols relativement élevée comparée à d'autres plantes d'intérêts médicinales.

La composition et la concentration des composés récupérés lors d'une extraction

sont étroitement liées aux conditions d'extraction. Les profils et les activités biologiques sont influencés de façon importante par le système de solvants utilisé pour l'extraction.

L'eau est un bon solvant polaire. Il est démontré qu'il permet d'extraire un grand nombre de composés biologiquement actifs à partir de différentes matières végétales (SU *et al.*, 2014 ; STARLIPER *et al.*, 2014). Les polyphénols peuvent être extraits à partir de feuilles en utilisant différents solvants. L'eau est le solvant le plus employé pour l'extraction de composés pour l'étude de l'activité antioxydante (ALAM *et al.*, 2013). GHASEMZADEH *et al* (2015) ont obtenu une meilleure extraction des différentes fractions de polyphénols en utilisant l'eau comparativement à une extraction éthanolique.

La température est un autre paramètre qui influence la composition de l'extrait. Une augmentation de la température jusqu'à 70°C induit une augmentation de la concentration en polyphénols. Mais une température atteignant 95°C modifie leur concentration suite à des dégradations chimiques (CACACE et MAZZA, 2002 ; YIM *et al.*, 2013).

Le rapport entre la quantité de matière végétale par rapport à la quantité de solvant peut aussi affecter l'efficacité de l'extraction. Une bonne extraction vise à atteindre la saturation du solvant (BOCHI *et al.*, 2014).

Le taux de polyphénols totaux, notamment les flavonoïdes et tanins totaux représentent un bon indicateur du pouvoir antioxydant. Cette fraction est considérée comme un indicateur de la valeur médicale des produits naturels. Elle est directement corrélée à l'effet anti oxydant (BIZUAYEHU *et al.*, 2016).

2. Activité antioxydante de l'extrait aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus*

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de substances actives auxquelles on attribue de nombreux effets biologiques notamment l'effet antioxydant. Pour bien aborder cette notion d'antioxydant nous devons définir la notion de la réaction d'oxydoréduction. Au cours de cette réaction il se produit un échange d'électrons entre une espèce chimique qui les captent (oxydants) et les espèces chimiques qui les cèdent (réducteurs). Un antioxydant est un composé qui réduit la teneur en oxydant c'est

donc un réducteur. Il existe un grand nombre de tests utilisés *in vitro* et qui permettent de déterminer cette capacité antioxydante.

Dans notre étude cet effet est mis en évidence par (i) la capacité de la réduction du molybdène, (ii) la capacité de réduction du fer, (iii) la capacité de piéger des radicaux libres à savoir le radical(DPPH) et (iv) le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *P. lentiscus* est comparée à celle d'un standard : l'acide ascorbique. Cet antioxydant est représenté par un cycle γ lactone portant une fonction diène diol et une chaîne dihydroxyéthylque. Par son potentiel d'oxydoréduction standard (0,06 volt) le couple acide desoxy ascorbat/ascorbate constitue un bon agent réducteur.

2.1. Capacité de piégeage des radicaux libres

Dans notre étude nous avons analysé la capacité de piégeage du radical DPPH pour des concentrations croissantes allant de 5,75 à 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de l'extrait aqueux de *P. lentiscus* L. Les résultats illustrés dans la figure **16.A** mettent en évidence la présence dans l'extrait aqueux d'une activité anti-radicalaire qui est dépendante de la concentration. En effet, la capacité de piégeage du radical DPPH se situe entre $7,29 \pm 1,7\%$ et $79,95 \pm 1,18 \%$ pour des concentrations d'extrait végétal allant de 5,75 à 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

Nous nous sommes également intéressés à la capacité de notre extrait végétal à piéger le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Elle est basée sur l'absorbance du H₂O₂ à une densité optique de 230 nm. Des concentrations croissantes de l'extrait aqueux de *P. lentiscus* allant de 200 à 700 $\mu\text{g/ml}$ ont présenté une capacité de piégeage proportionnelle à la concentration avec une capacité de piégeage maximale de $82,0.8 \pm 6.13\%$ pour une concentration de 700 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait végétal (Figure **16 B**).

Résultats et discussion

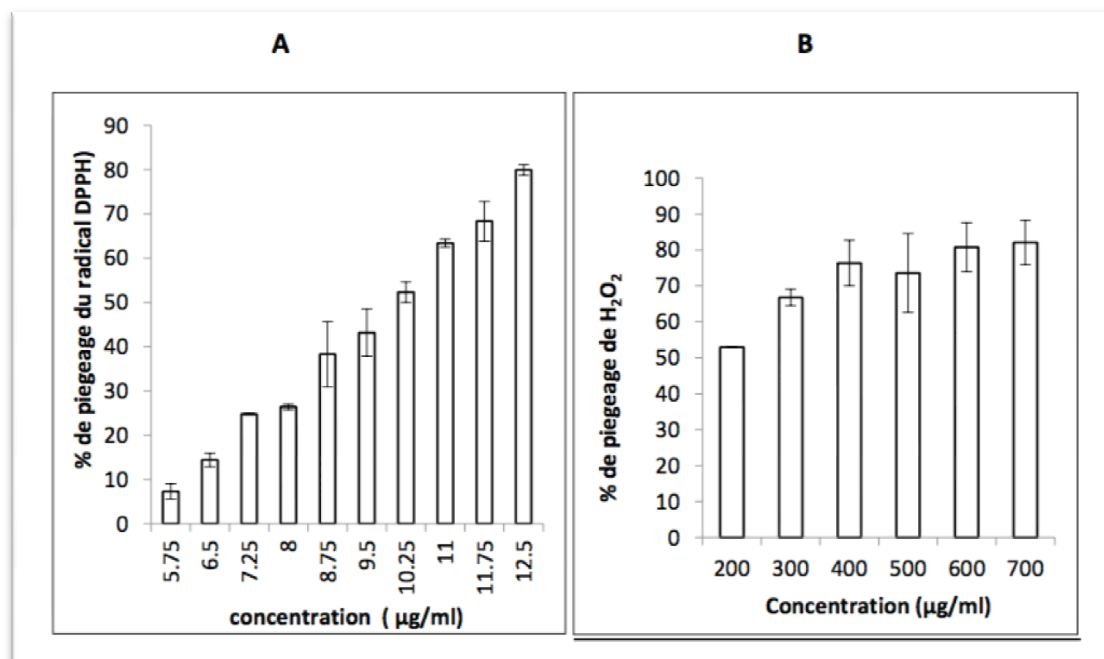


Figure 16 : Capacité de piégeage de l'extract aqueux de *Pistacia lentiscus* L. en fonction de la concentration **A.** du radical DPPH **B.** du peroxyde d'hydrogène.

Le test de piégeage du radical DPPH est le plus utilisé dans l'étude antioxydante (ALAM *et al* 2013). La plupart des antioxydants d'origine végétale possèdent des groupements hydrox phénols dans leur structure. Ces propriétés structurales leur attribuent en partie la capacité à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles et superoxydes. Ce phénomène de piégeage de radicaux libres par les antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes : libération d'un atome d'hydrogène et/ou libération d'un électron.

Dans le cas des composés phénoliques, le principal mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par transfert de l'atome d'hydrogène sur le radical DPPH pour le transformer en molécule stable (POPOVICI *et al* 2012).

Pour mieux comparer l'effet anti-radicalaire de notre échantillon à celui de l'acide ascorbique nous avons déterminé le paramètre IC₅₀. Ce paramètre correspond à la concentration de l'agent antioxydant nécessaire pour piéger 50% de radicaux libres. En ce qui concerne le piégeage du radical DPPH, Ce paramètre est évalué en se basant sur la

Résultats et discussion

représentation graphique illustrée dans la figure 17. Elle représente l'évolution du pourcentage de piégeage en fonction de la concentration de l'extrait aqueux. Ainsi, le IC50 est évalué à $6,71 \pm 0,19$ et $9,86 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$ respectivement pour l'acide ascorbique et l'extrait aqueux de *P. lentiscus* L. L'étude statistique a révélé une différence très hautement significative entre les deux agents anti radicalaires dans l'intervalle de concentrations considérées

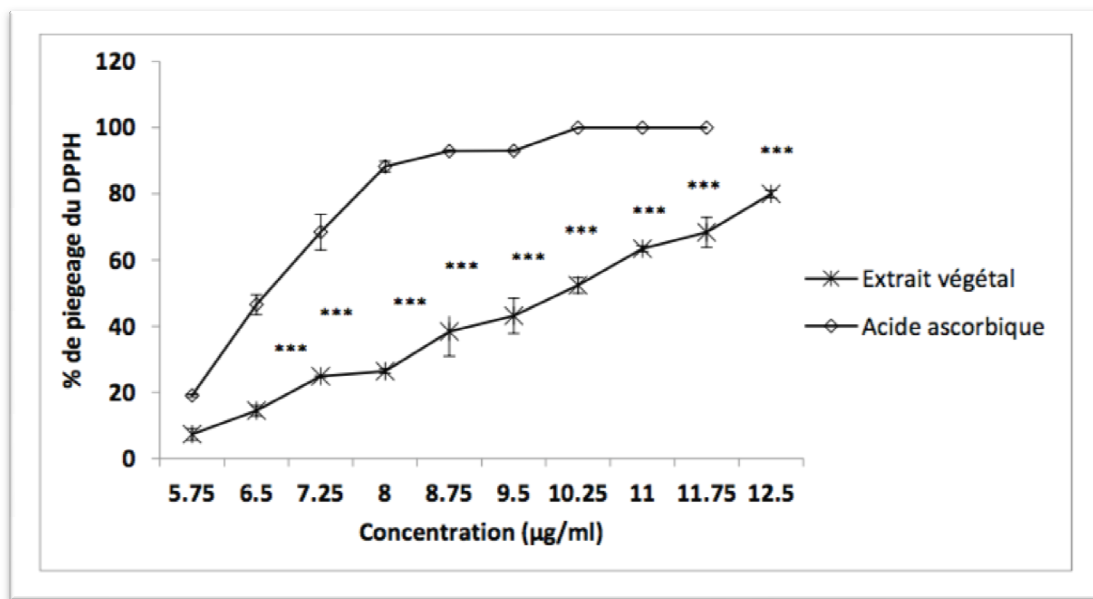


Figure 17 : Comparaison de la capacité de piégeage du radical DPPH par l'extrait aqueux de *P. lentiscus* avec celle de l'acide ascorbique.

La valeur IC50 déterminée dans notre étude est comparable à celle rapportée par la littérature. AHMAD et collaborateurs (2008) ont signalé une valeur d'IC50 de $11.5 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait de *P. integerrima*. BEGHLAL et ses collaborateurs (2015) ont évalué ce paramètre à $12,8 \mu\text{g/ml}$ pour l'huile essentielle de feuilles de *P. lentiscus* L. récoltées au Maroc.

Pour la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène, la valeur d'IC 50 représente la concentration de l'agent antioxydant nécessaire pour piéger 50% de peroxyde d'hydrogène. Ce paramètre est déterminé à partir de la figure 18 présentant l'évolution du pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène en fonction de la concentration de

Résultats et discussion

l'extrait végétal. Il est évalué à $200 \pm 18,02$ et $183,66 \pm 12,89$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement pour l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* et l'acide ascorbique.

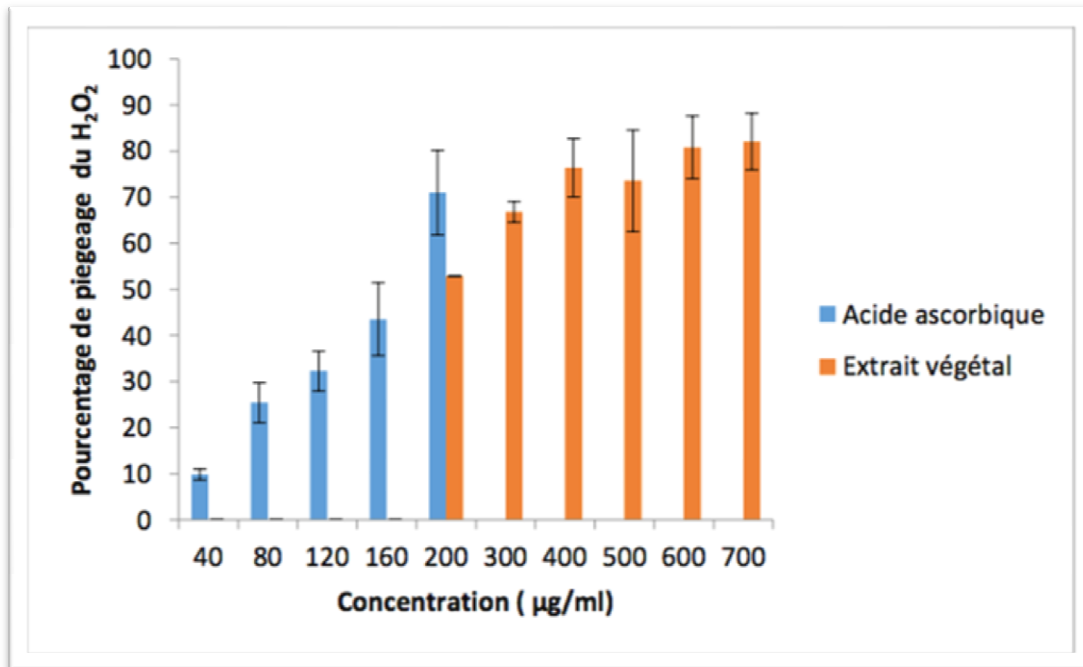


Figure 18 : Comparaison de la capacité de piégeage du peroxyde d’hydrogène par l’extrait végétal avec celle de l’acide ascorbique.

Nos résultats se rapprochent des résultats obtenus par ATMANI *et al* (2008) qui ont signalé, dans leur étude comparative de la capacité antioxydante de plantes médicinales Algériennes, un pouvoir de piégeage du peroxyde d’hydrogène compris entre 22,5 et 75%. Ce pouvoir antioxydant est obtenu à partir de 100 $\mu\text{g/ml}$ de différentes fractions d’extraits de feuilles de *P. lentiscus* récoltées dans la région de Bejaia.

2.2. Capacité réductrice

Dans notre étude, la capacité réductrice est déterminée par la réduction du molybdène qui est basée sur la capacité de l’extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* à réduire les ions molybdène Mo (VI) en molybdène Mo (V) qui forme un complexe vert caractérisé par un maximum d’absorption à 695 nm. Nous avons également déterminé la réduction du fer par la réaction colorimétrique basée sur la formation d’un complexe coloré

Résultats et discussion

caractérisé par un maximum d'absorption à 700nm. Une augmentation de la densité optique à 695 et à 700 nm signifie une augmentation de la capacité réductrice du molybdène et du fer respectivement. Comme le montre la figure 19, l'extrait aqueux de *P. lentiscus* présente une capacité réductrice proportionnelle à la concentration de l'extrait végétal allant de 15,62 à 500 µg/ml.

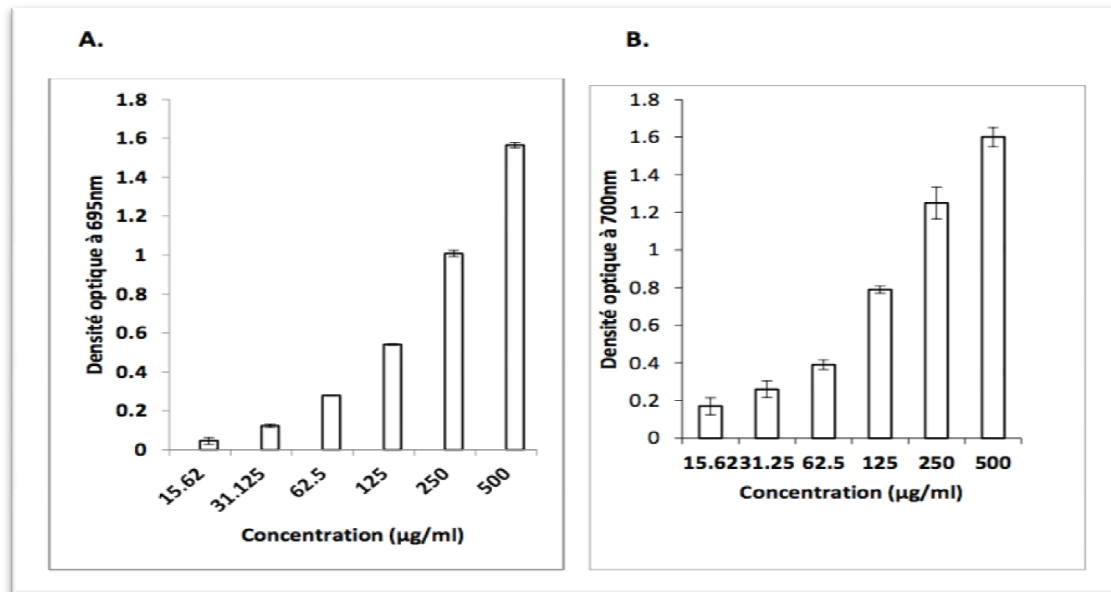


Figure 19 : Capacité de réduction du molybdate (A) et du fer (B) en fonction de la concentration de l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* L.

En comparant nos résultats à ceux obtenus par des travaux récents menés en Algérie, on constate que notre extrait végétal a présenté une meilleure capacité à réduire le fer comparativement à ceux retrouvés par BENHAMMOU en 2012. Elle signale des densités optiques à 700 nm qui varient entre 0,2 et 0,8 pour des concentrations d'extrait méthanoïques de feuilles de *P. lentiscus* récoltées à Tlemcen, allant de 50 à 500 µg/ml. Cependant, nos résultats se rapprochent de ceux retrouvés par DJIDEL et ses collaborateurs (2013). Ils signalent des densités optiques à 700 nm atteignant 1.6 obtenues avec des extraits de feuilles de *P. lentiscus* récoltées dans la région de Bordj Bou Arreridj avec des concentrations comprises entre 50 et 200 µg/ml.

Comparativement à d'autres espèces végétales, l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L., dans les conditions d'extraction de notre étude, a manifesté un pouvoir

Résultats et discussion

réducteur inférieur à celui rapporté par ASQHAR et ses collaborateurs (2016). Ils signalent un pouvoir réducteur similaire au pouvoir réducteur retrouvé lors de notre étude avec une concentration d'extrait aqueux de feuilles de *Carica papaya* L. de 100µg /ml.

Le paramètre IC50 correspond à la concentration de l'agent bioactif nécessaire pour obtenir un effet réducteur de 50%. Pour la réduction du molybdate ce paramètre est déterminé à partir de la représentation graphique illustrée dans la figure **20.A**. Elle représente l'évolution de la capacité réductrice en fonction de la concentration de l'extrait végétal et de l'acide ascorbique. Ainsi, nous avons déterminé que l'extrait aqueux de *P. lentiscus* et l'acide ascorbique présentent une valeur IC50 de $108,46 \pm 6,04$ et $362,5 \pm 2\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Dans le test de réduction du fer, la valeur IC50 correspond à la concentration de l'agent réducteur qui permet d'obtenir une densité optique de 0,5. Ce paramètre est déterminé à partir de la représentation graphique illustrée dans la figure **20 .B**. Elle représente l'évolution de la capacité réductrice en fonction de la concentration des deux agents antioxydants considérés. IC50 retrouvé pour l'extrait aqueux de *P. lentiscus* et de l'acide ascorbique est respectivement de $54,06 \pm 12,16$ et $38,92 \pm 3,16\mu\text{g /ml}$.

Résultats et discussion

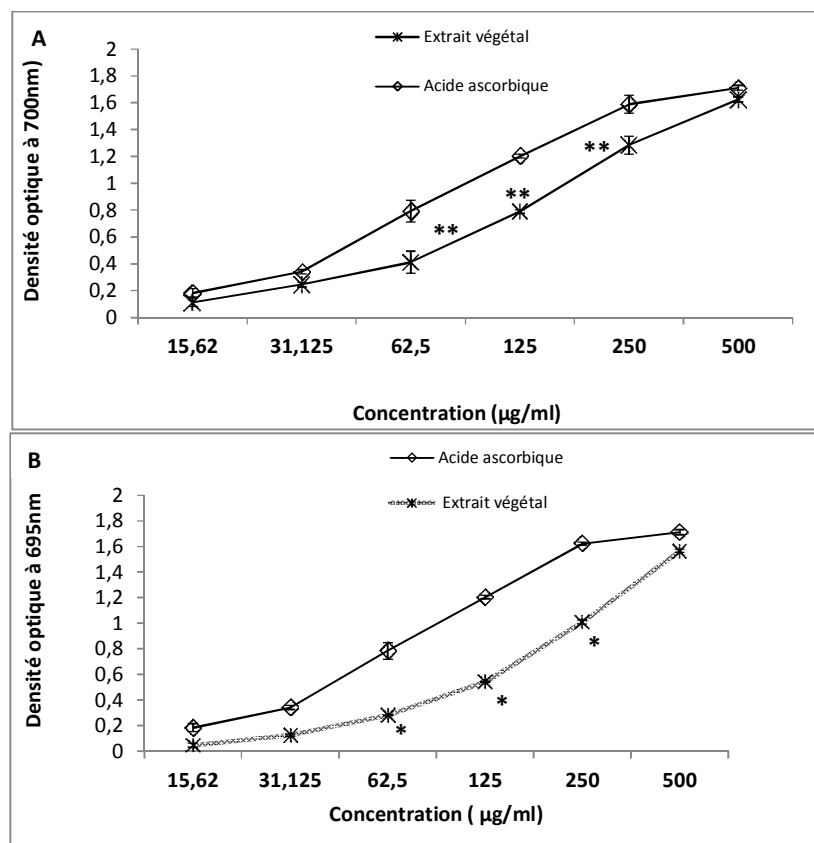


Figure 20: Capacité de réduction de l'extrait aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus* L. (A) du molybdène (B) de fer.

L'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* a manifesté une bonne capacité réductrice du fer comparativement aux travaux signalé par ZHANG et *al*, (2011). Ils rapportent des valeurs d'IC50 comprises entre 33,24 et 138,8 $\mu\text{g/ml}$ dans leur étude portant sur l'effet antioxydant d'extraits de canne de raisins cultivées en Chine. L'activité antioxydante n'est pas liée uniquement à la capacité de piégeage des radicaux libres et de l'activité réductrice.

Le tableau suivant résume les propriétés antioxydantes de l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* et de l'acide ascorbique.

Résultats et discussion

Tableau 2 : Principales propriétés antioxydantes de l'extrait aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus* et de l'acide ascorbique.

Propriétés antioxydantes	IC50 (µg/ml)	
	Extrait aqueux	Acide ascorbique
Capacité de piéger le radical DPPH	9,86 ± 0,37	6,71 ± 0.19
Capacité de piéger le peroxyde d'hydrogène	200 ± 18,02	183,66 ± 12,89
Capacité de réduction du fer	54,06 ± 12,66	38,92 ± 3,16
Capacité de réduction du molybdène	400 ± 22,3	240,46 ± 12,04

Ce pouvoir antioxydant des feuilles de *P. lentiscus* est lié à sa composition. Récemment, RABAHI et ses collaborateurs (2016) ont purifié à partir de *P. lentiscus* L. une protéine : la lectine. Cette protéine a présenté des activités anti oxydantes très intéressantes notamment un pouvoir réducteur et une capacité de piégeage du radical DPPH et du peroxyde d'hydrogène.

3. Effet protecteur de l'extrait aqueux vis-à-vis de la cellule érythrocytaire

3.1. Innocuité de l'extrait vis-à-vis de la cellule érythrocytaire

Les taux d'hémolyse obtenu après incubation des érythrocytes en absence et en présence des différentes concentrations d'extrait végétal sont résumés dans le tableau 3. L'innocuité de l'extrait aqueux *P. lentiscus* vis à vis des hématies est déterminée pour une concentration maximale de 1000 µg/ml. D'après nos résultats (Tableau 3), on peut déduire que la présence des hématies au contact des différentes concentrations de l'extrait végétal ne provoque qu'une hémolyse modérée. Les pourcentages d'hémolyse obtenus sont compris entre 5,052 ± 1,5% et 8,32 ± 0.66%.

Résultats et discussion

Tableau 3: Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration d'extrait de feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

Concentration de l'extrait végétal (µg/ml)	Hémolyse (%)
Contrôle	1,79 ± 0,78
62,25	5,05 ± 1,56
125	5,97 ± 1,33
250	6,20 ± 1,90
500	5,67 ± 0,49
1000	8,32 ± 0,66

Cette hémolyse modérée a également été confirmée par GANGWAR et collaborateurs(2014) qui considèrent une concentration de 100µg/ml d'un extrait végétal qui induit une hémolyse de 14% non hémolytique. Ces mêmes auteurs attribuent cet effet protecteur contre l'hémolyse à la capacité des composés bioactifs à interagir avec les lipides présents dans la monocouche externe de la membrane érythrocytaire sans pénétrer profondément dans la partie hydrophobe de la membrane. D'autres ont signalé un effet protecteur contre l'hémolyse lié à une incorporation de composés bioactif d'origine végétale dans la partie hydrophobe de la membrane érythrocytaire (BONARSKA-KUJAWA *et al.*, 2011).

3.2. Effet protecteur de l'extrait aqueux face à un stress osmotique

L'influence de l'extrait sec aqueux de feuilles de *P. lentiscus* sur la fragilité osmotique des érythrocytes est déterminée en mesurant leur résistance à l'hémolyse dans des concentrations croissantes de solutions salines. Les pourcentages d'hémolyse obtenus en fonction des différentes concentrations de NaCl et en présence de concentrations variées de l'extrait végétal sont représentés dans la figure 21.

Résultats et discussion

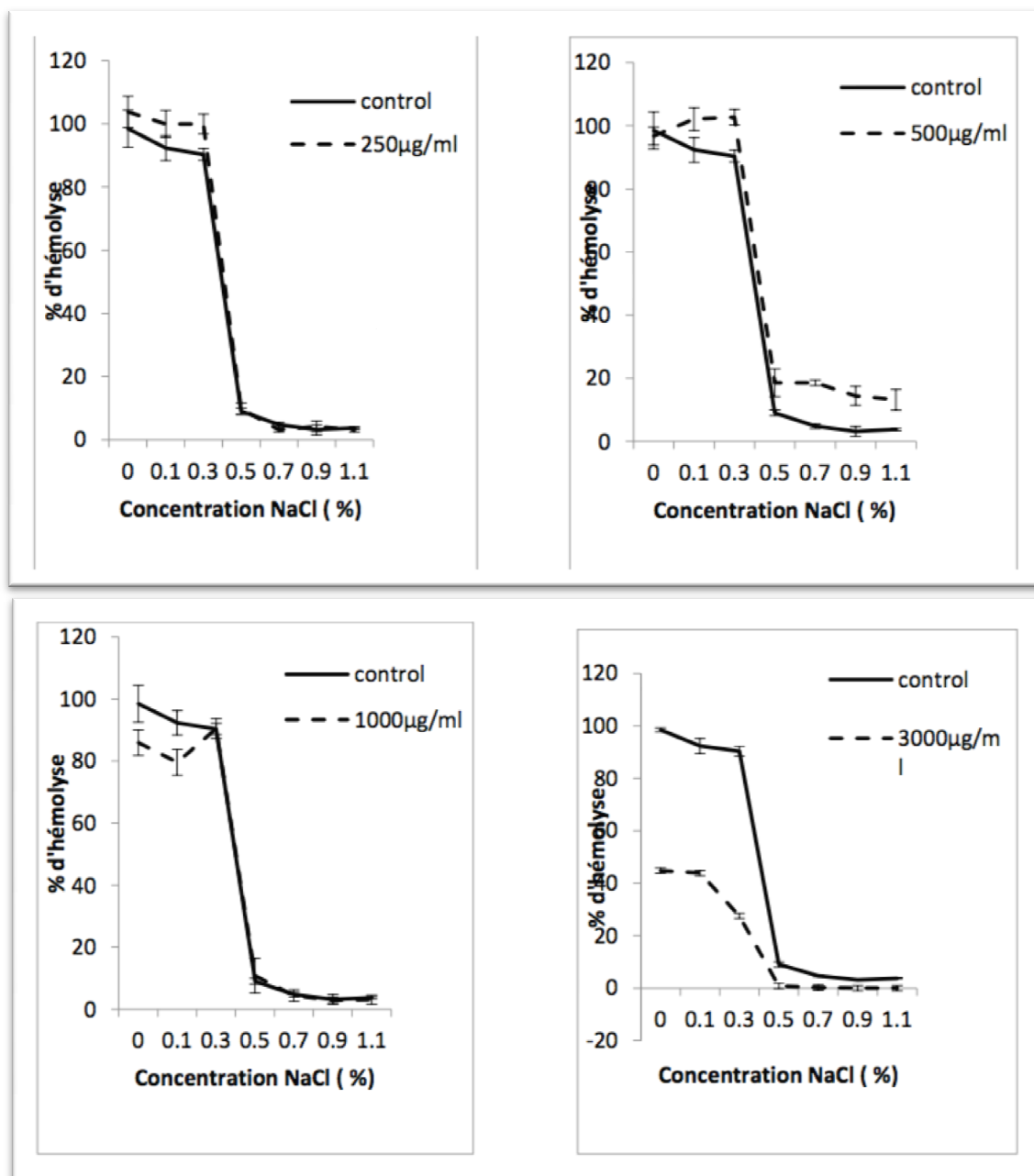


Figure 21 : Fragilité osmotique en absence et en présence de différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* L.

Pour mieux analyser les résultats illustrés dans la figure précédente, nous nous sommes basé sur l'analyse des principaux paramètres de la courbe représentant l'évolution du pourcentage d'hémolyse en fonction de concentrations croissantes de NaCl. Lorsque des hématies sont placées dans des concentrations variables de NaCl, il se produit le

Résultats et discussion

phénomène d'osmose. Ce phénomène consiste en un échange d'eau, à travers la membrane cytoplasmique, du compartiment hypotonique vers le compartiment hypertonique et induit une hémolyse. Le pourcentage d'hémolyse en présence de concentrations croissantes de NaCl présente une relation sigmoïde qui obéit à l'équation de Boltzmann d'équation :

$$y = \left(\frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(S-H50)/ds}} \right) + A_2$$

La représentation graphique ainsi que les paramètres caractéristiques de cette équation sont illustrés dans la figure 22.

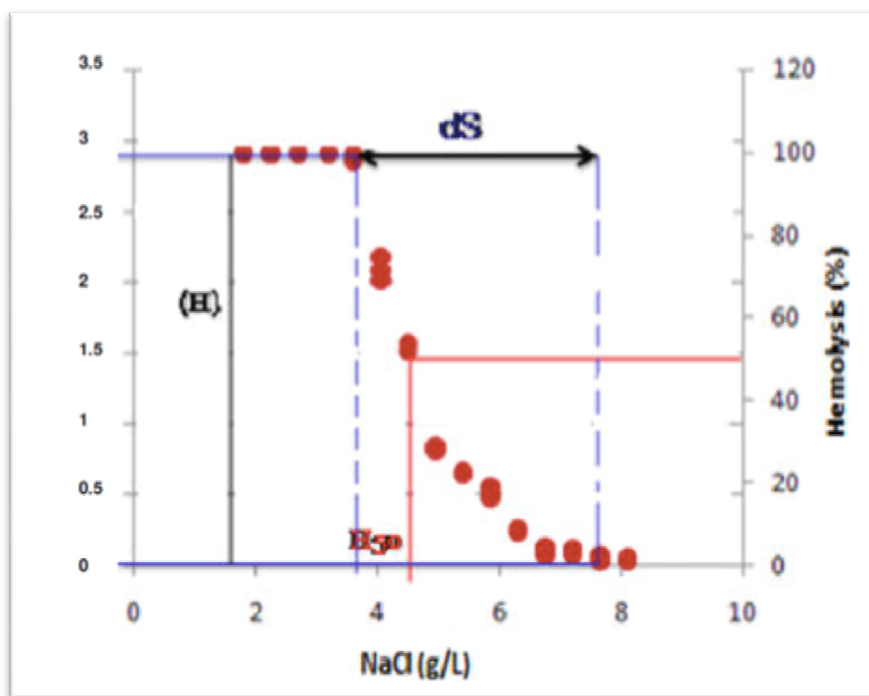


Figure 22 : Représentation graphique de l'équation de Boltzmann (HABTI et *al.*, 2010)

A partir de la figure 22, nous avons regroupé dans le tableau 4 les différents paramètres (H, H50 et Ds) qui caractérisent les représentations graphiques retrouvées en absence et en présence des différentes concentrations de l'extrait végétal à savoir 3 -1 -0,5 et 0,25mg/ml sont résumés dans le tableau 4.

Nous pouvons analyser nos résultats en comparant les paramètres H, H 50 et Ds en absence et en présence des différentes concentrations de l'extrait végétales considérées à

Résultats et discussion

savoir 0,25 - 0,5 – 1 et 3 mg /ml. Le Paramètre H correspond à la densité optique obtenue quand les hématies sont en présence d'une concentration de 0% de NaCl. Il permet d'analyser la résistance de la membrane érythrocytaire face à une pression osmotique maximale. Une diminution de ce paramètre indique une augmentation de la résistance osmotique. H50 correspond à la concentration de NaCl pour laquelle on obtient 50% d'hémolyse. Paramètre Ds correspond à la différence de concentration de NaCl entre le début et la fin du phénomène d'hémolyse.

Tableau 4 : Différents paramètres H, H50 et Ds en absence et en présence des différentes concentrations d'extrait aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

Concentration de l'extrait (µg/ml)	H	H50	Ds
Témoin	1,73±0,02	0,42±0,05	0,2±0.07
250	1,75±0,04	0,44±0,09	0,18±0.03
500	1,55±0,68	0,5±0,07	0,21±0.01
1000	1,45±0,22	0,42±0,05	0,23±0.012
3000	0,73±0,01*	0,35±0,022*	0,44±0.054**

L'étude statistique révèle que la concentration de 3mg /ml d'extrait végétal influence significativement H et H50 et très significativement Ds alors que les concentrations comprises entre 0,25 et 1 mg /ml n'ont aucune influence significative sur l'hémolyse.

Un composé est considéré stabilisateur des hématies dans un stress osmotique s'il induit une augmentation de Ds associée à une diminution de H50 et de H. Inversement, il est déstabilisateur s'il induit une diminution de Ds associée à une augmentation de H50 (DE FREITAS *et al* 2008). Sur cette observation nous pouvons conclure un effet stabilisateur des hématies dans un stress osmotique pour une concentration de 3mg/ml d'extrait aqueux de *P. lentiscus*.

Le degré de résistance des globules rouges à la lyse suite à la diminution de la concentration de NaCl est la base de l'essai de la fragilité osmotique. Ce test est utilisé

dans le diagnostique de certaines maladies hématologiques telles que l'anémie hémolytique et la sphérocytose. L'osmose est un mouvement passif de l'eau à travers une membrane. Ce mouvement a lieu pour équilibrer la pression osmotique de part et d'autre des deux compartiments. Cette pression est définie comme étant la pression hydrostatique nécessaire pour empêcher le flux net d'eau à travers la membrane séparant deux compartiments de concentration différente en soluté. L'eau traverse la membrane cytoplasmique à travers des canaux constitués de protéines transmembranaires appelés les aquaporines. Le principal rôle de ces protéines est de faciliter le transport de l'eau à travers la membrane cytoplasmique. Leur rôle est mis en évidence par l'apparition de pathologies liées à une altération de leur fonction telle que le glaucome. FIORENTINI et collaborateurs (2015) ont mis en évidence l'implication de polyphénols dans le traitement de pathologies liées à une perturbation dans l'expression des aquaporines.

3.3. Effet protecteur de l'extrait face à un stress oxydant

3.3.1. Action de l'acide hypochloreux (HOCl) sur les hématies

Les concentrations de l'acide hypochloreux de 0,075 et 0,15% sont hémolytiques. Elles induisent respectivement 60 et 100% d'hémolyse. Alors que la concentration de 0,0375 % est sans effet (figure 23). Les taux d'hémolyse obtenus sont très hautement significatif comparativement au taux obtenu en absence de l'agent oxydant comme le montre la figure 23.

L'acide hypochloreux (HOCl) est un oxydant biologique extrêmement toxique généré par les neutrophiles et les monocytes. Il est considéré comme l'un des facteurs les plus importants causant des lésions des tissus au cours de l'inflammation. C'est un agent chlorant et oxydant fort possédant des cibles cellulaires marquées et provoque notamment l'oxydation des groupements thiols de la membrane cytoplasmique.

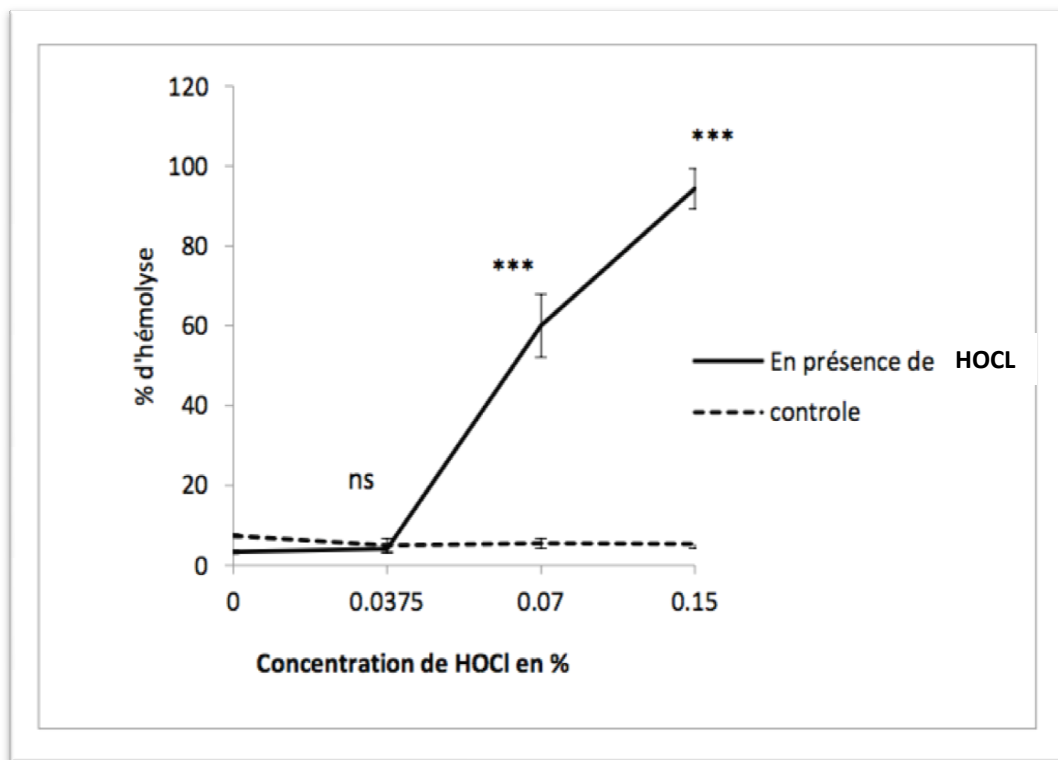


Figure 23 : Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de l'acide hypochloreux.

Les érythrocytes sont très sensibles à l'attaque par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en raison de leur grande teneur en acides gras polyinsaturés dans la membrane cytoplasmique et de la présence de fer dans l'hémoglobine. L'ion hypochloreux est en effet considéré comme étant un oxydant puissant. Dans son étude sur les mécanismes d'action de l'ion hypochloreux sur les fonctions cellulaires, SCHRAUFSTATTER (1990) a trouvé que l'ion hypochloreux à des concentrations de 20 μM induit l'oxydation des groupements SH membranaires, l'oxydation des acides aminés ainsi que des perturbations du transport transmembranaire de glucose et de l'ion K^+ .

Il est bien établi que l'exposition des globules rouges humains à de faibles doses de HOCl induit la diminution de la concentration intracellulaire du glutathion réduit. L'hémolyse est ainsi due à la formation de pores hémolytiques formés par la réticulation des protéines membranaires (VISSERS et *al.*, 1995 ; VISSERS et *al.*, 1998). La bande 4.1 est une

Résultats et discussion

protéine importante de l'édifice du cytosquelette membranaire érythrocytaire. Les effets des agents oxydants sur cette protéine ont été étudiés. Ces agents induisent une déstabilisation de cette protéine membranaire par une augmentation du taux de méthylation et par isomérisation des résidus aspartyls (INGROSOO *et al.*, 2000).

En outre, l'ion hypochloreux peut affecter la membrane biologique par son action sur les acides gras poly insaturés et sur le cholestérol membranaire. L'interaction d'un composé avec les membranes biologiques est fortement liée à son caractère lipophile.

3.3.2. L'effet de l'extrait aqueux sur les hématies en présence d'un stress oxydant.

L'effet de l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* L. sur l'activité hémolytiques induite par les ions OCl^- est illustré dans la figure 24. Un effet protecteur significatif vis-à-vis de l'hémolyse est observé pour toutes les concentrations testées.

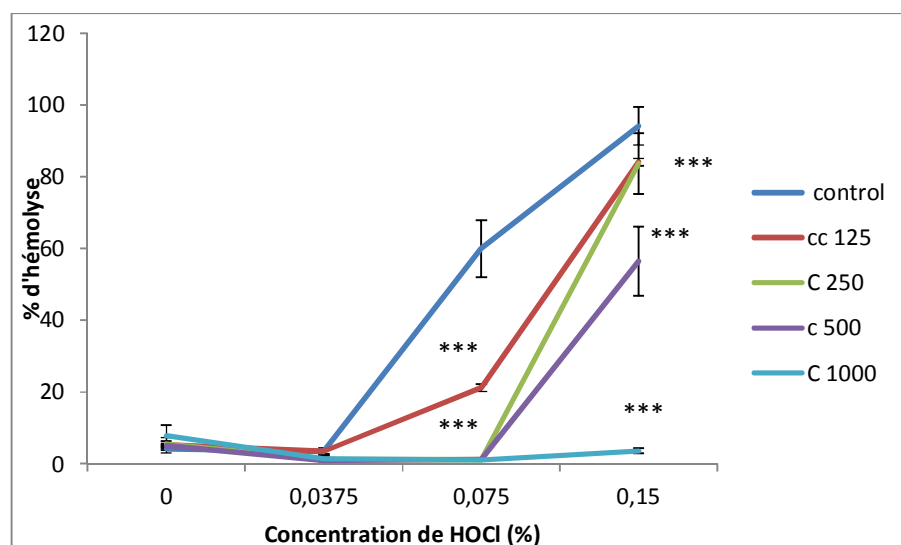


Figure 24 : Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de HOCl en absence et en présence de différentes concentrations d'extrait de feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

Comme nous pouvons le constater dans la figure 24, l'effet protecteur de l'extrait de feuilles *P. lentiscus* s'étend même à des concentrations de l'ion hypochloreux induisant un taux très élevées d'hémolyse. En effet, le taux d'hémolyse de 94% des hématies, induit par 0.15% HOCl, est réduit à seulement 3,5% en présence de 1000 mg/ml de l'extrait végétal. Ce résultat indéniablement prouve l'effet protecteur de l'extrait aqueux de *P. lentiscus* contre le stress oxydatif induit par les ions HOCl sur les hématies.

Dans le cas de stress oxydatif il y a peroxydation des lipides membranaires et une augmentation du rapport cholestérol/phospholipides. Ces modifications induisent une augmentation de l'asymétrie et de la rigidité membranaire qui ont pour conséquences une diminution de la fluidité et de la déformabilité de la membrane érythrocytaire (TOLOOEI et MIRZAEI, 2015). HOSSEINZADEH et ses collaborateurs (2012) ont rapporté l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires érythrocytaire par un traitement des érythrocytes par un extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. pour des concentrations allant de 25 à 1000 µg/ml.

La protection des érythrocytes par les composés phytochimiques est rapportée par la littérature. L'hémolyse peut être réduite en présence du trans 3,5,4'-trihydroxy stilbène, un polyphénol très répandu dans le règne végétal (SUWALSKY *et al.*, 2015).

3.3.3. Effet protecteur de l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* L. sur l'hémolyse induite par la saponine

3.3.3.1. Effet hémolytique de la saponine

L'évolution du pourcentage d'hémolyse en fonction de concentrations croissantes de saponine est illustrée dans la figure 25. L'activité hémolytique de la saponine est observée à partir d'une concentration supérieure à 12,5 µg/ml. Cette capacité hémolytique est croissante pour les concentrations de saponine comprises entre 12,5 et 100µg /ml. Un pourcentage de 100% d'hémolyse est obtenu lorsque les hématies sont placées en présence d'une concentration de 100 µg/ml de saponine. A partir de cette représentation graphique nous avons évalué le paramètre IC₅₀ qui représente la concentration de saponine

Résultats et discussion

qui permet d'obtenir l'hémolyse de 50% des hématies. Il est évalué à $33,91 \pm 2,87 \mu\text{g/ml}$.

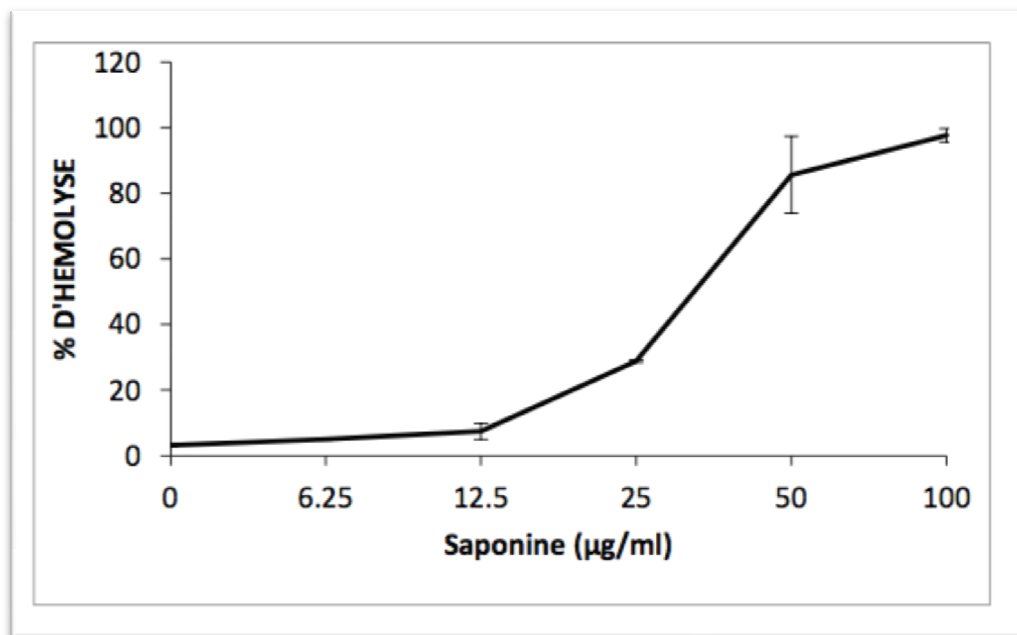


Figure 25 : Pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de saponine.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportées par ARABSKI et collaborateurs (2012) qui signalent une activité hémolytique de la saponine pour des concentrations comprises entre 25 et 100 $\mu\text{g/ml}$. Les hématies sont caractérisées par une forte proportion en cholestérol (20 à 40 %). Ce stérol est essentiel dans la membrane cytoplasmique des eucaryotes. Il permet de moduler les propriétés physiques des membranes par rapport à leur fonction biologique. Les saponines sont des glycosides naturels amphiphiles, donc dotées d'une activité de surface. FRENKEL et ses collaborateurs (2014) ont étudié l'effet de la digitonine, une saponine végétale, sur des membranes artificielles. Ils ont mis en évidence des interactions spécifiques de la saponine par sa fraction glucidique avec le cholestérol.

Les saponines se combinent avec les stérols de la membrane érythrocytaires, en particulier le cholestérol. Les complexes formés entraînent une modification de la perméabilité de la membrane érythrocytaire et la libération de l'hémoglobine à travers des pores (BÖTTGER *et al.*, 2012).

LORENT et ses collaborateurs (2013) ont proposé un model dans lequel ils décrivent le mécanisme impliqué dans la perturbation de la membrane cytoplasmique

induite par les saponines. Ils décrivent l'interaction qui s'établit entre le cholestérol et la saponine qui aboutit à une perturbation de l'édifice membranaire par formation de bourgeonnements.

3.3.3.2. Action de l'extrait de feuilles de *Pistacia lentiscus* L. sur l'action hémolytique de la saponine

L'effet protecteur de l'extrait de feuilles de *P. lentiscus* face à l'action hémolytique de la saponine, un agent déstabilisant de la membrane érythrocytaire, est mis en évidence par l'action d'une concentration finale de 50 µg/ml de saponine en présence et en absence de 500 et 1000 µg/ml d'extrait végétal. Comme le montre la figure 26, la présence de l'extrait de *P. lentiscus* a réduit de manière hautement significative l'effet hémolytique induit par la saponine. En effet la concentration de 1000 µg/ml de l'extrait végétal a permis de réduire la population de cellules hémolysées par la saponine de 75% à moins de 10 %.

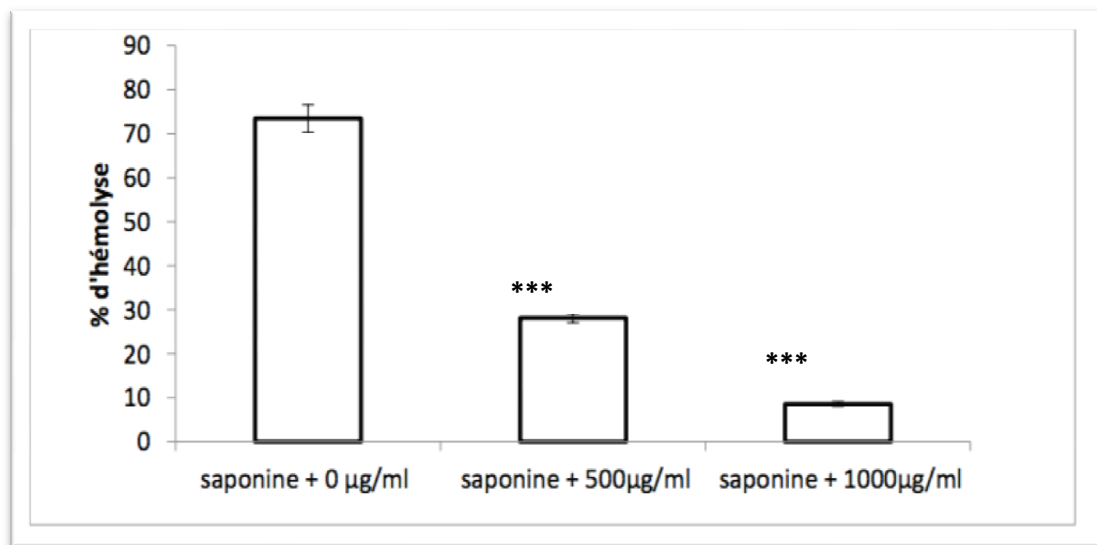


Figure 26 : Pourcentage d'hémolyse lié à la présence de saponine en absence et en présence de 500 et 1000 µg/ml d'extrait de feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

L'extrait aqueux de feuille de *P. lentiscus* 1000 µg/ml a présenté une capacité protectrice vis-à-vis de l'hémolyse cet effet protecteur des composés phytochimiques est

Résultats et discussion

principalement liée à la capacité antioxydante.

L'efficacité des composés phytochimiques dans la protection des érythrocytes peut être démontrée par l'effet de ces composés dans certaines pathologies. NGBOLUA *et al* (2013) ont démontré la capacité des anthocyanes à modifier la forme des globules rouges drépanocytaires de la forme falciforme (anormale) à la forme biconcave (normale).

4. Effet antibactérien de l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* L.

L'effet antibactérien de l'extrait sec de feuilles de *P. lentiscus* L. est testé sur 6 souches bactériennes de référence à savoir : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Enterococcus faecalis* ATCC 49452. Les zones d'inhibition obtenues sont comprises entre $10,00 \pm 0,81$ et $17,00 \pm 1,63$ et sont regroupées dans le tableau suivant.

Tableau 5 : Diamètre des zones d'inhibition en mm.

Microorganismes	Zones d'inhibition (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	$11,33 \pm 1,10$
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	$10,00 \pm 0,81$
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	$12,31 \pm 0,17$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	$17,00 \pm 1,63$
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC49452	$11,00 \pm 1,00$

Dans cette étude les bactéries de référence Gram négatif sont représentées par des Entérobactéries à savoir : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, et

Résultats et discussion

Citrobacter freundii ATCC 8090. Pour les bactéries Gram positif nous avons sélectionné : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC49452 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Les résultats obtenus indiquent qu'une concentration de 10 mg/ml de l'extrait végétal possède une activité antibactérienne sur la majorité des souches testées, mais inactif sur *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'analyse du tableau 5 révèle que l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* est plus actif sur les bactéries Gram + comparativement aux bactéries Gram -. La résistance des bactéries Gram - aux agents antibactériens est décrite dans la littérature. Elle est attribuée à la présence de la couche externe présente chez les bactéries Gram- mais inexistante chez les Gram+. Cette observation est également rapportée vis-à-vis des extraits végétaux. Des travaux ont signalé une activité antibactérienne à partir de différentes parties de *P. lentiscus* L. Cette activité est attribué aux constituants majoritaires contenu dans l'extrait végétal, tel que α -pinène et le linalol (KOUTSOUDAKI *et al.*, 2005 ; BOZORGI *et al.*, 2013).

La taille de la zone d'inhibition, dépend essentiellement de la capacité de diffusion, dans le milieu gélosé, des différents composés contenus dans l'extrait végétal brut. Cette capacité est associée à la polarité des substances diffusibles (CARNEIRO *et al.*, 2008).

Les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. retrouvée lors de cette étude est plus important que celui rapporté par RAJAEI *et al.* (2010) qui signalent des zones d'inhibition entre 11.7 et 12.6 mm lors d'une étude sur l'extrait de graines de *P. vera* vis-à-vis de souches de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la première concentration pour laquelle on n'observe aucune zone d'inhibition au tour des disques imprégnés de différentes concentrations d'extrait végétal. Les CMI obtenues sont regroupées dans le tableau 6. Ces CMI oscillent entre $5,00 \pm 0,17$ et $1,25 \pm 0,11$ mg/ml.

Résultats et discussion

Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices de l'extrait aqueux de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis des souches testées.

Microorganismes	Concentration minimales inhibitrices (mg/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4352	5,00 ± 0,17
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	2,50 ± 0,08
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	1,25 ± 0,11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	1,25 ± 0,04
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	2,50 ± 0,08

La CMI est la concentration de l'agent antibactérien qui inhibe toute croissance visible. Cette valeur est indicatrice du pouvoir bactériostatique d'un agent antibactérien.

La notion de résistance et /ou sensibilité des bactéries aux extraits végétaux est difficile à établir. Cette difficulté est liée à la normalisation de la méthodologie et à l'interprétation des résultats. Le principal paramètre qui influence la valeur de la CMI est la méthode de détermination sélectionnée. La technique a une grande influence sur les résultats.

Le comportement d'un germe vis-à-vis d'un agent antibactérien diffère selon la méthode utilisée ce qui rend la comparaison difficile.

L'interprétation des résultats est l'étape finale dans l'analyse de l'effet antibactérien. Pour l'étude des extraits végétaux il n'existe pas de norme qui établit une correspondance entre la valeur de la CMI et la notion de souche résistance ou sensible, comme ce qui existe avec les antibiotiques.

Pour établir l'efficacité d'un extrait végétal brut, AIME et collaborateurs (2015) ont défini l'échelle suivante et considèrent qu'un extrait végétal présente une action :

- Significative vis-à-vis d'une souche si la CMI est inférieure à 100 µg/ml.
- Modérée vis-à-vis d'une souche si la CMI est comprise entre 100 et 625 µg/ml.
- Faible vis-à-vis d'une souche si la CMI est supérieure à 625 µg/ml.

Sur la base de cette échelle l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* L. peut être considéré faible. Cet effet antibactérien limité peut s'expliquer, par la méthode d'extraction. En effet, l'action antibactérienne est étroitement liée à la composition de l'extrait végétal brut. Elle est proportionnelle au constituant majoritaire. Dans ce contexte, YIDIRIM *et al* (2001) ont observé une différence de l'effet antibactérien d'extrait de feuilles de *Rumex crispus* L. en fonction du solvant d'extraction. Ils ont noté les plus basses valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenues avec l'extraction aqueuse comparativement aux autres solvants.

5. Analyse de l'effet anti cancer de l'extrait éthanolique d'*Origanum majorana* L.

5.1. L'extrait éthanolique d'*Origanum majorana* L. inhibe la prolifération de cellules du cancer du sein et du poumon.

Nous avons examiné l'effet de concentrations croissantes d'extrait éthanolique de feuille d'*O. majorana* sur la viabilité de cellules du cancer du sein (MDA-MB-231) et du poumon (A549). L'effet de l'extrait a été évalué après 24 et 48 heures de traitement. Comme on peut l'apprécier dans la figure 27A pour les MDA-MB-231 et la figure 27B pour les cellules A 549, l'extrait d'*O. majorana* induit une diminution de la viabilité cellulaire dans les deux lignées cellulaires cancéreuses. En outre, l'effet sur la viabilité est proportionnel à la concentration de l'extrait utilisée lors du traitement.

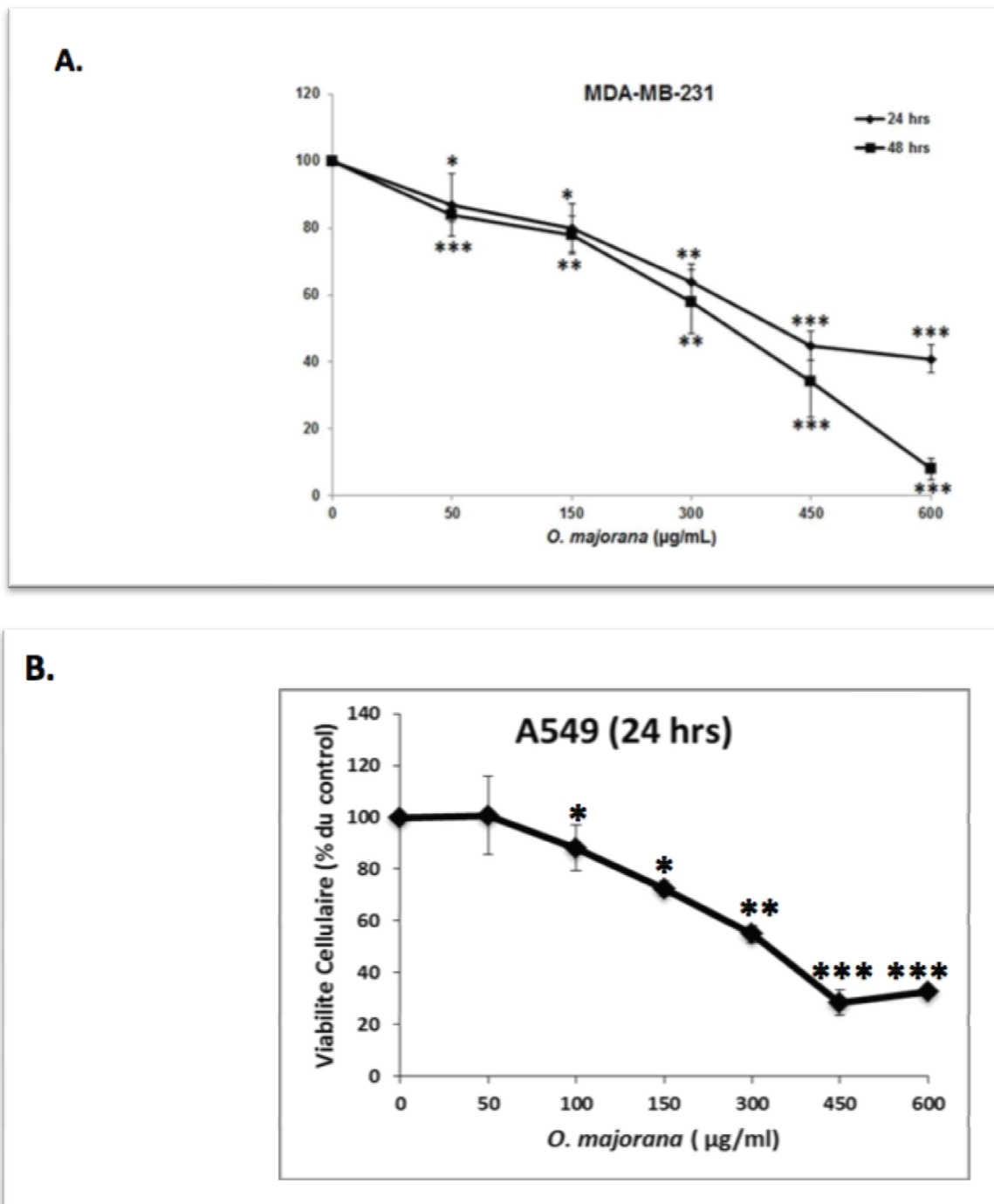


Figure 27 : Effet des différentes concentrations de l'extrait d'*Origanum majorana* L. sur la viabilité des cellules du cancer humain du sein B des cellules du cancer humain du poumon.

Résultats et discussion

La concentration d'extraits végétal nécessaires pour réduire la viabilité cellulaire de 50% représente l'IC50. Ce paramètre permet une bonne comparaison de l'effet cytotoxique induit par différents type extrait végétal. L'effet cytotoxique est inversement proportionnel à ce paramètre. Il a été évalué à 400 et 350 µg/ml respectivement pour 24 et 48 heure de traitement pour MDA-MB-231 et 350µg/ml pour les cellules A549.

Nos résultats se rapprochent de ceux signalés par MEZNI *et al.* (2015). Ils se sont intéressés à l'effet d'huile essentielle extraite à partir de feuilles de *P. lentiscus* L. sur la viabilité des cellules cancéreuses BHK 21. Ils ont rapporté une valeur d'IC50 de 290 µg/ml.

L'extrait éthanoïque de feuilles d'*O. majorana* a manifesté un effet sur la viabilité des cellules cancéreuses MDA-MB231 inférieur à celui signalé par EDIRIWEERA et ses collaborateurs (2016). Ils ont étudié l'effet anti cancer de *Mangifer zeylanica* L., une plante endémique de la famille des Anacardiacees. Ils ont signalé des concentrations de 116.5 ± 0.32 et 280 ± 3.44 µg/ml d'extrait végétal pouvant induire une réduction de la viabilité de 50% des cellules cancéreuses MDA-MB231.

SRISAWAT et ses collaborateurs (2015) ont rapporté une valeur nettement inférieure à celle retrouvée dans notre étude. Ils ont évalué l'IC50 d'extrait de fruits de *Vatica diospyroide* L., plante appartenant à la famille des Dipterocarpacea, à $30 \pm 4,3$ µg/ml sur les cellules MDA- MB231.

Nous avons mis en évidence l'influence de l'extrait végétal sur la morphologie des cellules cancéreuses. Les changements morphologiques des deux lignées cellulaires après un traitement avec 600µg/ml d'extrait éthanolique de feuilles d'*O. majorana* après 48 heures est représenté dans la figure 28.

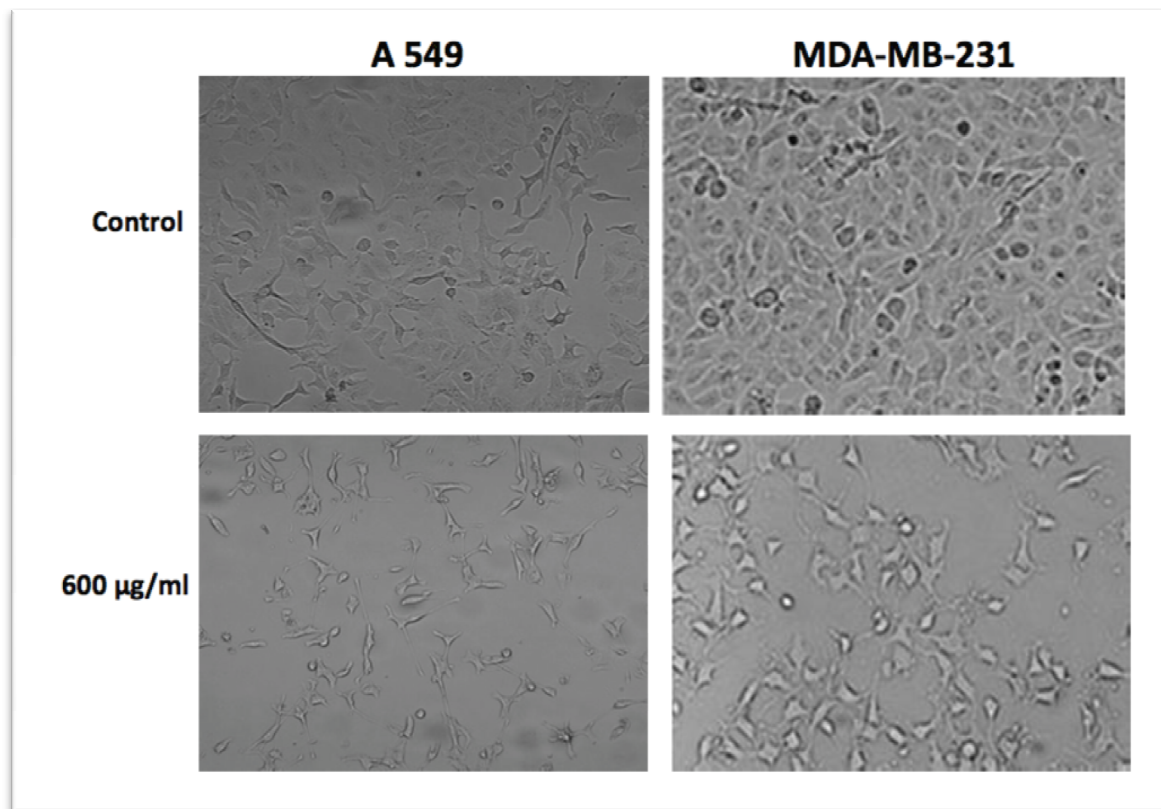


Figure 28: Observation au microscope optique de l'effet de l'extrait de feuilles d'*Origanum majorana* L. sur la morphologie des cellules du cancer humain du poumon et du sein (Grossissement x 200).

Une observation au microscope optique des cellules traitées par l'extrait éthanolique démontre un changement morphologique caractéristique des cellules apoptotiques (figure 28). En effet, on observe, après 24 heures de traitement, une perte de la morphologie épithéliale ainsi que l'apparition d'échinodermes, une diminution du diamètre et un arrondissement des cellules. Pris ensemble, les résultats de viabilité cellulaire ainsi que l'observation morphologique des cellules suggèrent fortement que l'extrait d'*O. majorana* exerce un effet apoptotique sur les cellules cancéreuses de sein et du poumon. L'apoptose est un mode de mort où la cellule intervient dans sa propre destruction. Elle est caractérisée par une réduction du volume cellulaire, la condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire. L'intégrité membranaire est maintenue jusqu'aux étapes finales du processus de mort qui conduit à la formation des corps apoptotiques.

5.2. *Origanum majorana* L. Induit la mort cellulaire par activation de la voie apoptotique

Après avoir démontré l'effet inhibiteur de notre extrait sur la prolifération cellulaire, nous avons examiné si l'effet observé est dû à une mort cellulaire par induction de l'apoptose. Pour cela, nous avons mesuré l'activation du marqueur spécifique de l'apoptose notamment la protéase caspase 3/7 dans les cellules MDA-MB-231. Comme le montre la figure 29, l'extrait d'*O. majorana* induit une augmentation, qui est temps et concentration dépendante, de l'activité de caspase 3/7.

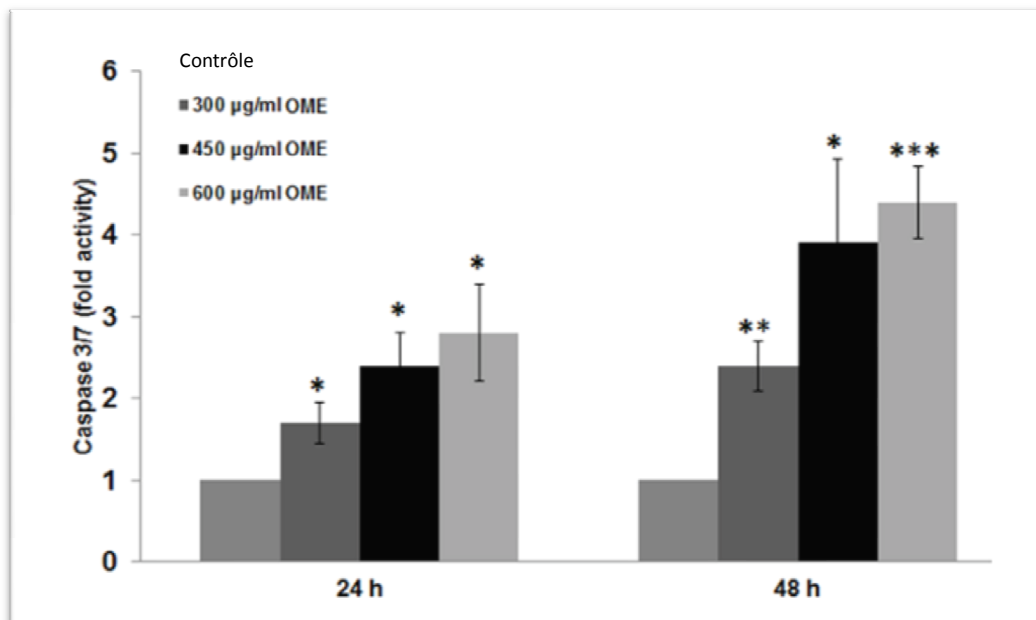


Figure 29 : Activité des caspases 3/7 en fonction du temps au contact de différentes concentrations d'extrait éthanolique de feuilles d'*Origanum majorana* L

Ce résultat démontre clairement que l'extrait éthanolique d'*O. majorana* inhibe la prolifération des cellules cancéreuses par induction de la mort cellulaire par apoptose.

3.3. *Origanum majorana* L. induit un blocage G2/M du cycle cellulaire dans les cellules du cancer du poumon A549.

Les cellules A549 sont traitées avec des concentrations croissantes de l'extrait pendant 24 heures et ensuite soumises à l'analyse par cryométrie de flux de la distribution des différentes phases du cycle cellulaire. Comme il apparaît dans figure 30 et 31, le traitement des cellules A549 avec des concentrations ≥ 450 $\mu\text{g/ml}$ induit une augmentation claire et significative dans les populations G2/M au dépend des populations en phase G1, indiquant un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. En effet, une augmentation de la population G2/M est observée en présence de l'extrait passant de 25% dans les cellules contrôles à 41% dans les cellules traitées. Pas de changement significatif n'a été observé pour des concentrations en extrait ≤ 300 $\mu\text{g/ml}$.

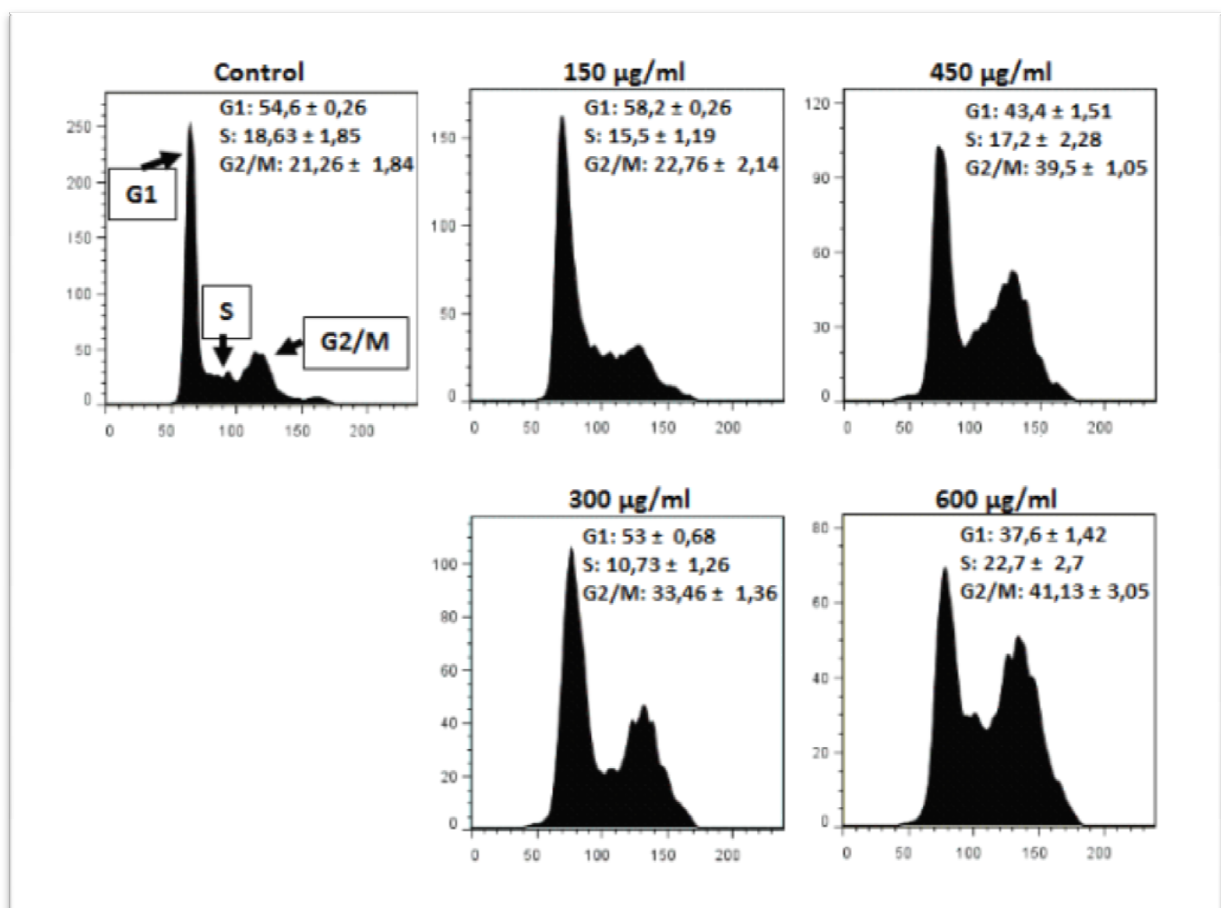


Figure 30 : Cryométrie de flux indiquant le pourcentage de cellules A549 aux différents stades du cycle cellulaire en présence de différentes concentrations d'extrait éthanolique de feuilles d'*Origanum majorana* L.

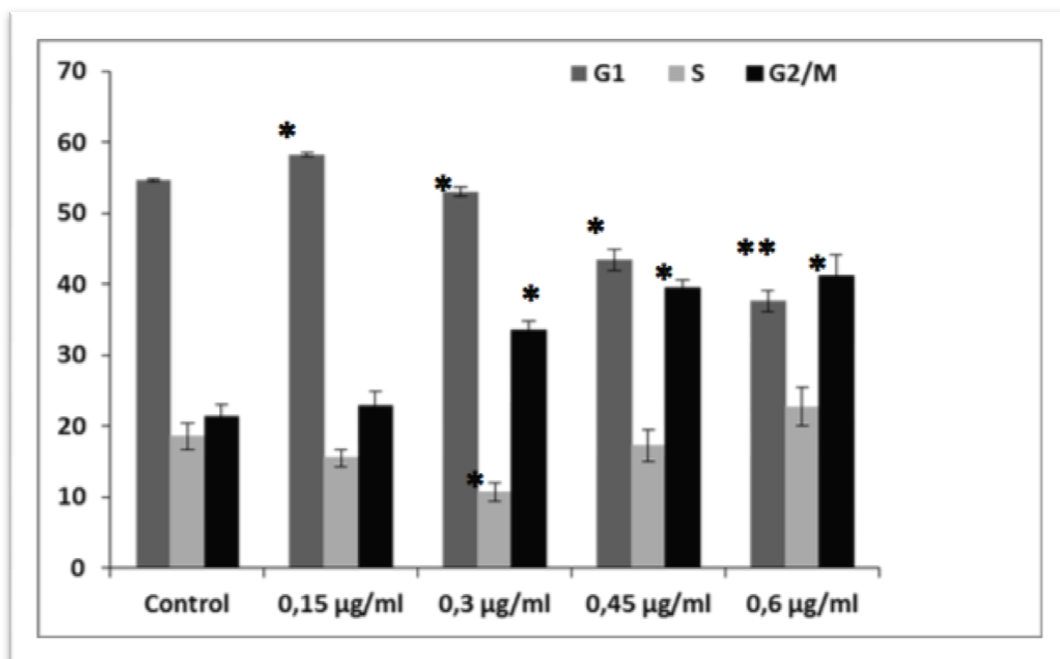


Figure 31 : Pourcentage de cellules A549 aux différents stades du cycle cellulaire en présence de différentes concentrations d'extrait éthanolique de feuilles d'*Origanum majorana* L.

Ce résultat démontre clairement que l'un des mécanismes par lequel l'extrait d'*O. majorana* induit une inhibition de prolifération des cellules cancéreuses impliquerait un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. L'inhibition de la progression du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses est une stratégie efficace pour stopper la multiplication tumorale.

La capacité des molécules anticancéreuses à affecter la distribution du cycle cellulaire peut fournir de précieuses informations sur son mécanisme d'action responsable de l'induction de l'effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses. En effet, pour de nombreuses molécules thérapeutiques, l'effet cytotoxique est précédé par l'induction d'un blocage du cycle cellulaire. YIM et al (2005) ont étudié l'effet du decurcine, un polyphénol isolé à partir de racines d'*Agelica gigas* L. dans le développement de cellules du cancer de la prostate. Ils ont mis en évidence le blocage du cycle cellulaire des cellules cancéreuses en phase G1.

5.4. L'extrait éthanolique d'*Origanum majorana* L. inhibe le potentiel migratoire des cellules de cancer de poumon A549.

Comme le montre la figure 32, le traitement des cellules A549 avec l'extrait d'*O. majorana* induit une inhibition significative de la migration de ces cellules cancéreuses de manière concentration-dépendante. En effet, comme on peut le voir sur la figure, alors que les cellules du contrôle ont pratiquement fermées la lésion, les cellules traitées avec des concentrations de 0,150 et 0,300 $\mu\text{g/ml}$ de notre extrait ont échouées à fermer la lésion.

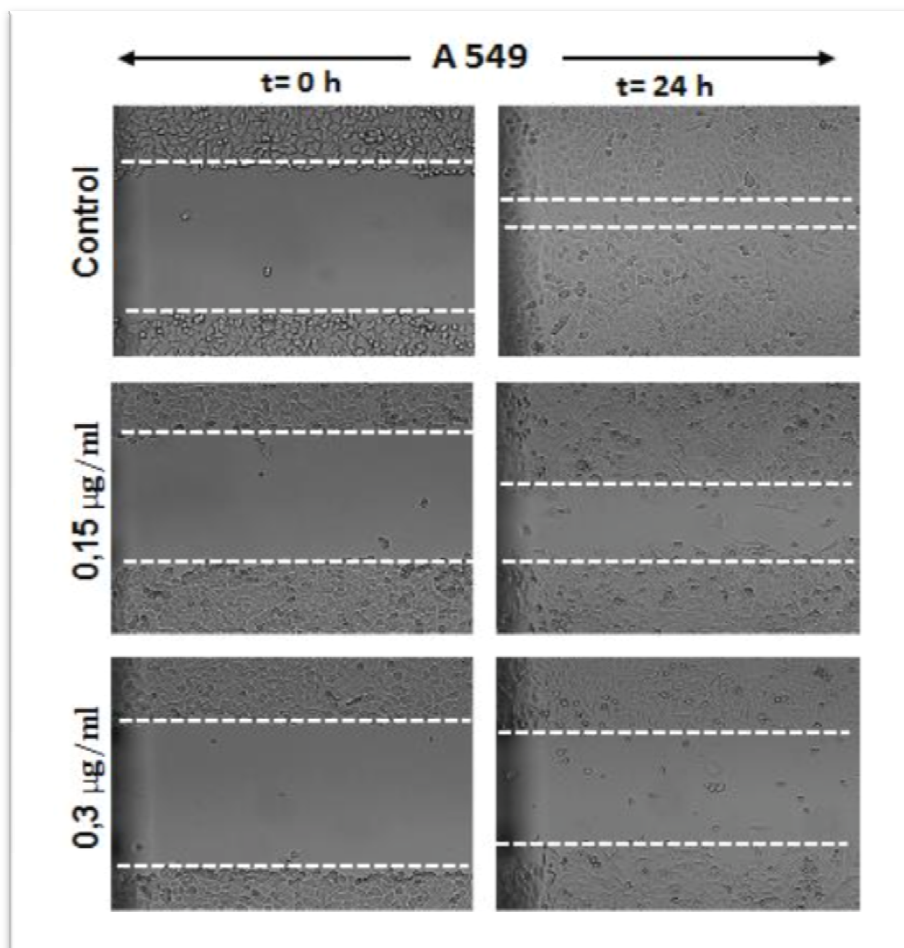


Figure 32 : test de migration cellulaire

Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales, principalement, par leur caractère de prolifération incontrôlé et invasif. Un traitement anti cancer vise donc à

Résultats et discussion

diminuer la multiplication et le pouvoir de migration de ces cellules.

La migration cellulaire joue un rôle crucial dans le processus de métastase des tumeurs. C'est pour cela que nous avons examiné l'effet de l'extrait éthanolique d'*O. majorana* sur le potentiel migratoire des cellules de cancer de poumon A549 en utilisant la méthode dite de cicatrisation (wound-healing). Il est important de souligner que dans cette expérience, nous avons utilisé des concentrations d'extrait et un temps de traitement qui ne sont pas cytotoxique pour la cellule afin d'exclure que l'effet obtenu est dû à une mort cellulaire. Ce résultat démontre clairement l'effet inhibiteur de l'extrait utilisé sur le potentiel migratoire des cellules A549, évènement crucial pour leur métastases à d'autres tissus/organes.

Conclusion

Notre étude a révélé que l'extrait aqueux de *P. lentiscus* présente des activités antioxydantes très intéressantes qui sont :

- Une capacité de piégeage du radical DPPH pour des concentrations allant de 5,75 à 10,25 µg / ml et un IC50 évalué à $9,89 \pm 0,37$ µg / ml.
- Une capacité de réduction du fer avec un IC50 de $54062 \pm 12,16$ µg /ml.
- Une capacité de piéger le peroxyde d'hydrogène proportionnellement à la concentration avec une capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène, atteignant $82,08 \pm 6,13\%$ pour une concentration de 700 µg/ml.
- Une capacité de réduction des ions molybdate estimée à 1,6 mg EAA/mg de matière sèche végétale.

Ce potentiel antioxydant peut s'expliquer par la richesse de l'extrait végétal en polyphénols qui est de 119.77 ± 32 mg équivalent d'acide gallique / g de matière sèche végétale. Cette fraction de composés phytochimiques est représentée par 50,66 % de flavonoïdes et de 21,34 % de tanins. Cette composition peut être à l'origine des effets biologiques démontrés à savoir :

- Une protection des hématies face à un stress oxydatif induit par des concentrations hémolytiques d'acide hypochloreux. Cet effet est observé pour des concentrations de l'extrait végétal de 125 µg/ml.
- Une protection des hématies face à un stress induit par la saponine observée avec des concentrations de 1mg/ml d'extrait aqueux de *P. lentiscus*.
- Une concentration de 3 mg/ml d'extrait aqueux protège les hématies d'un stress osmotique.

L'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus* a démontré une inhibition de la croissance des bactéries de référence Gram négatif représentées par *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, et *Citrobacter freundii* ATCC 8090. Il a également un effet sur la croissance des bactéries Gram positif sélectionnées à savoir : *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus*

Conclusion

faecalis ATCC4 9452 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. Il n'a présenté aucun effet antibactérien sur la souche d'*Escherichia coli* ATCC 25922. Les CMI observées sont comprises entre 1.25 ± 0.04 et 5 ± 0.17 mg/ml.

L'extrait éthanoïque de feuilles d'*O. majorana* a montré un effet anti cancer sur les lignées cellulaires du cancer humain du sein MDA-MB- 231 et sur les cellules du cancer humain du poumon A549 par les mécanismes apoptotiques à savoir :

- Activation des caspases 3 /7. Ces enzymes représentent des marqueurs de l'apoptose. Cet effet est observé pour des concentrations de l'extrait végétal compris entre 300 et 600 µg/ml.
- Induction du blocage du cycle cellulaire à la phase G2 / M.
- Un effet inhibiteur du potentiel migratoire des cellules A549, évènement crucial pour leur métastase à d'autres tissus/organes.

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence les effets bénéfiques qui peuvent être mis à profit par l'utilisation des plantes. Pour une meilleure valorisation de ces ressources naturelles de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Une caractérisation des principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.
- Elargir le panel des activités biologiques par d'autres tests : anti-inflammatoire et anticoagulant.
- Procéder à des tests *in vivo*.

Références bibliographiques

Ahmad N. S., Farman M., Najmi M. H., Mian K. B., Hasan A. (2008) Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. Journal of ethnopharmacology. 117(3): 478-482.

Aimé G. Fankam., Jules R., Vitor Kvette. (2015) Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *allanblackia gabonensis*, *combretum molle* and *gladiolus quartinianus* against Gram negative bacteria including multidrug resistant phenotypes. Complementary and Alternative Medicine. 15 (206).

Ak T., Gülçin İ. (2008) Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemico-biological interactions. 174(1): 27-37.

Alam M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M. 2013: Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal. 21(2): 143-152.

Al-Harbi N.O. (2011) Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. Journal of Medicinal Plants Research. 5(23): 5479-5485.

AL-Saghir M. G. 2010: Phylogenetic analysis of the Genus *Pistacia* (Anacardiaceae) Based on Morphological Data. Asian Journal of Plant Sciences. 9(1): 28-35

AL-Saghir M. G., Porter D. M. 2012: Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). American Journal of Plant Sciences. 3(1): 12-32.

Appalasamy S., Lo K. Y., Ch'ng S. J., Nornadia K., Othman A. S., Chan L. K. (2014) Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from *in vitro* plantlets of *Artemisia annua* L. BioMed Research International. 2014:.. doi: 10.1155/2014/215872

Arab, K., Bouchenak, O., & Yahiaoui, K. (2014). Phytochemical Study and Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Phenolic Compounds of *Pistacia Lentiscus* L. Journal of Fundamental and Applied Sciences. 6(1): 77-91.

Références bibliographiques

- Asghar N., Naqvi S. A. R., Hussain Z., Rasool N., Khan Z. A., Shahzad S. A., Jaafar H. Z.** (2016) Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all parts of the *Carica papaya* using different solvents. Chemistry Central Journal. 10(5).
- Atmani D., Chaheer N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Atmani, D.** (2009) Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chemistry. 112(2): 303-309.
- Azaizeh, H., Halahleh, F., Abbas, N., Markovics, A., Muklada, H., Ungar, E. D., & Landau, S. Y.** (2013) Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. Veterinary Parasitology. 191 (1-2): 44-50.
- Bahari E. A., Zaaba N. E., Haron N., Dasiman R., Amom Z.** (2014) Antioxidant Activity Characterization, Phytochemical Screening, and Proximate Analysis of Cermela Hutan (*Phyllanthus gomphocarpus* Hook. F) Roots and Leaves. Medical Science Monitor Basic Research. 20: 170 -175.
- Barzegar A., Moosavi-Movahedi A. A.** (2011) Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin.
- Benhammou-Belyagoubi N.** (2012) Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaid- Tlemcen. Pp:113
- Benhammou N., Bekkara F. A., Panovska, T. K.** 2008: Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2(2): 022-028.
- Bensalem J., Servant L., Alfos S., Gaudout D., Layé S., Pallet V., Lafenetre P.** (2016) Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice. Frontiers in Behavioral Neuroscience. 10(9).
- Bigelow R. L. H., Cardelli J. A.**(2006) The green tea catechins,(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and

Références bibliographiques

tumorigenic breast epithelial cells. *Oncogene*, 25(13): 1922-1930.

Bizuayehu D., Atlabachew M., Ali, M. T. (2016) Determination of some selected secondary metabolites and their *invitro* antioxidant activity in commercially available Ethiopian tea (*Camellia sinensis*). *SpringerPlus*. 5(1).

Bruneton J. (1999) Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3^{ème} édition. Pp 1086.

Bochi V. C., Barcia M. T., Rodrigues D., Speroni C. S., Giusti M. M., Godoy H. T. (2014) Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food chemistry*. 164: 347-354.

Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Cyboran S., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. (2014) Biophysical Mechanism of the Protective Effect of Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *kamtschatica* Sevast.) Polyphenols Extracts Against Lipid Peroxidation of Erythrocyte and Lipid Membranes. *The Journal of Membrane Biology*. 7(247): 611-625.

Bonarska-Kujawa D., Pruchnik, H., Oszmiański, J., Sarapuk, J., & Kleszczyńska, H. (2011) Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophysics*. 6(1): 58-67.

Böttger S., Hofmann K., Melzig M.F. (2012) Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation? *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20(9): 2822-8

Bozorgi M., Memariani Z., Mobli M., Salehi Surmaghi M. H., Shams-Ardekani M. R., Rahimi R. (2013) Five Pistacia species (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, and *P. lentiscus*): a review of their traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *The Scientific World Journal*.

Busatta C., Vidal R. S., Popiolski A. S., Mossi A. J., Dariva C., Rodrigues, M. R. A., Cansian R. L. (2008) Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25(1): 207-211.

Références bibliographiques

Cacace J. E., Mazza G. (2002) Extraction des anthocyanes et des autres composés phénoliques de cassis avec de l'eau soufrée. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21): 5939-46.

Cao G., Sofic E., Prior R. L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 22(5): 749-760.

Carneiro A. L. B., Teixeira M. F. S., Oliveira V. M. A. D., Fernandes O. C. C., Cauper G. S. D. B., Pohlit A. M. (2008) Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103(1): 31-38.

Chalopin M., Soleti R., Benameur T., Tesse A., Faure S., Martínez, M. C., Andriantsitohaina R. (2014) Red Wine Polyphenol Compounds Favor Neovascularisation through Estrogen Receptor α -Independent Mechanism in Mice.

Chippada S. C., Volluri, S. S., Bammidi, S. R., Vangalapati, M. (2011) In vitro anti inflammatory activity of methanolic extract of centella asiatica by hrbc membrane stabilisation. *Rasayan J Chem*. 4(2): 457-460.

Chung M. Y., Lim T. G., Lee K. W. (2013) Molecular mechanisms of chemopreventive phytochemicals against gastroenterological cancer development. *World Journal Gastroenterol*. 19(7): 984-993.

De Freitas M. V., Rita de Cássia M. N., da Costa Huss J. C., de Souza T. M. T., Costa J. O., Firmino C. B., Penha-Silva N. (2008) Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*. 22(1): 219-224.

Djenane D., Yangüela J., Montañés L., Djerbal M., Roncalés P. (2011) Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*. 22(7): 1046-1053.

Djerrou, Z. (2014) Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolk-

Références bibliographiques

fed rabbits: a comparative study with simvastatin. Chinese journal of Natural Medicines. 12(8): 561-566.

Djidel S., Khennouf S., Ameni D., Baghiani A., Arrar L., Charef N. (2013) Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. Pharmacognosy Communications. 3(2): 28-34.

Duchnowicz P., Bors M., Podśędek A., Koter-Michalak, M., Broncel M. (2012) Effect of polyphenols extracts from Brassica vegetables on erythrocyte membranes (in *vitro* study). Environmental Toxicology and Pharmacology. 34(3): 783-790.

Dzotam J. K., Touani F. K., Kuete V. (2016) Antibacterial and antibiotic-modifying activities of three food plants (*Xanthosoma mafaffa* Lam., *Moringa oleifera* (L.) Schott and *Passiflora edulis* Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1).

Ediriweera M. K., Tennekoon K. H., Samarakoon S. R., Thabrew I., Dilip De Silva, E. 2016: A study of the potential anticancer activity of *Mangifera zeylanica* bark: Evaluation of cytotoxic and apoptotic effects of the hexane extract and bioassay-guided fractionation to identify phytochemical constituents. Oncology Letters. 11(2) : 1335-1344.

El-Ashmawy IM., Ashry KM, El-Nahas AF., Salama OM. (2014) Protection by turmeric and myrrh against liver oxidative damage and genotoxicity induced by lead acetate in mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 98(1):32-7.

El-Akhal F., Lalami A. E. O., Zoubi Y. E., Greche H., Guemmouh R. (2014) Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Origanum majorana* (Lamiaceae) cultivated in Morocco against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 4(9): 746-750.

Références bibliographiques

Ezatpour B., Saedi Dezaki E., Mahmoudvand H., Azadpour M., Ezzatkah F. (2015) In vitro and in vivo antileishmanial effects of *Pistacia khinjak* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine.

Fankam A. G., Kuiate J. R., Kuete V. (2015) Antibacterial and antibiotic resistance modifying activity of the extracts from *allanblackia gabonensis*, *combretum molle* and *gladiolus quartinianus* against Gram- negative bacteria including multi-drug resistant phenotypes. BMC Complementary and Alternative Medicine. 15(1).

Fatima H., Khan K., Zia M., Ur-Rehman T., Mirza B., Haq I. U. (2015) Extraction optimization of medicinally important metabolites from *Datura innoxia* Mill.

Fatima M., Kesharwani R. K., Misra K., Rizvi, S. I. (2013) Protective effect of the aflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. Biochemistry Research International.

Fejes S., Blázovics A., Lugasi A., Lemberkovics É., Petri G., Kéry Á. (2000) *In vitro* antioxidant activity of *Anthriscus cerefolium* L.(Hoffm.) extracts. Journal of Ethnopharmacology. 69(3): 259-265.

Fiorentini D., Zambonin L., Vieceli Dalla Sega F., Hrelia, S. (2015) Polyphenols as Modulators of Aquaporin Family in Health and Disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Frenkel N., Makky A., Sudji I. R., Wink M., Tanaka M. (2014) Mechanistic investigation of interactions between steroidal saponin digitonin and cell membrane models. The Journal of Physical Chemistry B. 118(50): 14632-14639.

Friedjung A. Y., Choudhary S. P., Dudai N., Rachmilevitch S. (2013) Physiological conjunction of allelochemicals and desert plants. PloS one. 8(12).

Gangwar M., Gautam M. K., Sharma A. K., Tripathi Y. B., Goel R. K., Nath G. (2014) Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippenensis* fruit extract on human erythrocytes: an *in vitro* study. The Scientific World Journal,

Références bibliographiques

2014(1):1-9.

Ge Y., Liu P., Yang R., Zhang L., Chen H., Camara I., Shi W. (2015) Insecticidal Constituents and Activity of Alkaloids from *Cynanchum mongolicum*. *Molecules*. 20(9): 17483-17492.

Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z., Rahmat A. (2015) Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15(1).

Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z., Rahmat A. (2015) Phytochemical constituents and biological activities of different extracts of *Strobilanthes crispus* (L.) Bremek leaves grown in different locations of Malaysia. *BMC complementary and alternative medicine*. 15(1).

Ha C. H. H., Fatima A., Gaurav A. (2015) *In Silico* Investigation of Flavonoids as Potential Trypanosomal Nucleoside Hydrolase Inhibitors. *Advances in bioinformatics*.

Hatcher H., Planalp R., Cho, J., Torti F. M., Torti S. V. (2008) Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(11): 1631-1652.

Heipieper H. J., Diefenbach R. U. T. H., Keweloh H. (1992) Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(6): 1847-1852.

Hopkins W. G. (2003) *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur. Pp: 532

Hosseinzadeh H., Sajadi Tabassi S. A., Milani Moghadam N., Rashedinia M., Mehri S. (2012) Antioxidant activity of *Pistacia vera* fruits, leaves and gum extracts. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 11(3): 879-887

Huo L. N., Wang W., Zhang C. Y., Shi H. B., Liu Y., Liu X. H., Gao, H. (2015) Bioassay-Guided Isolation and Identification of Xanthine Oxidase Inhibitory Constituents from the Leaves of

Références bibliographiques

Perilla frutescens. *Molecules*. 20(10): 17848-17859.

Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R. L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*. 3(12): 1-24.

lio M., Kawaguchi H., Sakota Y., Otonari J., Nitahara H. (1993) Effects of polyphenols, including flavonoids, on glutathione S-transferase and glutathione reductase. *Bioscience biotechnology, and biochemistry*. 57(10): 1678-1680.

Ingrosso D., D'Angelo S., Di Carlo E., Perna A. F., Zappia V. Galletti P. (2000) Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. *European Journal of Biochemistry*. 267(14): 4397-4405.

Islam B., Sharma C., Adem A., Aburaw E.H., Ojha S. (2015) Insight into the mechanism of polyphenols on the activity of HMGR by molecular docking. *Drug Design, Development and Therapy*. 9: 4943-4951.

Janakat S., Al-Merie H. (2002) Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*. 83(1-2): 135-138.

Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J., & Sakariah, K. K. (2004). Antioxidant activities of flavidin in different *in vitro* model systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 12(19): 5141-5146.

Joët T., Pot, D., Ferreira L. P., Dussert S., and Marraccini P. (2012) Identification des déterminants moléculaires de la qualité du café par des approches de génomique fonctionnelle. *Cahiers Agricultures*. 21(2-3): 125-133.

Kang Y. H., Kim K. K., Kim D. J., Choe M. (2015) Antiobesity effects of the water-soluble fraction of the ethanol extract of *Smilax china* L. leaf in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition Research and Practice*. 9(6): 606-612.

Keeble J. A., Gilmore A. P. (2007) Apoptosis commitment—translating survival signals into decisions on mitochondria. *Cell Research*. 17(12): 976-984.

Références bibliographiques

Kesharwani R. K., Singh D. V., Misra K., Rizvi S. I. (2012) Plant polyphenols as electron donors for erythrocyte plasma membrane redox system: validation through in silico approach. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2(1): 1-11.

Kessoku T., Imajo K., Honda Y., Kato T., Ogawa Y., Tomeno W., Nagashima Y. (2016) Resveratrol ameliorates fibrosis and inflammation in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Scientific reports*. 6(1).

Khaki M. R. A., Pahlavanb Y., Sepehrib G., Sheibanib V., Pahlavanc B. (2013) Antinociceptive Effect of Aqueous Extract of *Origanum vulgare* L. in Male Rats: Possible Involvement of the GABAergic System. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 12(2): 407-413.

Kim C., Baek S. H., Um J. Y., Shim B. S., Ahn K. S. (2016) Resveratrol attenuates constitutive STAT3 and STAT5 activation through induction of PTP ϵ and SHP-2 tyrosine phosphatases and potentiates sorafenib-induced apoptosis in renal cell carcinoma. *BMC Nephrology*. 17(1):19.

Kim D. O., Chun O. K., Kim Y. J., Moon H. Y., Lee C. Y. (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(22): 6509-6515.

Kim Y., Keogh J. B., Clifton P. M. (2016) Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*. 8(1). 17.

Koga T., Moro K., Terao, J. (1998) Protective effect of a vitamin E analog, phosphatidylchromanol, against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Lipids*. 33(6): 589-595.

Kontoghiorghes C. N., Kolnagou A., Kontoghiorghes G. J. (2015) Phytochelators Intended for Clinical Use in Iron Overload, Other Diseases of Iron Imbalance and Free Radical Pathology. *Molecules*. 20(11): 20841-20872.

Koutsoudaki C., Krsek M., Rodger, A. (2005) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20): 7681-7685.

Références bibliographiques

Lorent J., Le Duff C. S., Quetin-Leclercq J., Mingeot-Leclercq M. P. (2013) Induction of highly curved structures in relation to membrane permeabilization and budding by the triterpenoid saponins, α - and δ -Hederin. *Journal of Biological Chemistry*. 288(20): 14000-14017.

Mezni F., Shili S., Ben Ali N., Larbi Khouja M., Khaldi A., Maaroufi A. (2015) Evaluation of *Pistacia lentiscus* seed oil and phenolic compounds for *in vitro* antiproliferative effects against BHK21 cells. *Pharmaceutical Biology*. 54(5):747-51.

Miron T. L., Plaza M., Bahrim G., Ibáñez E., Herrero M. (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants *Journal of Chromatography A*. 1218(30): 4918-4927.

Mith H., Clinquart A., Zhiri A., Daube G., Delcenserie V. (2015) The impact of oregano (*Origanum heracleoticum*) essential oil and carvacrol on virulence gene transcription by *Escherichia coli* O157: H7. *FEMS Microbiology Letters*. 362(1): 1-7.

Mohd Nor N. H., Othman F., Mohd Tohit E. R., Md Noor S. (2016) Medicinal Herbals with Antiplatelet Properties Benefit in Coronary Atherothrombotic Diseases.

Moreira X., Abdala-Roberts L., Parra-Tabla V., Mooney K. A. (2014) Positive effects of plant genotypic and species diversity on anti-herbivore defenses in a tropical tree species. *PloS one*. 9(8): e105438.

Ngbolua K. N., Mudogo V., Mpiana P. T., Malekani M. J., Rafatro H., Ratsimamanga U., Tshibangu D. S. T. (2013) Evaluation de l'activité anti-drépanocytaire et antipaludique de quelques taxons végétaux de la République démocratique du Congo et de Madagascar. *Ethnopharmacologia*. 50: 19-24.

Oikeh E. I., Omoregie E. S., Oviasogie F. E., Oriakhi K. (2016) Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Science & Nutrition*. 4(1), 103-109.

Ozturk M., Dogan Y., Sakcali M. S., Doulis A., Karam F. (2010) Ecophysiological responses of

Références bibliographiques

some maquis (*Ceratonia siliqua* L., *Olea oleaster* Hoffm. & Link, *Pistacia lentiscus* and *Quercus coccifera* L.) plant species to drought in the east Mediterranean ecosystem. Journal of Environmental Biology. 31(1): 233-245.

Pandey K. B., Rizvi S. I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2(5) : 270-278.

Pawlikowska-Pawłęga B., Gruszecki W. I., Misiak L. E., Gawron A. (2003) The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. Biochemical Pharmacology. 66(4):605-612.

Pazzini C. E. F., Colpo A. C., Poetini M. R., Pires C. F., de Camargo V. B., Mendez A. S. L., Folmer V. (2015) Effects of Red Wine Tannat on Oxidative Stress Induced by Glucose and Fructose in *Erythrocytes in Vitro*. International journal of medical sciences. 12(6): 478-86.

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue de Génie industriel. 4: 25-39.

Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry. 269(2): 337-341.

Rababah T. M., Banat F., Rababah A., Ereifej K., Yang W. (2010) Optimization of extraction conditions of total phenolics, antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. Journal of Food Science. 75(7): C626-C632.

Rajaei A., Barzegar M., Mobarez A. M., Sahari M. A., Esfahani Z. H. 2010: Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. Food and Chemical Toxicology. 48(1): 107-112.

Ramirez-Estrada K., Vidal-Limon H., Hidalgo D., Moyano E., Golenioswki M., Cusidó R. M., Palazon J. (2016) Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of

Références bibliographiques

Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*. 21(2). 182-206.

Rauf A., Saleem M., Uddin G., Siddiqui B. S., Khan H., Raza M., De Feo, V. (2015) Phosphodiesterase-1 Inhibitory Activity of Two Flavonoids Isolated from *Pistacia integerrima* JL Stewart Galls. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine. 2015

Rezaei-Golmisheh A., Malekinejad H., Asri-Rezaei S., Farshid A. A., Akbari P. (2015) Hawthorn ethanolic extracts with triterpenoids and flavonoids exert hepatoprotective effects and suppress the hypercholesterolemia-induced oxidative stress in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 18 (7): 691 -699.

Rizvi S. I., Pandey K. B., Jha R., Maurya P. K. (2009) Ascorbate recycling by erythrocytes during aging in humans. *Rejuvenation Research*. 12(1): 3-6.

Sadegh F, Ebrahim Z, Zeinab A, Roghayeh P, Ali M.A, Amrollah M, I. (2014) Total Phenolic and Flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle an *in vitro* antiproliferative effect on Hela and BT-474 cell lines. *International Journal Molecules Cells Medicine*. 3: 102-7.

Schraufst tter I. U., Browne K., Harris A., Hyslop P. A., Jackson J. H., Quehenberger O., Cochrane C. (1990) Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *Journal of Clinical Investigation*. 85(2).

Sen S., De B., Devanna N., Chakraborty R. (2013) Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb an Indian medicinal plant. *Chin J Nat Med*. 11(2):149-157.

Stangl V., Dreger H., Stangl K., Lorenz M. (2007) Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*. 73(2): 348-358.

Starliper C. E., Ketola H. G., Noyes A. D., Schill W. B., Henson F. G., Chalupnicki M. A., Dittman D. E. (2015) An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*. 6(1): 89-97.

Su D., Zhang R., Hou F., Zhang M., Guo J., Huang F., Wei Z. (2014) Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from

Références bibliographiques

different solvents. BMC Complementary and Alternative Medicine. 14(1).

Sumanont Y., Murakami Y., Tohda M., Vajragupta O., Matsumoto K., Watanabe H. 2004: Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27(2): 170-173.

Suwalsky M., Villena F., Gallardo M. J. (2015) *In vitro* protective effects of resveratrol against oxidative damage in human erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1848(1): 76-82.

Tolooei M., Mirzaei A. (2015) Effects of *Pistacia Atlantica* Extract on Erythrocyte Membrane Rigidity, Oxidative Stress, and Hepatotoxicity Induced by CCl₄ in Rats. Global Journal of Health Science. 7(7): 32-38.

Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Bisignano G. (2005) Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(6): 2474-2478.

Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 68(4): 1561-1568.

VanDuijn M. M., Van der Zee J., Van den Broek P. J. (2001) The ascorbate-driven reduction of extracellular ascorbate free radical by the erythrocyte is an electrogenic process. FEBS Letters. 491(1-2): 67-70.

Varoni E. M., Faro A. F. L., Sharifi-Rad J., Iriti M. (2016) Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. Frontiers in nutrition. Viruses . 3(8).

Vissers C. M., Carr C. A., Chapman L. A. (1998) Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. Biochemical Journal. 330(1): 131-138.

Références bibliographiques

Vissers M. C., Winterbourn C. C. (1995) Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochemical Journal*. 307(1): 57-62.

Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., Bartolo R. G. (2003) Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 94(2): 240-247.

Wu W., Li R., Li X., He J., Jiang S., Liu S., & Yang J. 2015 : Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. *Viruses*. 8 (1).

Wu P., Ma G., Li N., Deng Q., Yin Y., Huang R. (2015) Investigation of in vitro and in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chemistry*. 173: 194-202.

Yang J. G., Liu B. G., Liang G. Z., Ning Z. X. 2009 : Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis. *Molecules*. 14(1) : 46-52.

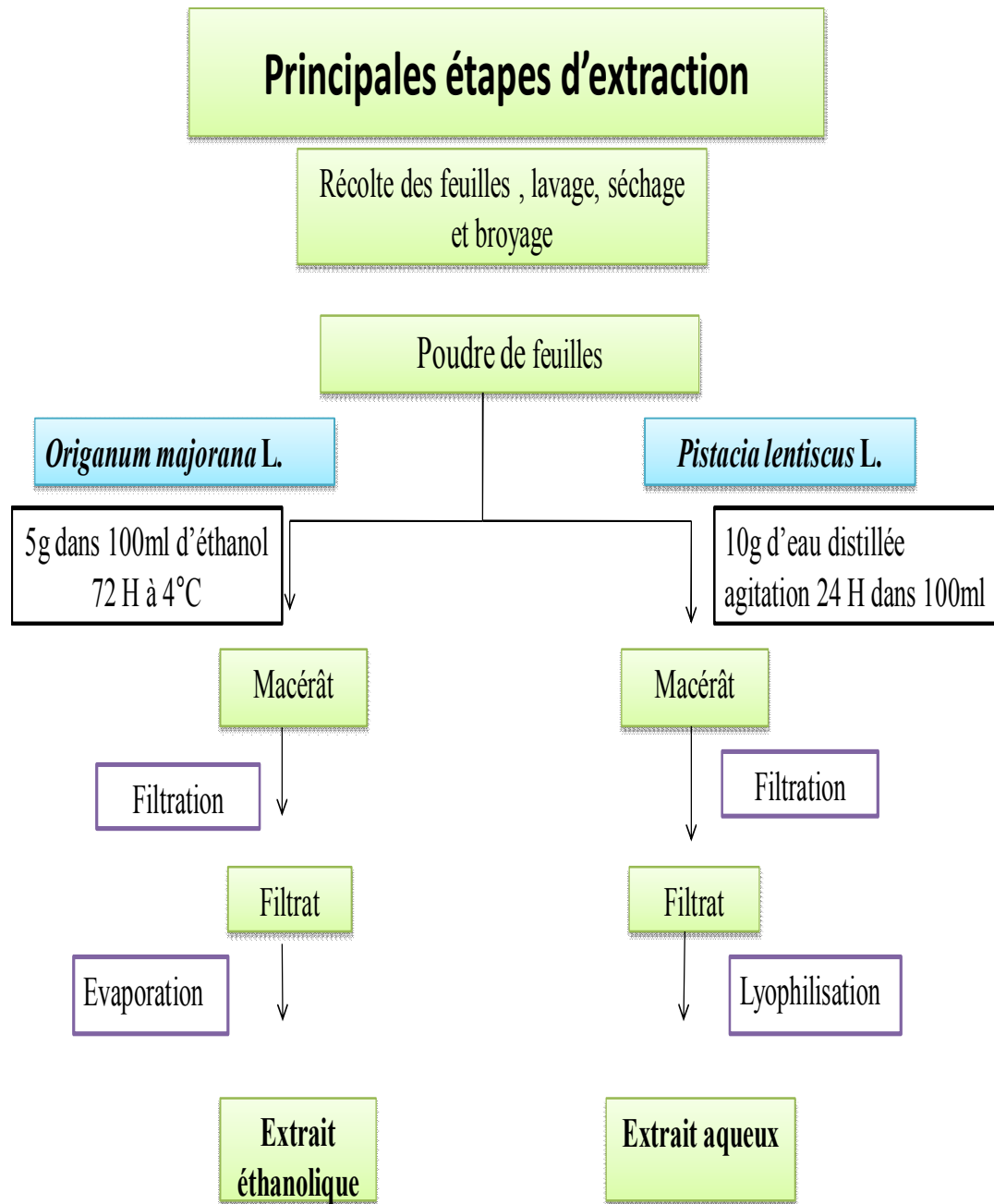
Yi T., Wen J., Golan-Goldhirsh A., Parfitt D. E. (2008) Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (Anacardiaceae). *American Journal of Botany*. 95(2): 241-251.

Yildirim A., Mavi A., Kara A. A. (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8): 4083-4089.

Yim H. S., Chye F. Y., Rao V., Low J. Y., Matanjun P., How S. E., Ho C. W. (2013) Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. *Journal of Food Science and technology*. 50(2): 275-283.

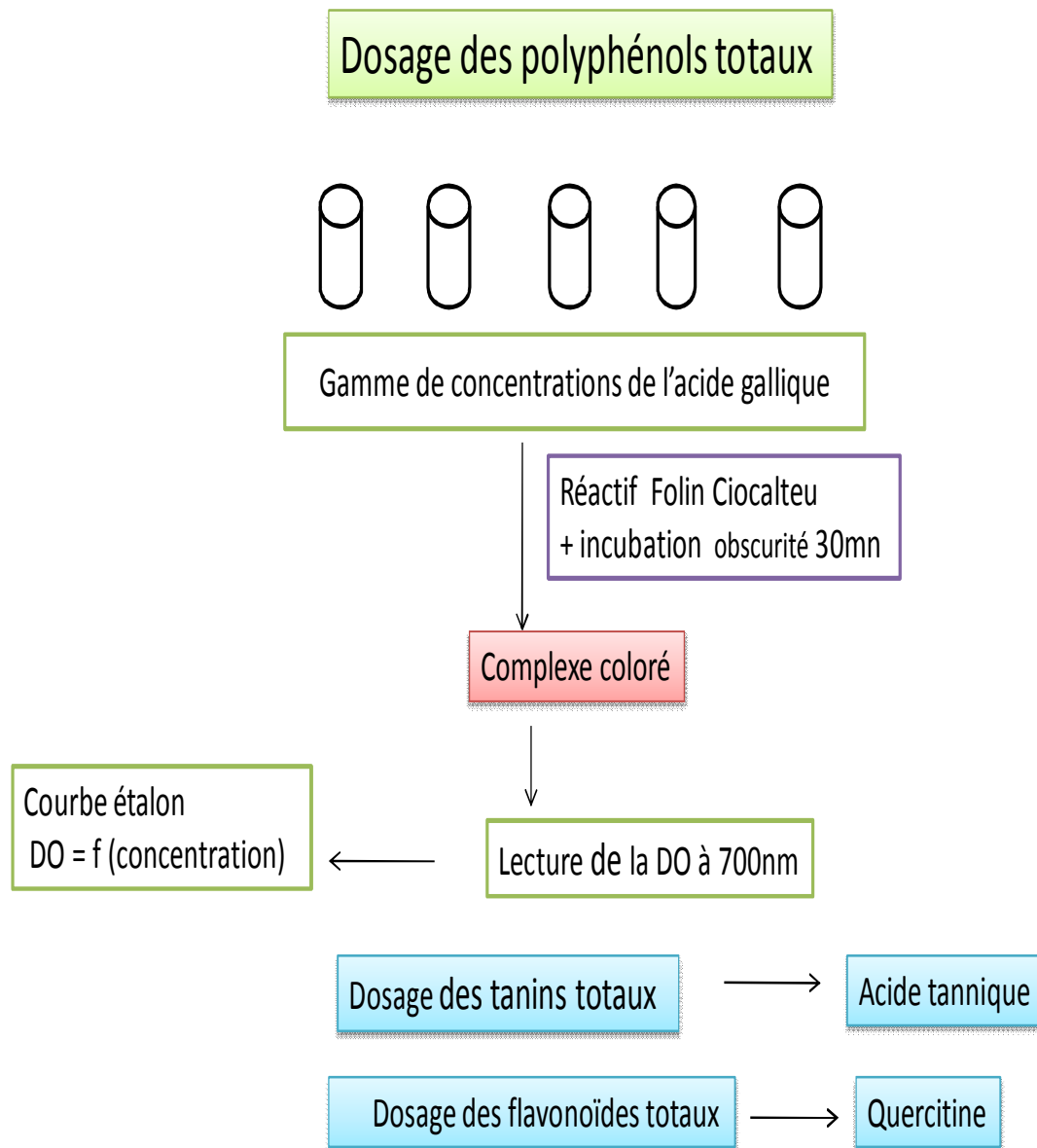
Zhang A., Fang Y., Wang H., Li H., Zhang Z. (2011) Free-radical scavenging properties and reducing power of grape cane extracts from 11 selected grape cultivars widely grown in China 16(12): 10104-10122.

Annexe 1



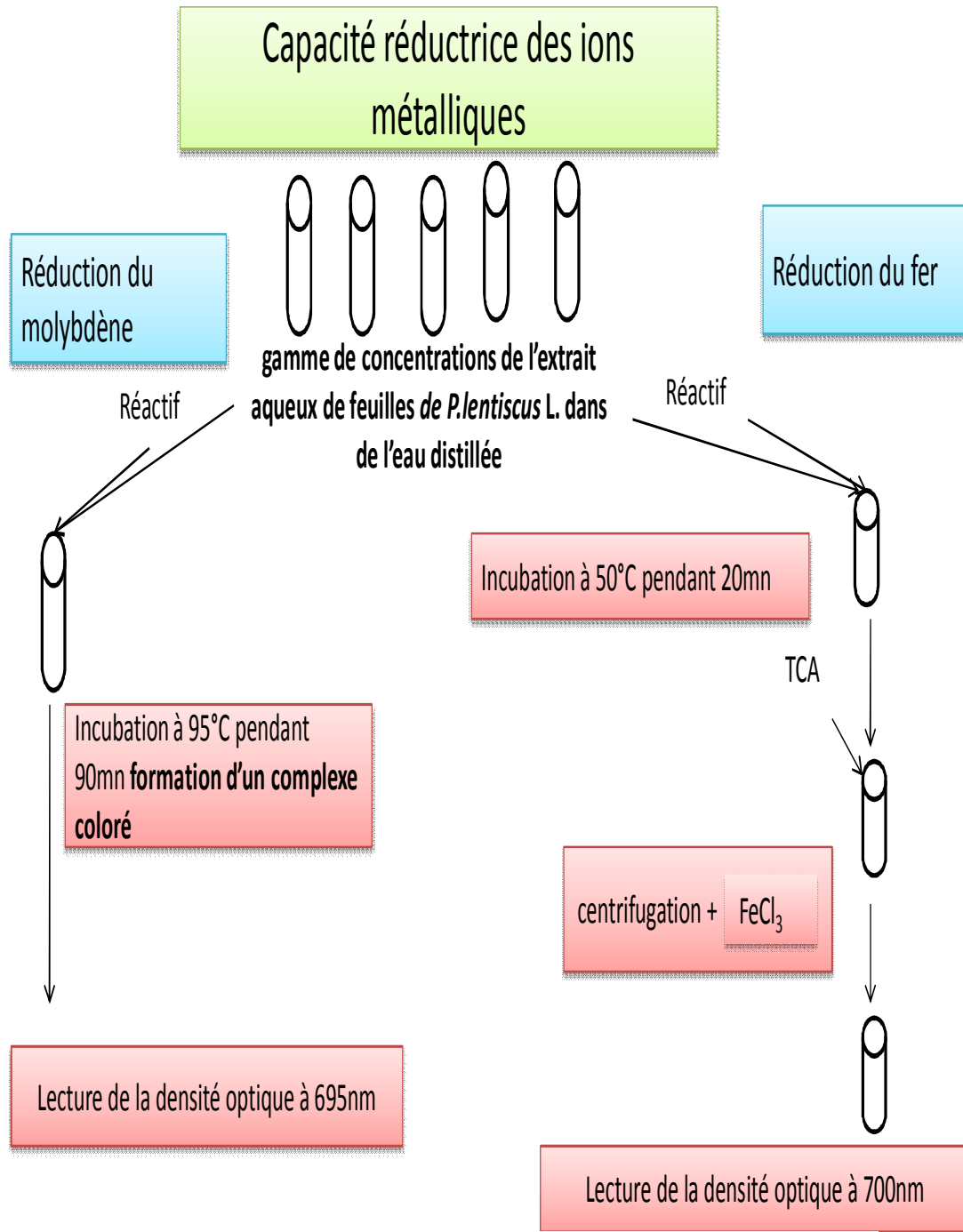
Annexe 2

Détermination de la concentration des polyphénols totaux



Annexe 3

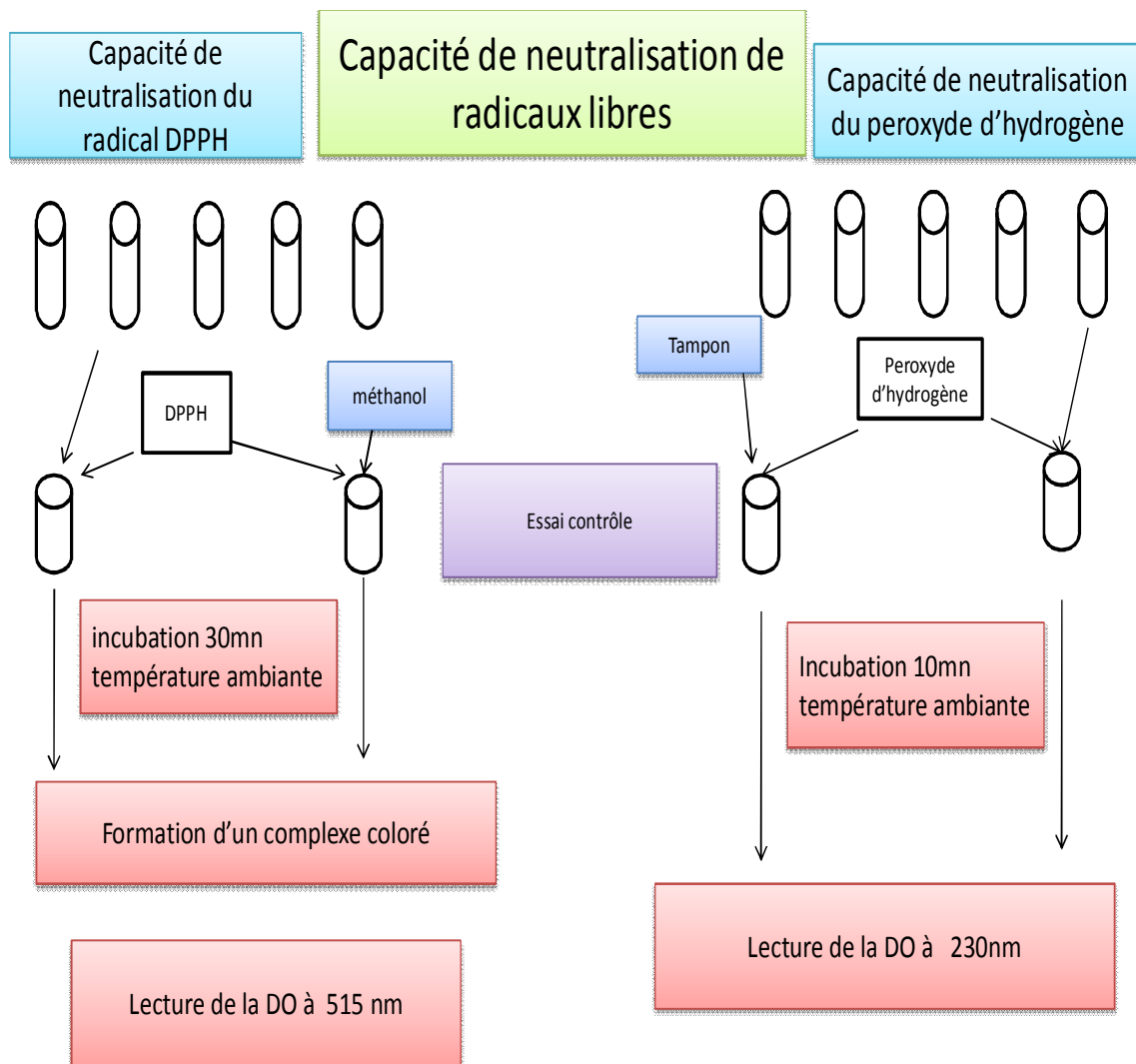
Détermination de la capacité de réduction des ions métalliques



- **Un contrôle +** : l'extrait végétal est remplacé par l'acide ascorbique
- **Un contrôle-** : l'extrait est remplacé par l'eau distillée

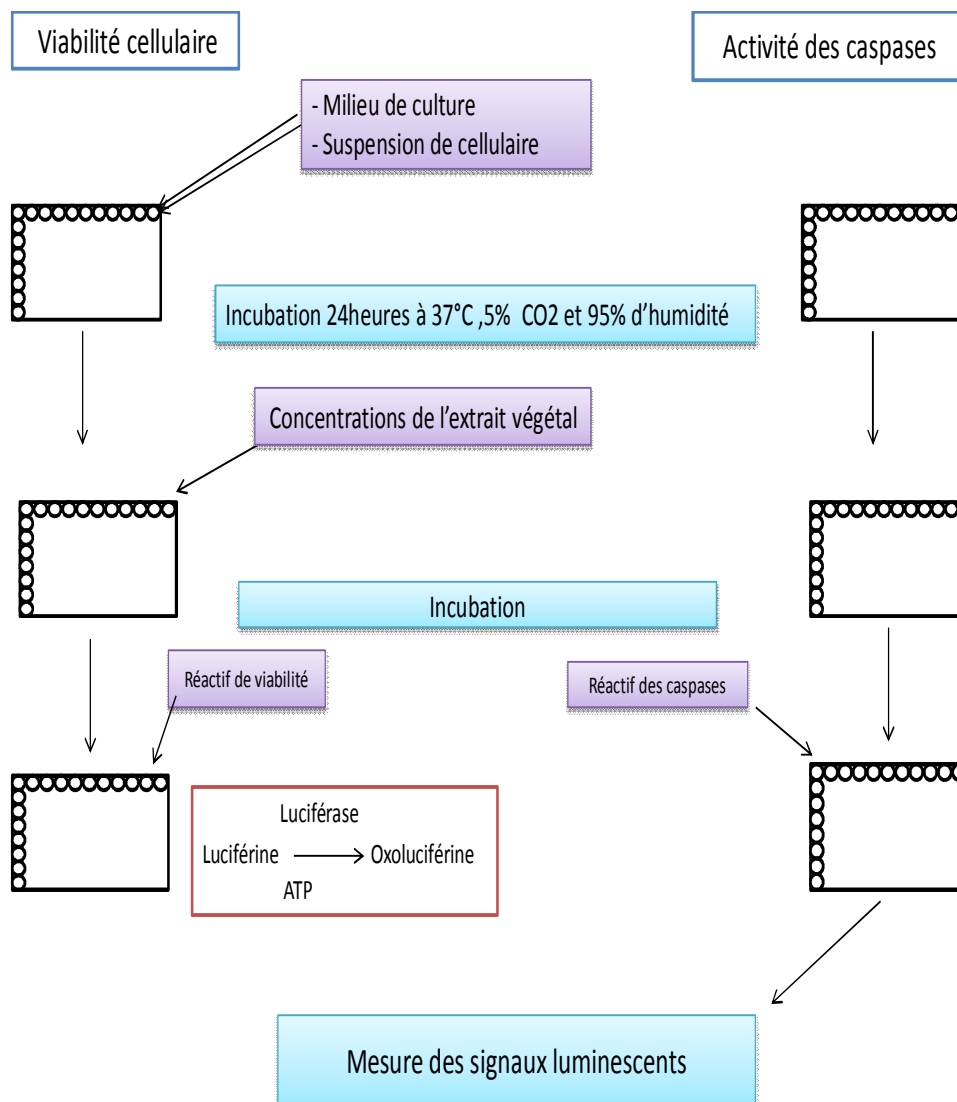
Annexe 4

Détermination de la capacité de piégeage des radicaux libres



Annexe 5

Détermination de l'action de l'extrait végétal sur la viabilité des cellules cancéreuses et sur l'activité des caspases.

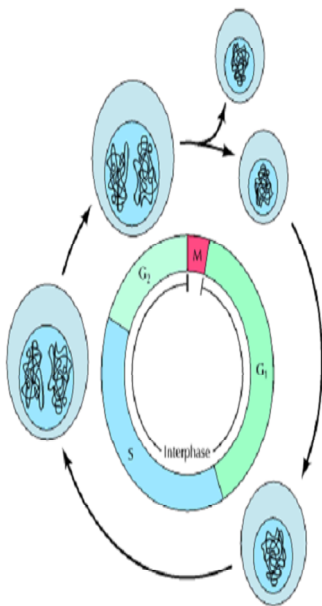


Annexe 6

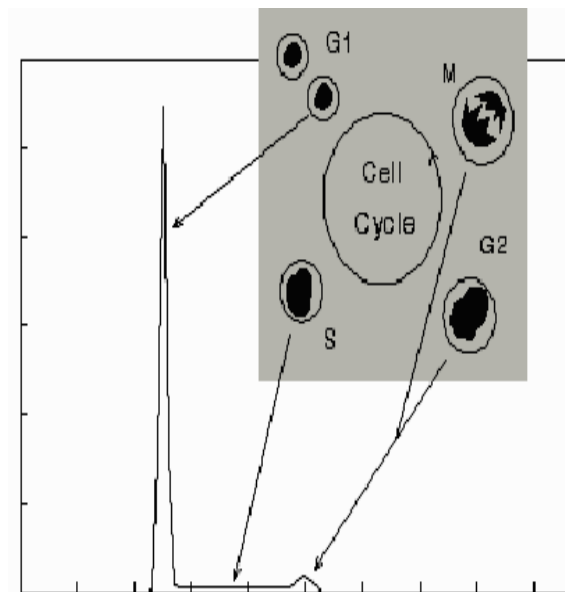
Détermination de l'action de l'extrait végétal sur le cycle cellulaire

Action sur le cycle cellulaire

La cytométrie de flux



Cycle cellulaire

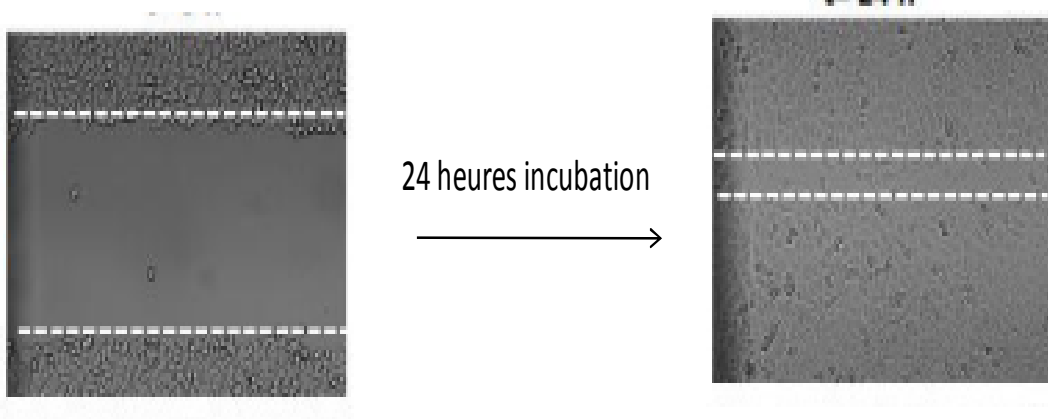


Evolution de la quantité d'ADN au cours de la division cellulaire

Annexe 7

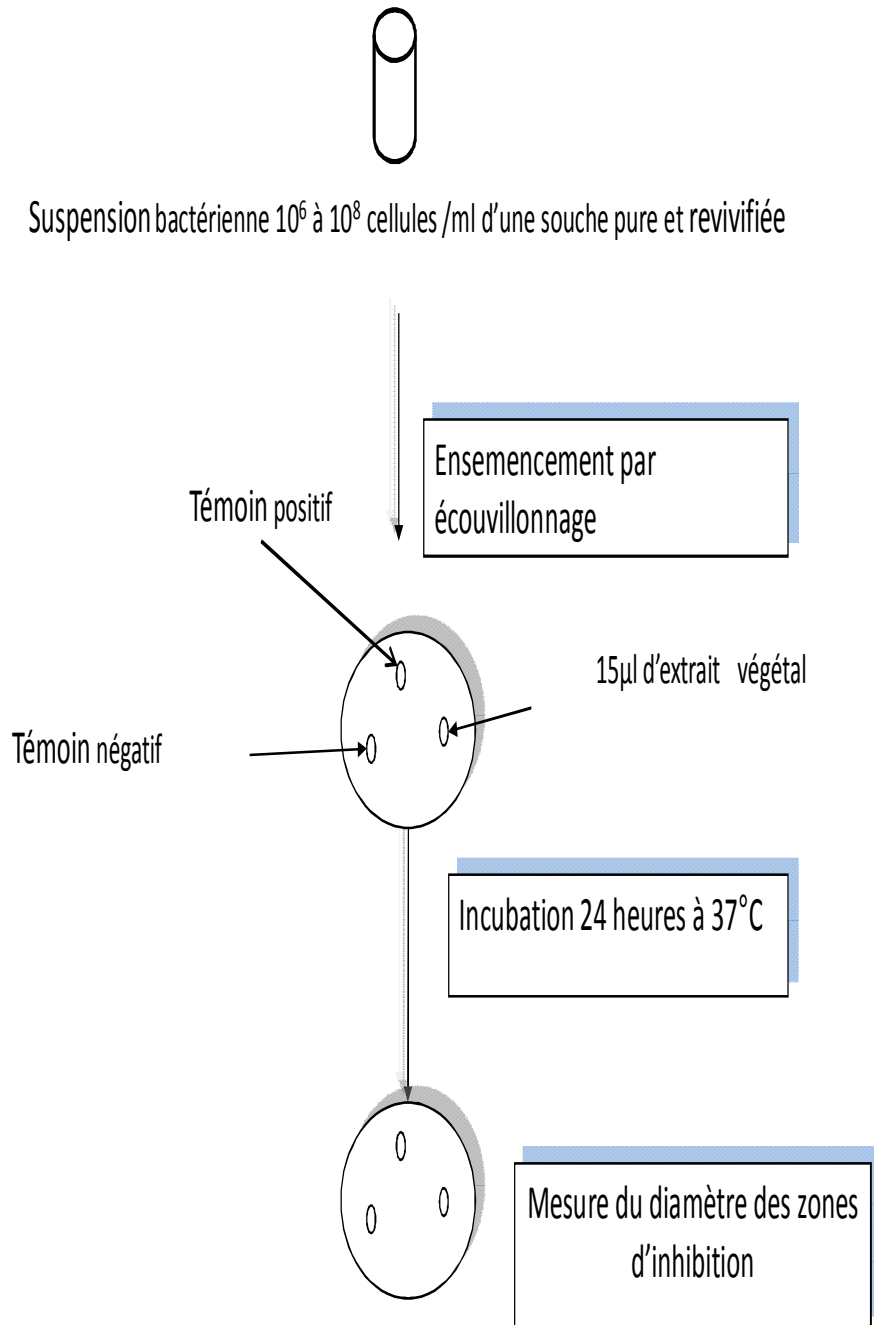
Effet de l'extrait végétal sur le pouvoir migratoire des cellules cancéreuses

Effet sur la capacité migratoire



Annexes

Annexe 8



Original Article

IN VITRO EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *PISTACIA LENTISCUS* AQUEOUS EXTRACT

AICHE IRATNI GHENIMA^a, MOUALEK IDIR^a, MESTAR GUECHAOU NADJET^a, MEZAACHE AICHOUR SAMIA^b, ZERROUG MOHAMED MIHOUB^b, HOUALI KARIM^{*a}

^aLaboratoire de Recherche Biochimie Analytique and Biotechnologie (LABAB). Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. Algérie, ^bLaboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Algérie
Email: houlitizi@yahoo.fr

Received: 11 Jul 2015 Revised and Accepted: 22 Sep 2015

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to study the antioxidant potential and the antibacterial activity of leaves aqueous extract of *Pistacia Lentiscus* as well as the protective effect of this extract against the haemolysis in hypotonic condition, in oxidative stress and in the existence of saponin injury.

Methods: We studied the antioxidant capacity through the DPPH assay, H₂O₂ scavenging activity, Ferric-reducing power (FRAP) assay, total antioxidant assay and the antibacterial activity using the disc diffusion method. We also investigated the haemolytic activity with the spectrophotometric method.

Results: The result showed that the aqueous extract had a good antioxidant capacity, which was calculated as IC₅₀. IC₅₀ of the aqueous extract was found to be 9.89±0.7µg/ml for DPPH scavenging, 200±18.02µg/ml for H₂O₂ scavenging assay, 54.06±12.66µg/ml for Ferric-reducing power (FRAP) and 500±22.3 µg/ml for total antioxidant capacity. The aqueous extract also inhibited the growth of the tested bacterial strains with a maximum inhibition zone of 30.33±5.5 mm observed on *Pseudomonas aeruginosa* for wood-seed and a moderate activity against all other strain. The haemolytic analysis showed that the aqueous extract is not toxic for the human erythrocytes and protects them against the oxidative and osmotic stress and also against saponin injury.

Conclusion: The results of our study suggest that the aqueous extract of leaves of *Pistacia lentiscus* possess potent anti-haemolytic activity, are a good source of natural antioxidant.

Keywords: *Pistacia lentiscus*, Antioxidant, Haemolysis.

INTRODUCTION

Natural antioxidants have attracted increasing interest mainly because of the preventive effect they exhibit against various disorder caused by oxidative stress [1]. Polyphenols are substances that are capable of reducing the oxidation. The mechanisms by which they can inhibit the process of oxidation include scavenging free radicals, chelating of free metals, and inhibition of enzymes responsible for the production of the free radicals and the prevention of antioxidant defense systems. Fatini *et al.* [2], report the anti-cancer effects of polyphenols and their ability to modulate multiple signalling pathways involved in cancer [2]. Polyphenols extracted from green tree may have great potential as clinical treatment in chronic kidney diseases [3].

There is increasing evidence that diets rich in plants could be beneficial to Man and preventive to some diseases. Thus, many individuals rely on plant products for medicinal purposes.

Pistacia lentiscus is an evergreen shrub, it is a small tree growing up to 1-8m tall, it belongs to the Anacardiaceae family [4]. It is evergreen sclerophyll, largely distributed in dry/warm areas of the Mediterranean region, well adapted to hard conditions due to its exceptional high resistance, it plays a key role in phyto-stabilization of contaminated mines sites with heavy metal (Cd, Pb and Zn) [5].

A number of studies have shown beneficial effects of different parts of *Pistacia lentiscus*. *Pistacia lentiscus* fatty oil possesses anti-lipid properties at least in reducing total cholesterol and triglycerides [6]. Chio mastic derived from *Pistacia lentiscus* could be considered as a conglomeration of effective anti-cancer drug, attributed to their capacity to inhibit cell proliferation through extrinsic and intrinsic apoptosis signalling pathways [7]. In his study, Azalzeh [8] found that *Pistacia lentiscus* is highly effective at inhibiting larval escheatment [8]. The anti-bacterial property of *Pistacia lentiscus* is also proved [9].

Erythrocytes are highly susceptible to attack by reactive oxygen species. This oxidative stress is one of the major actions in some pathology of hemoglobin. The phytochemicals compounds can either protect erythrocytes or increase their resistance to oxidative reaction. Phenolic compounds may protect against oxidative damage by (ROS) and free radicals, as they act as exogenous antioxidant system [10].

The originality of our study lies in the fact that most researches on *Pistacia lentiscus* targeted either the essential oil which valorization and the exploitation are very expensive, or extracts by solvents, which often cannot be used because of their toxicity. The aqueous extracts offer a solution that is both easy and especially safe for Human health. Thus the aim of this study, is to investigating *Pistacia lentiscus* aqueous extract biological activities, the *in vitro* antioxidant potential; the capacity to protect red blood cells in hypotonic condition, from oxidative injury induced condition, the activity against saponin injury and antibacterial activity against referenced bacterial strains. The total phenolic content was also determined.

MATERIALS AND METHODS

Extract procedure

The leaves, of *Pistacia lentiscus* were collected in Tizi-Ouzou, a region in the north of Algeria, in (October-December) 2014. These leaves grew up in a shadowy place, and then ground into powder (dry weight of plant). 20g of plant sample were steeped with 200 ml of distilled water in 250 ml flasks. The flasks were shaken at 8 rpm in room temperature during 24 h followed by rapid filtration through four layers of gauze and a second filtration through Watman N °01 filter paper. The resulting solution was lyophilized. The percent (w/w) extraction yield is calculated. The powder was stored at (-18 °C) in a desiccant until required. The powder was dissolved

the in the adequate solvent for the different tests, this constitutes an aqueous extract (AE).

Determination of total phenolic compounds

The total phenolic content was estimated by the Folin-Ciocalteu method [11]. In this assay, 200ul of diluted sample at 40µg/ml were added to 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent diluted in distilled water at 1/10. After 4mn, we added 800ul of saturated sodium carbonate solution (75g/l). After 2 h of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm. Gallic acid was used as a standard. The results were expressed as Gallic Acid Equivalent per grams of dry weight (GAE/g extract).

Determination of antioxidant capacity

Determination of DPPH free radical scavenging activity

The free radical scavenging activity, of aqueous extract of *Pistacia lentiscus* and standard reference compound (i.e. ascorbic acid), was analysed by the DPPH assay as described by Sadegh *et al.* [12]. 3.75 ml assay of varying concentrations of aqueous extract (5.75-6.5-7.25-8-8.75-9.5-10.25 µg/ml) were dissolve in ethanol, then, mixed with 0.25 ml of DPPH prepared in ethanol at 0.8 mM. The mixture was vortexes and incubated for 30mn. The optical density of the solution was measured at 517 nm and compared to a control without extract.

The DPPH radical scavenging activity was calculated from the absorption value using the following equation:

$$\text{Radical scavenging activity \%} = \frac{\text{OD CONTROL} - \text{OD SAMPLE}}{\text{OD CONTROL}} * 100$$

The IC₅₀ value was determined from the graph of scavenging activity against the concentrations. This value defined as the concentration extracts necessary to inhibit 50 % of the initial DPPH radical, expressed in µg/ml.

Hydrogen peroxide scavenging activity

Hydrogen scavenging ability of the extract was estimated according to the method of Jayaprakasha *et al.* [13]. A solution of H₂O₂ (40 mM) was prepared in phosphate buffer pH 7.3. 3.4 ml of different concentration of plant extract in distillate water (200-300-400-500-600 µg/ml) were added to 0.6 ml of H₂O₂ solution. After 10mn incubation, the absorbance value was measured at 230 nm, against a blank solution containing phosphate buffer without H₂O₂. Ascorbic acid was used as a positive control. IC₅₀ value was determined from the graph of scavenging activity against the concentrations. These values defined as the concentration extract which has 50 % scavenging.

Ferric-reducing power (FRAP) assay

The Ferric reducing power of sample was determined using a FRAP assay of Fejes *et al.* [14]. This method valuates the ability of a substance to reduce Fe³⁺ to Fe²⁺, which is measured by the formation of the coloured complex with potassium ferricyanide that can be read by spectrophotometer at 700 nm, proportional to the amount of Fe²⁺. For this assay, different concentration of extract (15.62-31.25-62.5-125-250-500 µg/ml) which are prepared in distilled water are mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (200 mM, pH 6.6) and 2.5 ml of potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆). The mixture is incubated at 50 °C for 20mn, and then 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%) are added to the mixture, and centrifuged at 3000rpm for 10mn. We mixed the upper of the solution (5 ml) with 5 ml of distilled water. Finally, the absorbance is measured at 700 nm after addition of 1 ml of FeCl₃ (0.1%), the standard compound was ascorbic acid and phosphate buffer (pH 6.6) as the blank solution. Increasing absorbance of the reaction mixture indicated an increasing in the reducing power. The EC₅₀ value is the effective concentration, which has the absorbance at 0.5 for reducing power [15].

Total antioxidant assay by phosphomolybdate method

The total antioxidant capacity of the extract was determined by phosphomolybdate method using ascorbic acid as the standard [16]. An aliquot of 0.1 ml of the extract (15.62-31.25-62.5-125-250-500

µg/ml) was combined with 1 ml of reagent (1.6 mM sulphuric acid, 28Mm sodium phosphate and 4Mm ammonium molybdate). The tubes were capped and incubated in a boiling water bath at 95 °C for 90mn. After the samples were cooled to room temperature, and the absorbance was measured at 695 nm. An increasing absorbance of the reaction mixture indicated an increasing in the antioxidant capacity.

Haemolysis assay

Preparation of red blood cell suspension

The blood was obtained from healthy consenting donors by vein puncture and collected into tubes containing heparin as anticoagulant. Samples centrifuged immediately at 2000rpm for 10mn at 4 °C and then the plasma is discarded carefully. Erythrocytes was washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and re-suspended in PBS to obtain desired haematocrit [17].

Aqueous extract treatment of red blood cells

In order to determine the effect of the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* on red cell blood (RCB), 1 ml of erythrocytes suspension (2% haematocrit) was incubated with an equal volume of extract dissolved in PBS at different concentrations (1000, 500, 250, 125, and 62.5 µg/ml). Distilled water was used as positive control (100% lyses) and PBS as negative control. The mixtures was shaken gently while incubation for 30mn at 37 °C and the aliquots of reaction mixture was centrifuged at 2000rpm for 10mn at 4 °C to separate the erythrocytes. The percentage of haemolysis was determined by measuring the absorbance (A) of the supernatant at 540 nm, corresponding to haemoglobin liberation, and compared with that complete haemolysis (B) obtained with erythrocytes incubated in distillate water (100% haemolysis) in the same conditions as the extract. The haemolysis percentage was calculated using the formula: A/B*100 [18].

Protective effect of aqueous extract to haemolysis caused by saponin

To determine the effect of the aqueous extract on the haemolysis induced by saponin, 1 ml of erythrocyte suspension at 2% haematocrit was mixed with 0.5 ml of PBS solution containing aqueous extract at 1000 and 500µg/ml. Then, 0.5 ml of PBS containing 100 µg/ml of saponin was added. The essay for erythrocytes in presence of saponin without extract is realised. The reaction mixtures were shaken gently while being incubation at 37 °C for 30mn. In all of the experiments, a negative control is prepared with erythrocytes in PBS without saponin. The aliquots of reaction mixture are centrifuged at 2000 rpm for 10mn at 4 °C to separate the erythrocytes. The percentage of haemolysis was determined by measuring the absorbance of the supernatant at 540 nm and calculated as previously [18].

Determination of osmotic stability of human erythrocytes

In this test, the effect of the extract in the erythrocyte membrane stability in the osmotic pressure is determined as described by Mariana *et al.* [19] with few modifications. 40 µl of washed erythrocytes suspension were added to 1 ml of (0-0.1-0.3-0.5-0.7-0.9 and 1%), NaCl solution in distillate water (control) or 1 ml of the same concentration of NaCl solution in different concentrations of the extract (250-500-1000 and 3000µg/ml). The reaction mixture was gently shaken during the incubation at 37 °C for 30mn. Following this step, the absorbance was measured at 540 nm.

Protective effect of aqueous extract against oxidative effect caused by HOCl

In this study, the *in vitro* oxidative haemolysis of human erythrocytes was used as a model to study the free radical inducing damage of biological membrane and the protective effect of the aqueous extract of *Pistacia lentiscus*. For this, 1 ml of Red blood cells (5%) were incubated for 15mn at 37 °C with 1 ml of extract at different concentration (1000, 500, 250, 125 µg/ml).

A HOCl of a diluted solution in PBS was added, whose concentrations (0.15, 0.075 and 0.1375). This reagent contains approximatively 1:1

ratio of HOCl and is subsequently referred to as HOCl. After 30mn of incubation, an aliquot of the mixture was centrifuged at 2000rpm for 10mn. After this, we added 5 ml of PBS, and we evaluated the haemolysis by spectrophotometer at 540 nm [20].

Antibacterial susceptibility test

Bacterial strains

The antibacterial test was carried out using referenced strain: *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) and *Enterobacter faecalis* (ATCC 49452). *Bacillus cereus* (ATCC10876), *Citrobacter freundii* (ATCC8090), *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumonia* (700603) were obtained from the Laboratory of Natural Substances at the University of Tlemcen (Algeria).

Antibacterial activity

The antibacterial activity *in vitro* was screened using the disc diffusion method [21]. For this, a sterile Muller Hinton agar plates were inoculated by the method of streak with inoculums of the tested bacteria suspension. The bacteria suspension from young colonies of 18 to 24 h was made in sterile distilled physiological water for each strain and its turbidity was adjusted to 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml). Then, sterile paper discs of 6 mm diameters were impregnated with 15 μ l of plant extract, dried and delicately deposited on the medium. We tested each extract in triplicate with the presence of the sterile disc dampened with DMSO as a negative control and we used an antibiotic, trimethoprim/sulfamides, as a positive control. Inoculated plates with bacteria were incubated at 37 °C for 24h. The antibacterial activity was evaluated by measuring the area of inhibition against the tested microorganism and the average of the three measurements was calculated. If the diameter of inhibition area is higher than 14 mm, we considered that we have a high antibacterial activity.

Statistical analysis

The results are expressed as mean $\pm$ SD. A Student's test was used to analyse level of statistical significance between groups $P \leq 0.05$ statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Polyphenols

Phenolic content could be used as an indicator of antioxidant properties. The amount of total phenolic in extract was determined by spectrophotometry according to the Folin-Ciocalteu procedure, has been expressed as mg equivalent to Gallic acid per g dry weight (standard curve equation: $y = 0.019x - 0.035$ $R^2 = 0.991$). We found that the aqueous extract have a good amount of phenolic compounds, with 119.77 ± 0.32 mg GAE/g dry weight of plant material.

In comparison to other plants using the same solvent, the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* extract had higher concentration of phenols than that with *Satureja calamintha* (12.6 ± 0.775 mg/g) [22] but less than that with *Rubus kulesziae* [23] (136.04 ± 0.67 mg GAE/g) and similar to that with *Uncaria tomentosa* (109.84 ± 9.63 mg/g) [24].

Antioxidant activity

In this study, the antioxidant potential of the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* was measured by different chemical assays: DPPH radical scavenging activity, H_2O_2 scavenging activity, ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay, and total antioxidant assay by phosphomolibdate method. We compared the antioxidant capacity of the extract with ascorbic acid as reference.

DPPH scavenging activity

The DPPH is a stable nitrogen-centred free radical with a maximum absorption at 517 nm that can readily undergoes reduction by an antioxidant. The scavenging DPPH scavenging ability of the aqueous extract and ascorbic acid is shown in fig. 1. At concentrations from 5.75 to 10.25 μ g/ml, the scavenging activities of the extract were 7.29% to 52.31%, while the scavenging activities of ascorbic acid

were 19% to 92.09%. The quality of antioxidant in the extract was determined by using IC_{50} values, denoting the concentration of the sample required to scavenge 50% of the DPPH free radical, it was calculated from the graph of percentage scavenging DPPH versus concentration. The IC_{50} values for ascorbic acid and aqueous extract were 6.71 ± 0.19 and 9.86 ± 0.37 μ g/ml respectively. The scavenging DPPH activity observed with our extract is better than observed with aqueous extract of *Pistacia inteferrima* with IC_{50} 11.5 μ g/ml [25]. This activity is mainly due to their redox properties, which plays an important role in absorbing and neutralizing free radical, quenching singlet and triple oxygen, or decomposing peroxides. We found that aqueous extract of *Pistacia lentiscus* have a good radical scavenging activity and it is depending on concentrations as shown in fig. 1. The scavenging capacity of the extract of *Pistacia lentiscus* on DPPH was possibly due to the hydrogen donating ability of polyphenolic compounds present in the extract. Polyphenols are very valuable plant constituents in the scavenging of free radicals due to their several phenolic hydroxyl groups [26].

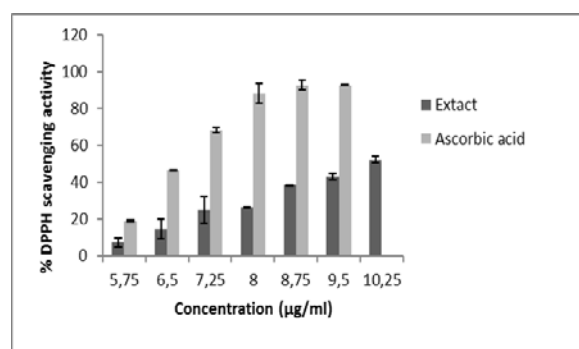


Fig. 1: DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid and aqueous extract of *Pistacia lentiscus*. Each value is represented as mean $\pm$ SD (n=3)

Hydrogen peroxide scavenging activity

Fig. 2 depicts the scavenging capacity of the aqueous extract of *Pistacia lentiscus* against H_2O_2 . The concentration range (200 to 800 μ g/ml) of aqueous extract was capable of scavenging H_2O_2 in a concentration-dependent manner. Later, when compared with ascorbic acid, the extract was less effective for scavenging H_2O_2 . The ascorbic acid was capable of scavenging the H_2O_2 in the concentration range (40 to 200 μ g/ml), the H_2O_2 in the concentration-dependent manner. IC_{50} values, denoting the concentration of the sample required scavenging 50% of the H_2O_2 , it was calculated from the graph of percentage scavenging versus concentration. IC_{50} of the standard compound is less than the IC_{50} of the extract that exhibit respectively 183.66 ± 12.89 and 200 ± 18.02 μ g/ml. The values obtained were lower than the values obtained with the *Berberis multifida* plant which presented IC_{50} 1364 ± 54 μ g/ml [27].

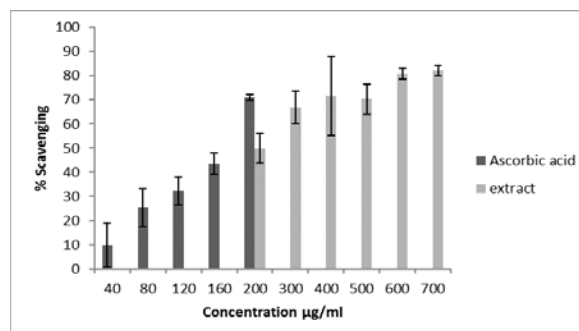


Fig. 2: Hydrogen peroxide scavenging activity of ascorbic acid and aqueous extract of *Pistacia lentiscus*. Each value is represented as mean $\pm$ SD (n=3)

Ferric-reducing power (FRAP) assay

It has been recognized that transition metal ions as iron is an important catalyst for the generation of the first few free radical to initiate the radical chain reaction or the mediates lipid peroxidation. Chelating agent may reduce free radical damage.

FRAP assay is a simple and direct method to assess antioxidant power. Increasing absorbance at 700 nm indicates an increase in reducing ability. In fig. 3, we found a dose-response relationship in reducing ability of the extract as the positive control (ascorbic acid). The result showed that ascorbic acid is more efficient ($P \leq 0.05$) in the reducing ability than the aqueous extract. The EC_{50} value is the effective concentration, which has the absorbance at 0.5 for reducing power it was calculated from the graph of absorbance at 700 nm versus concentration. Reducing an ability of the extract ($EC_{50} = 54.06 \pm 12.66 \mu\text{g/ml}$) was higher than ascorbic acid ($EC_{50} = 38.92 \pm 3.16 \mu\text{g/ml}$). The values obtained were similar to those obtained in the same experiment with *Atalantica ceylanica* which presented $IC_{50} 87.7 \mu\text{g/ml}$ [28].

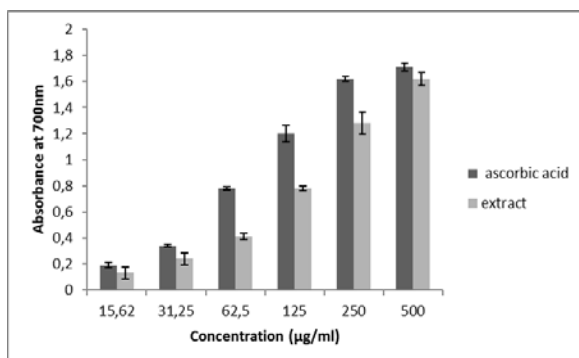


Fig. 3: Ferric-reducing power (FRAP) of ascorbic acid and aqueous extract of *Pistacia lentiscus*. Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

Total antioxidant assay by phosphomolybdate

The total antioxidant capacity test evaluated the ability of a sample to donate electron, neutralizing thus the free radical such as ROS. As can be observed in fig. 4, the extract and the ascorbic acid presented total antioxidant ability in a concentration-dependent manner. The extract presented a good antioxidant capacity in the range concentration (15.62 and 500 $\mu\text{g/ml}$), however, lower than the standard. The extract and ascorbic acid exhibit respectively 500 ± 22.3 and $240 \pm 12.04 \mu\text{g/ml}$

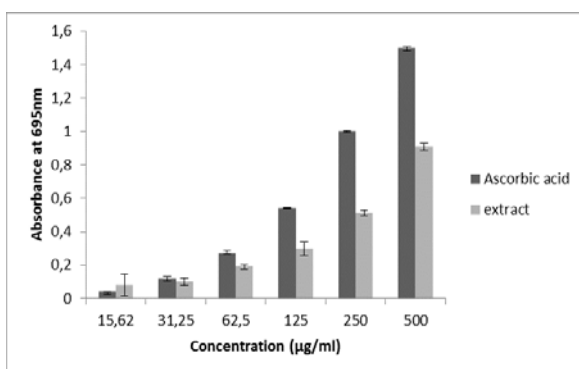


Fig. 4: Total antioxidant assay of ascorbic acid and aqueous extract of *Pistacia lentiscus*. Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

Haemolysis assay

Haemolytic activity could be used as the primary tool for studying the toxicity of the drug. Human cell blood treated with gradual

concentration of AE (1000-62.5 $\mu\text{g/ml}$) at 37 °C up to 30mn, in table 1, we noted a very low haemolytic effect. The haemolysis passes from 5.05 ± 1.56 to $8.32 \pm 3.66\%$ when the concentration of the extract evaluate at 62.5 to 1000 $\mu\text{g/ml}$. The low haemolytic effect of the extract suggests the low/no toxicity of the extract in this range concentration.

Table 1: Haemolysis effect of plant extract on human erythrocytes

Concentrations of extract ($\mu\text{g/ml}$)	% of haemolysis
1000	8.320 ± 3.660
500	5.670 ± 0.490
250	6.200 ± 1.900
125	5.970 ± 1.330
62.25	5.050 ± 1.560
Control	1.790 ± 0.780

Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

Protect effect of aqueous extract to erythrocytes treated with saponin

Saponin can interfere with biological surface such as cell membranes. This latter may result in haemolysis or cytotoxicity because of perturbation or loss of the cell membrane integrity [27]. The haemolytic properties of saponin are generally due to the interaction between the saponin and the sterols of erythrocytes membrane [29].

It is visibly clear from fig. 5 that incorporation of the AE in erythrocyte membrane enhances the stability of intact erythrocytes against haemolysis, in presence of haemolytic agent (saponin). This observation suggests that erythrocyte membrane becomes more ordered in the presence of AE, which can rationalize their anti-haemolytic activities. Here, we observe that efficiency of anti-haemolytic activity is maxima for the erythrocytes incubation with 100 $\mu\text{g/ml}$ of saponin in the presence of 1000 $\mu\text{g/ml}$ of AE. In the anti-haemolytic effect, it demonstrates changes in shape and size of human erythrocytes incubated with extract of *Uncaria tomentosa*, and it reveals remarkable morphological changes, which were characteristic to echinocyte formation [25].

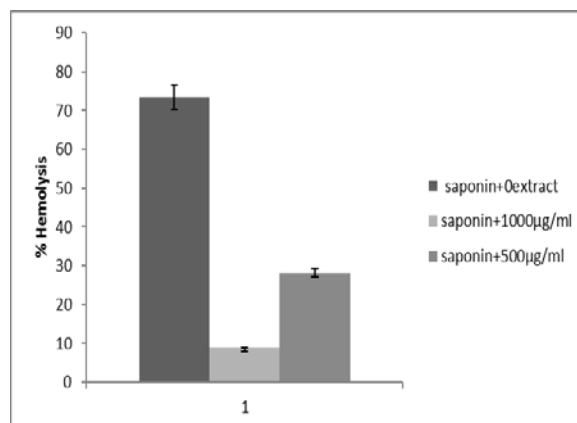


Fig. 5: Suspension of erythrocyte treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ with the presence of aqueous extract at 1000 or 500 $\mu\text{g/ml}$ of extract compared with control without presence of extract. Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

Determination of osmotic stability of human erythrocytes

We measured the extent of protection of erythrocytes after 30mn incubation of erythrocytes at 37 °C with 3 mg/ml of extract and without (control). In this study as shown in fig. 6, the percentage of

the control and test samples showed a sigmoidal relationship with increasing concentrations of saline solution.

Suwalsky *et al.* [29] Reports that the anti-haemolytic activity of flavonoids interacts with membranes by insertion in the lipid bilayer and protect erythrocytes from hypotonic lysis [19]. Polyphenol was able to localize the plasma membrane and increase red blood cells integrity. The plant extract could potentially affect osmotic stability through perturbation of any of three parameters: H, H_{50} and dS where:

$H = A_1 - A_2$ where A_1 and A_2 are the mean maximal and minimal absorbance values of the sigmoid.

H_{50} is the NaCl concentration that causes 50% of haemolysis.

dS the amplitude of the haemolysis transition between A_1 and A_2

A stabilizing effect could be associated with an increase in dS and decreases in H_{50} ; whereas a destabilizing effect would be indicated by a decrease in dS and an increase in H_{50} [30].

Presence of aqueous extract of *Pistacia lentiscus* affected the parameter of osmoses (table2). A statistically significant decrease in H_{50} and an increase in dS was observed in the presence of the extract at 3000 μ g/ml, indicating the property of stabilizing erythrocyte membranes. Wloch and *al.*, suggested that this increased osmotic

resistance against hypotonic stress may be a consequence of the multi-morphological states of red blood cell [31].

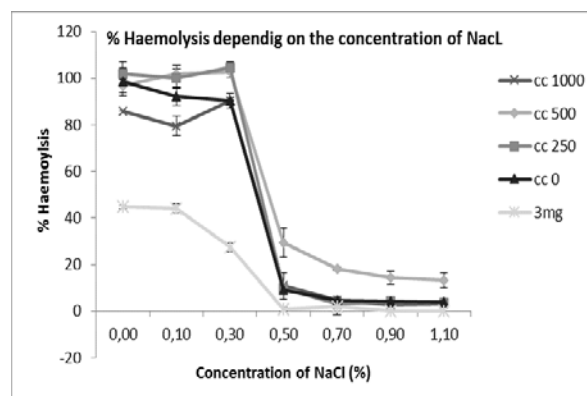


Fig. 6: Comparison of osmotic stability curves of human erythrocytes in the absence (control) and in presence of aqueous extract at 250-500-1000 and 3 mg/ml. Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

Table 2: Effect of the plant aqueous extract on the human erythrocytes osmotic stability

Concentration of extract (μ g/ml)	H	H_{50}	dS
Control	1.73 $\pm$ 0.020	0.32 $\pm$ 0.052	0.11 $\pm$ 0.072
250	1.75 $\pm$ 0.045	0.32 $\pm$ 0.098	0.12 $\pm$ 0.033
500	1.55 $\pm$ 0.680	0.25 $\pm$ 0.078	0.08 $\pm$ 0.01
1000	1.45 $\pm$ 0.220	0.32 $\pm$ 0.055	0.10 $\pm$ 0.012
3000	0.75 $\pm$ 0.012	0.30 $\pm$ 0.022	0.30 $\pm$ 0.054

Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

Protective effect of aqueous extract to oxidative effect caused by HOCl

We evaluated the protective effect of aqueous extract of *Pistacia lentiscus* on human erythrocytes exposed *in vitro* to the oxidative stress induced by HOCl. HOCl is an extremely toxic biological oxidant generated by neutrophils and monocytes, it is considered as one of the most important factors causing tissue injuries in inflammation [32]. Fig. 7 shows the effect of aqueous extract in varying concentrations (1000, 500, 250 and 125 μ g/ml) on human erythrocytes exposed to radical initiator HOCl (0.15, 0.075 and 0.0375%).

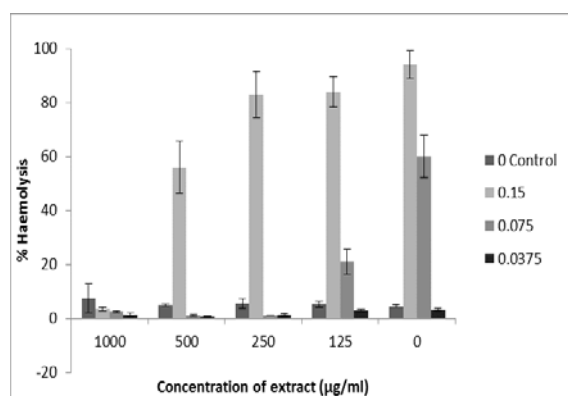


Fig. 7: Suspension of erythrocyte treated with different concentration of HOCl with the presence of aqueous extract at 1000-500-250-and 125 μ g/ml of extract and without presence of extract. Each value is represented as means $\pm$ SD (n=3)

The presence of gradual concentration of HOCl, in an absence of extract, causes gradual haemolysis. We observe 94.32 $\pm$ 5.06, 60 $\pm$ 7.97 and 3.35 $\pm$ 0.43% in the presence of respectively 0.15-0.075 and 0.0375% of HOCl. In the presence of aqueous extract of *Pistacia lentiscus*, we note significantly decreasing of the haemolysis induced by the concentrations of HOCl. We observe 7.47% of haemolysis caused by 0.15% of HOCl in the presence of 1000 μ g/ml of the extract and 94.32 $\pm$ 5.06% in the absence of the extract.

We observed significant reducing haemolysis in the presence of the different concentration of the extract. The authors of many works consider the effective protection of biological membranes against oxidation depends on the capacity of the polyphenolic substance binding to membranes [32]. Plant extract of *Primula heterochroma* demonstrates notable anti-haemolytic activity. It binding to the lipids and proteins of red blood cell membranes than it inhibit lipid peroxidation and also increases red cell integrity against haemolysis [33].

Antibacterial activity

Antibacterial activity is shown in (table3) which indicated that all fractions inhibit the microorganisms tested. A maximum inhibition zone of 30.33 $\pm$ 5.5 mm was observed on *Pseudomonas aeruginosa* for wood-seed. While moderates activity was obtained against all strain. Several researchers have mentioned that extracts have antibacterial activity. *Pistacia lentiscus* L. has found to be effective against *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [34]. In another search, Hamad *et al.* [35] mentioned that the ethanolic extract obtained from *Pistacia lentiscus* showed a moderately high activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*. In the same way *Pistacia lentiscus* extract obtained by decoction showed the best antimicrobial activity against *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [36].

Table 3: Antibacterial activity of aqueous extract of different part of *Pistacia lentiscus*, expressed by diameter (mm) of inhibition zone

	Le	Ws	Is	Atb
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.33±0.5	12±1.00	9±1.00	23.33±4.72
<i>Bacillus cereus</i>	10.00±0.0	7.33±1.15	6.33±0.57	38.33±5.73
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.00±0.0	30.33±5.50	9.33±4.04	7±0.00
<i>Proteus mirabilis</i>	11.00±1.7	11.33±2.08	7±0.00	8.66±2.08
<i>Listeria monocytogenes</i>	09.33±0.5	7.33±0.57	10±1.00	7±0.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09.00±1.0	11.33±1.15	7.33±2.30	0.00
<i>Enterobacter faecalis</i>	09.33±0.5	11.33±1.52	9.33±2.08	30.5±0.7
<i>Escherichia coli</i>	09.33±2.3	0.00	0.00	0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	09.00±0.0	0.00	0.00	0.00
<i>Citrobacter freundii</i>	11.00±1.0	0.00	0.00	0.00

Le: Leaves (1.5 mg/disc), Ws: Wool-seed: (0.55 mg/disc), Is: immature-seed (2.25 mg/disc), Atb: antibiotic: trimethoprim/sulfamides. Each value is represented as means±SD (n=3)

CONCLUSION

The aqueous extract of *Pistacia lentiscus* contained a high level of phenolic compound and has an effective antioxidant in different assay including DPPH radical, hydrogen peroxide scavenging, reducing power and total antioxidant capacity. In addition the aqueous extract protected human erythrocytes against hypotonic shock, against oxidative stress and in saponin injury. While moderate antibacterial activity was observed. It is also suggested that the aqueous extract is viewed as a potential source of natural antioxidant, which can provide protection to human erythrocytes.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have no conflict of interest directly relevant to the content of this article.

REFERENCES

- Shabana A, El-Menyar A, Asim M, Al-Azzeh H, Al Thani H. Cardiovascular benefits of black cumin (*Nigella sativa*). Cardiovasc Toxicol 2013;13:9-21.
- Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi Modesti A, Bei R. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on Cancer treatment. Int J Mol Sci 2015;16:9236-82.
- Rehman H, Krishnasamy Y, Haque K, Thurman RG, Lemasters JJ, Rick G, et al. Green tea polyphenols stimulate mitochondrial biogenesis and improve renal function after chronic cyclosporin a treatment in rats. PLoS One 2013;8:e65029.
- Margaris NS. Adaptive strategies in plants dominating mediterranean-type ecosystem. In: Di Castri F, Goodall DW, Specht RL. Ecosystem of the world 11. Mediterranean-type Shrublands. New York: Elsevier Science; 1993. p. 309-15.
- Bacchetta G, Cappai G, Carucci A, Tamburini E. Use of native plants for the remediation of abandoned mine sites in Mediterranean semiarid environments. Bull Environ Contam Toxicol 2015;94:326-33.
- Djerrou Z. Anti-hypercholesterolemic effect of *Pistacia lentiscus* fatty oil in egg yolk-fed rabbits: a comparative study with simvastatin. Chin J Nat Med 2014;12:561-6.
- Giaginis C, Theocharis S. Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. Nutr Cancer 2011;63:1174-84.
- Azatze H, Teiahfert F, Abbasfi Markovics A, Muklada H, Ungar ED, Landau SY. Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. Vet Parasitol 2013;191:44-50.
- Mezni F, Aouadhi C, Khouja ML, Khartii A, Maaroufi A. *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. Nat Prod Res 2015;29:565-70.
- Joshua DL, Shengmin S, Chung SY. Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks. Chem Res Toxicol 2007;20:583-5.
- Cao G, Sofic E, Prtor RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Biol Med 1997;22:749-60.
- Sadegh F, Ebrahim Z, Zeinab A, Roghayeh P, Ali MA, Amrollah M, et al. Total Phenolic and Flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle an *in vitro* antiproliferative effect on Hela and BT-474 cell lines. Int J Mol Cell Med 2014;3:102-7.
- Jayaprakasha GK, Jagannathan RL, Sakariah KK. Antioxidant activities of flavin in different *in vitro* model systems. Bioorg Med Chem 2004;12:5141-6.
- Fejes S, Blázovics A, Luqasi A, Lemberkovics E, Pétri G, Kéry A. *In vitro* antioxidant activity of Anthriscus cerefolium L. (Hoffm.) extracts. J Ethnopharmacol 2000;69:259-65.
- Pingping W, Guangzhi M, Nianhui L, Qian D, Yanyan Y, Ruqiang H. Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. Food Chem 2015;173:194-202.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem 1999;269:337-41.
- Koga T, Moro K, Terao J. Protective effect of a vitamin E analog, phosphatidylcholine, against oxidative hemolysis of human erythrocytes. Lipids 1998;33:589-95.
- Duchnowicz P, Milena BM, Podsedek A, Koter-Michalak M. Effect of polyphenols extracts from *Brassica* vegetables on erythrocyte membranes (*in vitro* study). Environ Toxicol Pharmacol 2012;34:783-90.
- de Freitas MV, Netto Rde C, da Costa Huss JC, de Souza TM, Costa JO, Firmino CB, et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. Toxicol In vitro 2008;22:219-24.
- Battistelli M, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiari L, Dacha M, Gobbi P. *Rhodiola Rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and haemolytic behaviour. Eur J Histochem 2005;49:243-54.
- Bougandoura N, Bendjimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. Nepla (L) Briq. Nature Technol 2013;9:14-9.
- Gawron-Gzella A, Duked-Makuch M, Matlawski I. DPPH radical scavenging activity and polyphenolic compound content in different leaf extract from selected blackberry species. Acta Biol Cracov Ser Bot 2012;54:32-8.
- Bors M, Siciska P, Michalowicz J, Wieteska P, Bukowska P. Evaluation of the effect of tomentosa extracts on the size and shape of human erythrocytes (*in vitro*). Environ Toxicol Pharmacol 2012;23:127-34.
- Nasem SA, Farmah M, Najmi MH. Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves. J Ethnopharmacol 2008;117:478-82.
- Saikat S, Biplab D, Devanna N, Raja C. Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of leaves of *Meyma spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. Chin J Nat Med 2013;11:149-57.
- Nabavi SF, Ibrahimzadeh MA, Nabavi SM. Antihemolytic and antioxidant activities of *Biebersteinia multifida*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2010;14:823-30.
- Chamira DF, Preethi S. Total phenolic, flavonoid contents, *in vitro* antioxidant activities and hepatoprotective effect of aqueous leaf extract of *Atalantia ceylanica*. BMC Complementary Altern Med 2014;14:395.

28. Spag SG, Light ME, Staden JV. Biological activities and distribution of plant saponin. J Ethnolopharmacol 2004;94:219-43.
29. Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. Protective effect of Ugni molinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. Food Chem Toxicol 2007;45:130-5.
30. He J, Lin J, Li J, Zhang JH, Sun XM, Zeng CM. Dual effects of ginkgo biloba leaf extract on human red blood cells. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2008;104:139-44.
31. Wloch A, Kapusta I, Bielecki K, Oszmianski J, Kleszczyńska H. Activity of Hawthorn leaf and bark extract in relation to biological membrane. J Membr Biol 2013;246:545-56.
32. Nabavi SM, Nabavi SF, Setzer W, Alinezhad H, Zare M, Naqinezhad A. Interaction of different extracts of Primula heterochroma Stapf. With red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. J Diet Suppl 2012;9:285-92.
33. Juscova M, Snirc V, Krisonova L, Stefek M. Effect of carboxymethylated pyridoindoles on free radical induced hemolysis of rat erythrocytes *in vitro*. Acta Biochim Pol 2010;57:153-6.
34. Iank L, Ragausa S, Rapisarda A, Franco S, Nicolsi VM. *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extract: preliminary report. J Chemother 1996;8:207-9.
35. Hamad HH, Ibrahim HH, Mariam HG, Mojahidul I. Comparative phytochemical and antimicrobial investigation of some plants growing in Al Jabal Al-Akhdar. J J Nat Prod Plant Resour 2011;1:15-23.
36. Shaikh I, Mohd T, Syed JA, Shahid SC, Mirza GB. *Pistacia lentiscus* Linn.: Gum with immense medicinal potential. Spatula DD 2013;3:69-73.

Mitotic Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells Induced by *Origanum majorana* Extract: Upregulation of TNF- α and Downregulation of Survivin and Mutant p53

Yusra Al Dhaheri¹, Ali Eid^{1*}, Synan AbuQamar¹, Samir Attoub², Mohammad Khasawneh³, Ghenima Aiche⁴, Soleiman Hisaindee³, Rabah Iratni^{1*}

1 Department of Biology, College of Science, United Arab Emirates University, Al-Ain, United Arab Emirates, **2** Department of Pharmacology & Therapeutics, Faculty of Medicine & Health Sciences, United Arab Emirates University, Al-Ain, United Arab Emirates, **3** Department of Chemistry, College of Science, UAE University, United Arab Emirates University, Al-Ain, United Arab Emirates, **4** Département de Biochimie et Microbiologie, Faculté des sciences biologiques et agronomiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algeria

Abstract

Background: In the present study, we investigated the effect of *Origanum majorana* ethanolic extract on the survival of the highly proliferative and invasive triple-negative p53 mutant breast cancer cell line MDA-MB-231.

Results: We found that *O. majorana* extract (OME) was able to inhibit the viability of the MDA-MB-231 cells in a time- and concentration-dependent manner. The effect of OME on cellular viability was further confirmed by the inhibition of colony growth. We showed, depending on the concentration used, that OME elicited different effects on the MDA-MB 231 cells. Concentrations of 150 and 300 $\mu\text{g/mL}$ induced an accumulation of apoptotic-resistant population of cells arrested in mitosis and overexpressing the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 and the inhibitor of apoptosis, survivin. On the other hand, higher concentrations of OME (450 and 600 $\mu\text{g/mL}$) triggered a massive apoptosis through the extrinsic pathway, including the activation of tumor necrosis factor- α (TNF- α), caspase 8, caspase 3, and cleavage of PARP, downregulation of survivin as well as depletion of the mutant p53 in MDA-MB-231 cells. Furthermore, OME induced an upregulation of $\gamma\text{-H2AX}$, a marker of double strand DNA breaks and an overall histone H3 and H4 hyperacetylation.

Conclusion: Our findings provide strong evidence that *O. majorana* may be a promising chemopreventive and therapeutic candidate against cancer especially for highly invasive triple negative p53 mutant breast cancer; thus validating its complementary and alternative medicinal use.

Citation: Al Dhaheri Y, Eid A, AbuQamar S, Attoub S, Khasawneh M, et al. (2013) Mitotic Arrest and Apoptosis in Breast Cancer Cells Induced by *Origanum majorana* Extract: Upregulation of TNF- α and Downregulation of Survivin and Mutant p53. PLoS ONE 8(2): e56649. doi:10.1371/journal.pone.0056649

Editor: Parnela Rameshwar, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, United States of America

Received: November 22, 2012; **Accepted:** January 11, 2013; **Published:** February 22, 2013

Copyright: © 2013 Al Dhaheri et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Faculty of Science interdisciplinary research grant UAE University and by the Emirates Foundation research grant (2009–80) to R. Iratni. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: R_iratni@uae.ac.ae

‡ Current address: Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, Doha, Qatar

Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer among women and ranks second as a cause of cancer death in women after lung cancer. An estimated 226,870 new cases of invasive breast cancer are expected to occur among women in the US during 2012 [1]. Plants have been shown to be an excellent source of new drugs, including anticancer agents. Identification and development of new chemotherapeutic agents from plants have gained significant recognition in the field of cancer therapy and become a major area of experimental cancer research. The majority of the chemotherapeutic drugs used in cancer treatment, is either from plant origin or chemically-altered plant products and phytochemicals [2]. In fact, plant-derived anticancer drugs are much more effective and do not have large side-effect consequences compared to synthetic drugs. Examples of anticancer drugs derived from plants and currently in clinical use include the

vinca alkaloids vinblastine and vincristine were isolated from *Catharan roseus*, the terpene paclitaxel from *Taxus brevifolia* Nutt., and the DNA topoisomerase I inhibitor camptothecin from *Camptotheca acuminata* [3].

Phytochemicals exert their chemoprevention effect of carcinogenesis through several mechanisms. These include inhibition of genotoxic effects, increased antioxidants and anti-inflammatory activity, modulation of cellular signaling pathways and altering gene expression to inhibit cell proliferation and/or induce apoptosis [4].

It is well known that cancer is pathological condition that has been associated with aberrantly regulated apoptosis. It is currently accepted that certain phytochemicals and whole plant extracts can affect the overall process of carcinogenesis by multiple mechanisms. Since apoptosis provides a physiologic protective mechanism for eliminating genetically damaged cells, initiated cells or

cells progressed to malignancy; phytochemicals affecting apoptosis can have an important effect on carcinogenesis [5].

Increasing number of studies have shown evidence of chemoprevention and chemotherapy by stimulating apoptosis in pre-cancerous and cancerous cells *in vitro* or *in vivo* suggesting that apoptosis is likely to be a crucial mechanism to suppress carcinogenesis. Epigallocatechin gallate (EGCG) (from green tea), curcumin (*Curcuma longa*), quercetin (Vegetable and fruits) are some examples of chemopreventive agents, from natural origin, that induce apoptosis in carcinogenesis models or in human chemoprevention trials [6,7]. Also, a number of plant extracts, such as blueberry [8], mushroom [9], gingerol [10], to name just a few, were shown to have anticancer effects against breast cancer cells.

Origanum majorana belongs to the family Lamiaceae. It is commonly known as marjoram. It is a perennial herb and widespread worldwide. A large number of known species of the genus *Origanum* are utilized worldwide as spices and flavoring agents and has a long history of both culinary and medicinal use. *O. majorana* is used as a home remedy for chest infection, cough, sore throat, rheumatic pain, nervous disorders, stomach disorders, cardiovascular diseases, and skin care [11,12]. Many of such traditional uses of *marjoram* species were confirmed in several studies utilizing both *in vitro* and *in vivo* approaches.

Several reports indicate that *O. majorana* is very rich in phenolic compounds. The high phenolics content in *Origanum* has a capacity to scavenge free radicals and shown to be associated with the strong antioxidant activity [13]. *O. majorana* was shown to contain phenolic terpenoids (thymol and carvacrol), flavonoids (diosmetin, luteolin, and apigenin), tannins, hydroquinone, phenolic glycosides (arbutin, methyl arbutin, vitexin, orientin, and thymonin) and triterpenoids (ursolic acid and oleanolic acid) [14].

O. majorana has been reported to exhibit a significant antimicrobial activity [15]. Several studies have also demonstrated that ethanolic, aqueous extracts and essential oil of *O. majorana* could protect against liver and kidney damage and genotoxicity induced by lead acetate [16–18]. *O. majorana* has also been found to inhibit platelet adhesion aggregation and secretion [19]. Furthermore, it has been shown that this plant exerts a low cytotoxicity on several hepatoma cell lines [20]. It has been shown by Al Harbi that extract of *O. majorana* reduced the side effects induced by cyclophosphamide, an established anticancer drug, without altering its cytotoxicity [12].

In the present study, we investigated the effect of *Origanum majorana* ethanolic extract (OME) on breast cancer cells. We examined the effects of OME on cell viability, cell cycle, apoptosis, and the levels of several cell cycle and apoptosis control proteins in the highly proliferative and invasive Estrogen Receptor (ER)-negative, mutant p53 breast cancer cell lines MDA-MB-231. Our results demonstrate that OME can inhibit the growth of the MDA-MB-231 cells by causing cell cycle arrest and apoptosis dependent on the downregulation of survivin and mutant p53.

Materials and Methods

Preparation of the *Origanum majorana* Ethanolic Extract

Origanum majorana commonly known as “marjoram” and used as a culinary herb, was obtained from a private commercial farm located in the Tyre region of Lebanon. All necessary permits were obtained for the harvesting of the leaves. The identity of the OM dried leaves used in this study was further confirmed by a plant taxonomist. 5.0 g of the dried leaves were ground to a fine powder using a porcelain mortar and pestle. The powder was suspended in 100 mL of 70% absolute ethanol and the mixture was kept in the

dark for 72 hours at 4°C in a refrigerator without stirring. The mixture was then filtered through a glass sintered funnel and the filtrate was evaporated to dryness using a rota-vapor at room temperature. The green residue was kept under vacuum for 2–3 hours and its mass was recorded.

Cell Culture and Reagents

Human breast cancer cells MDA-MB-231 were maintained in DMEM (Hyclone). The culture media was supplemented with 10% fetal bovine serum (invitrogen), 100 U/ml penicillin/streptomycin (invitrogen). Antibodies to p21 (556431), PARP (556494) were obtained from BD Pharmingen. Antibodies to phosphor-H2A.X (ser139) (07–164), acetyl-Histone H3 (06–599), acetyl-Histone H4 (06–866) and phosphor-Histone H3 (ser10) (05–1336), p53 (E26, 04–241) and cyclin B1 (05–373) were obtained from Millipore. Antibodies to survivin (sc-17779), β -actin (C4, sc-47778), goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005) and goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Antibody to TNF- α (ab9739) was obtained from abcam and antibodies AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11008), AlexaFluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11005) were obtained from invitrogen.

Cellular Viability

Cells were seeded in triplicate in 96-well plates at a density of 5,000 cells/well into 96-well plates. After 24 h of culture, cells were treated with increasing concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control and incubated for the indicated time period. Cell viability was determined using a CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay (Promega Corporation, Madison, USA), based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically active cells. Luminescent signal was measured using Berthold FB12 Luminometer. Data were presented as proportional viability (%) by comparing the treated group with the untreated cells, the viability of which is assumed to be 100%.

Measurement of Caspase 3/7, 8 and 9 Activities

MDA-MB-231 cells were seeded at the density of 5,000 cells/well into 96-well plate in triplicate and treated with indicated concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control for 24 and 48. Caspase-3/7, 8 and 9 activities were measured using a luminescent caspase-Glo 3/7, caspase8 and caspase 9 assay kit (Promega Corporation, Madison, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, caspase reagents were added to triplicate wells of a 96-well plate which was then mixed in an orbital shaker and incubated for 2.5 h at room temperature in the dark. Luminescent signal was measured as described above.

Flow Cytometric Analysis of Cell Cycle

MDA-MB 231 cells were seeded in 100 mm culture dishes and cultured for 24 h before addition of various concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control. After incubation for the indicated time, cells were harvested by trypsin release, washed twice with ice-cold PBS, resuspended in 500 μ L PBS, fixed with an equal volume of 100% ethanol and incubated for at least 12 h at -20°C . Before flow cytometry analysis, cells were pelleted, washed twice with PBS, permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS for 15 min on ice, pelleted and then resuspended in PBS containing 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A, and incubated at 37°C for 30 min. Cell samples were analyzed on the BD FACSCanto II (Becton

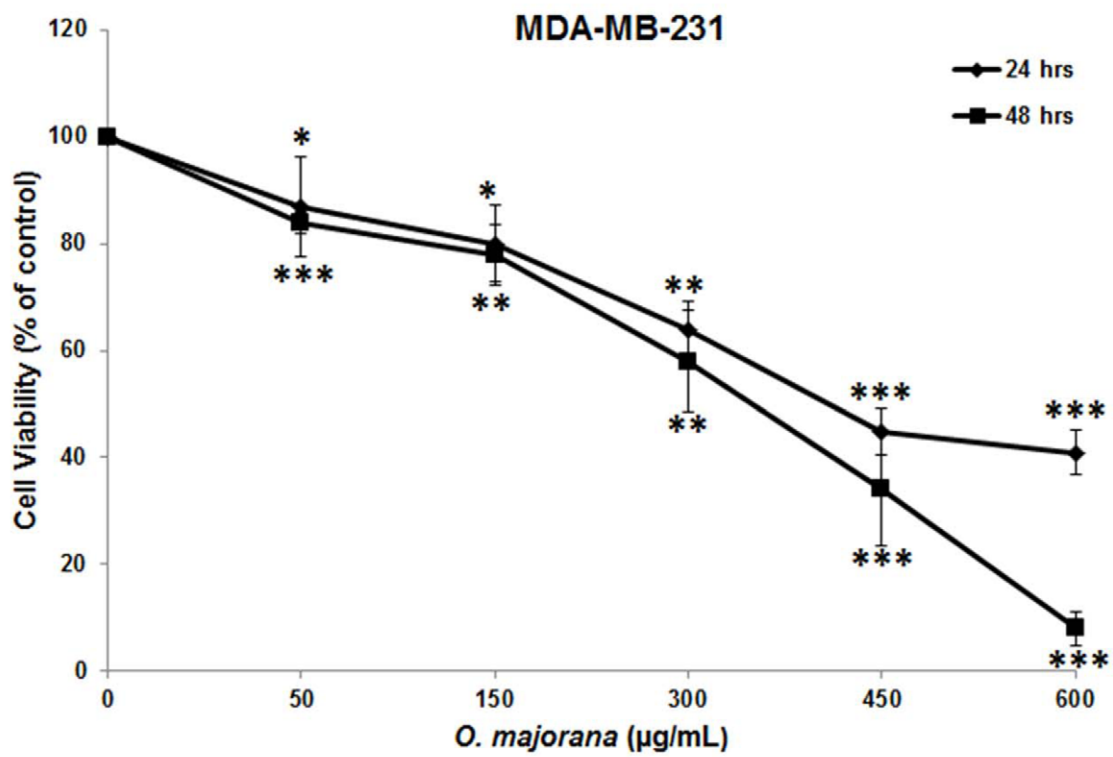
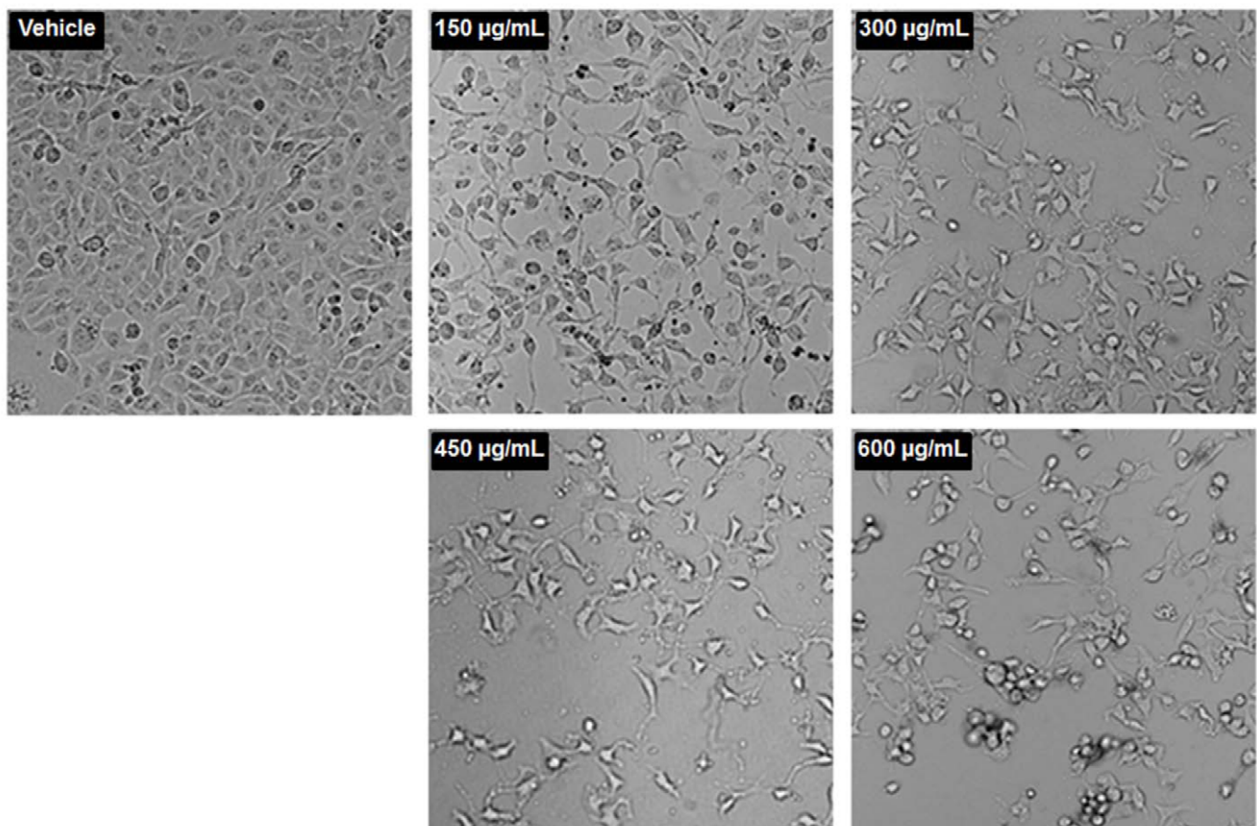
A.**B.**

Figure 1. Effect of *O. majorana* extract on cell morphology and viability of human breast cancer cell MDA-MB-231 cells. Cells (5×10^3 cells/well; 96-well plates) were cultured in DMEM supplemented with 10% Fetal bovine serum. (A) Cell viability (in percent) determined by using CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability assay, after incubation of the exponentially growing cells with the indicated concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control for 24 and 48 h. (B) Micrograph of MDA-MB-231 cells, after 24 h incubation with various concentrations of OME. Data represent the mean of at least three independent experiments carried out in triplicate. Student's *t* test was performed to determine the significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$). doi:10.1371/journal.pone.0056649.g001

Dickinson). Data acquisition was performed using FACSDiva 6.1 software. Percentage of cells in G1, S and G2/M phases were determined using the FlowJo software.

Immunofluorescence Staining

MDA-MB 231 cells (3×10^4) were grown in complete media on 4 well labtek chamber slide (Nunc) for 24 h, then treated with the indicated concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control for 24 h. Cells were then fixed in 10% formalin solution (4% paraformaldehyde) (Sigma-Aldrich) for 5 min at RT followed by permeabilization in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 5 min at RT. Cells were then washed three times with PBS, blocked with 5% nonfat dry milk in PBS for 30 min at RT and incubated with the primary antibody diluted, at the concentration suggested by the manufacturer, in 1% nonfat dry milk/PBS overnight at 4°C. Following overnight incubation, cells were washed three times with PBS and placed for 1 h at RT in the presence of rhodamine-conjugated or fluorescein-conjugated secondary antibody diluted at 1:200 in 1% nonfat dry milk/PBS. After washing with PBS, sample cells were mounted in Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich) and examined under Nikon Ti U fluorescence microscope.

Cell Extract and Western Blotting Analysis

Cells (1.8×10^6) were seeded in 100 mm culture dishes and cultured for 24 h before addition of various concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control. After incubation for the indicated times, cells were washed twice with ice-cold PBS, released by scraping, pelleted and lysed in RIPA buffer supplemented with protease/phosphatase inhibitor cocktail. Following incubation for 30 min on ice, the cell lysate was obtained by centrifugation at 14,000 rpm for 20 min at 4°C. Protein concentration of lysates was determined by BCA protein assay kit (23225, Thermo Scientific) and the lysates were adjusted with lysis buffer. Aliquots of 25 µg of total proteins were resolved onto 10–12% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (88018, Thermo Scientific) and blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat dry milk in TBST (TBS and 0.05% Tween 20). Incubation with specific primary antibodies was performed in blocking buffer overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG was used as secondary antibody. Immunoreactive bands were detected by ECL chemiluminescent substrate (32209, Thermo Scientific). Membrane stripping by incubating the membrane in Restore western blot stripping buffer (21059, Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Colony Formation Assay in Soft Agar

Assays were performed in six-well plates. The lower (base) layer consisted of 1 ml 2.4% Noble agar. The base layer was overlaid with a second layer consisted of 2.9 ml growth medium, 0.3% Noble agar, and 3×10^4 MDA-MB-231 cells. Agar at 50°C was mixed with medium at 37°C, plated, and left to set for 10 min. Then 2 ml of growth medium was added on the top of the second layer. Plates were incubated at 37°C, humidified, and 5% CO₂. Cells were allowed to grow in absence of treatment for 14 days

until visible colonies were formed. Plates were fed twice a week with 2 ml of regular complete growth medium (DMEM). After 2 weeks, plates were fed with medium containing either the indicated concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control and the colonies were allowed to grow for one more week. Following treatment, the plates were washed twice with PBS and then colonies were fixed with 10% ice-cold methanol for 10 min and washed once with PBS. The colonies were allowed to stain for 1 hr in solution containing 2% Giemsa. The size of the colonies were measured, counted using a microscope (10X) and the colony size was categorized as Large (>200 µm) or small (50–200 µm). Colony sizes were expressed as a percentage of total counted colonies and then compared to the vehicle treated controls (ethanol). The experiment was repeated two times.

Statistical Analysis

Results were expressed as means $\pm$ S.E.M. of the number of experiments. A Student's *t*-test for paired or unpaired values was performed and a *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

O. majorana Extract Inhibits the Viability of the MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

To examine the anticancer activity of *Origanum majorana* extract (OME) on breast cancer cells, we first measured the effect of various concentrations of the extract (0, 50, 150, 300, 450 and 600 µg/mL) on the proliferation of the MDA-MB-231 breast cancer cell line (Figure 1A). Our results show that the exposure of the MDA-MB-231 to OME decreased cellular viability in a concentration- and a time-dependent manner. The IC₅₀ (producing half-maximal inhibition) was approximately 350 µg/mL at 24 h and 400 µg/mL at 48 h treatment. The observation of the OME-treated MDA-MB231 cells under light microscopy also revealed that the number of cells decreased when the concentration increased. Furthermore, as shown in figure 1B, light microscopy observation of MDA-MB231 cells treated with concentrations of 150, 300 and 450 and 600 µg/mL OME, underwent morphological changes characterized by a loss of their epithelial morphology visible after 24 h of treatment. Echinoid spikes and cellular rounding, characteristics of apoptotic cells were also observed.

O. majorana Extract Leads to Mitotic Arrest and Apoptosis in MDA-MB-231 Cells

The ability of an anticancer drug to affect cell cycle distribution can provide information regarding its cytotoxic mechanism(s) of action. For this reason, we investigated the effect of OME on cell cycle distribution by flow cytometry. MDA-MB 231 cells were treated with indicated concentrations of *O. majorana* for 24 h and subjected to cell cycle analysis. At the concentration of 150 µg/mL, OME caused obvious G₂/M arrest on these cells (figure 2A). Indeed, the population of G₂/M increased significantly from 23 to 51.7% as the concentration of the OME increased to 150 µg/mL,

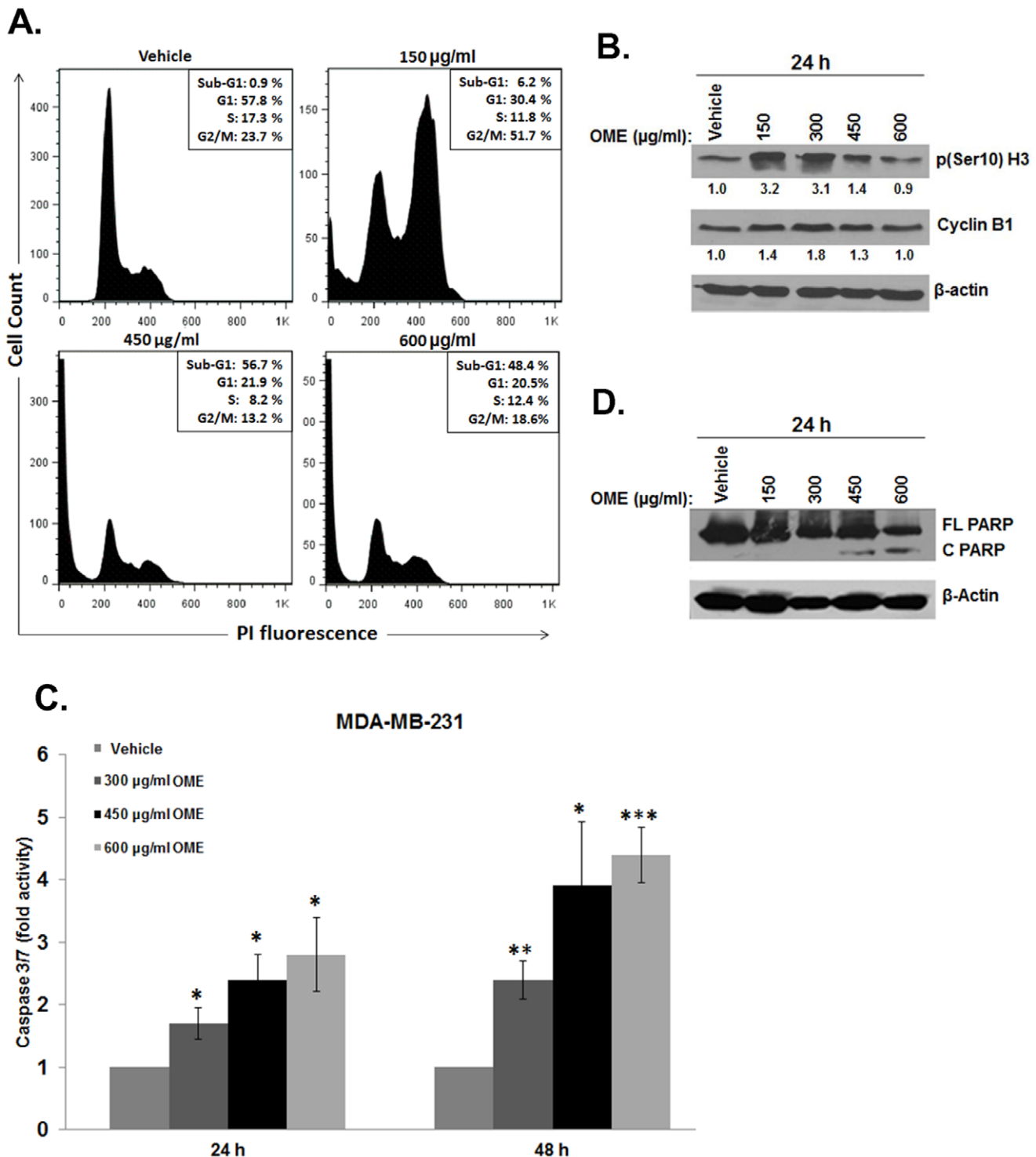


Figure 2. Induction of G2/M cell cycle arrest and apoptosis by *O. majorana* extract in MDA-MB-231 cells. (A) MDA-MB-231 cells (1.8×10^6) seeded on 100 mm culture dish were exposed various concentrations of *O. majorana* extract or equal volume of vehicle (ethanol) as control for 24 h. Following treatment, cells were harvested, fixed, stained with propidium iodide, and analyzed for cell cycle distribution by flow cytometry. Data represent the mean of three independent experiments. The percentage of cells in sub-G1 (apoptosis), G1, S and G2/M appears at the upper right of each graph. (B) Expression of cell cycle regulator in OME-treated MDA-MB-231. Western blot analysis of phospho(ser10)-H3, and cyclin B1 in MDA-MB231 cells exposed for 24 h to ethanol or indicated concentrations of OME. (C) Stimulation of caspase 3/7 activity in MDA-MB-231 cells after exposure to OME (0–600 µg/mL) for 24 h and 48 h, relative to a similar amount of viable ethanol-treated cells. The relative caspase 3/7 activity was normalized to the number of viable cells per well and is expressed as fold of induction compared to the control. (D) Concentration-dependent induction of PARP cleavage in OME-treated MDA-MB231 cells. Cells were treated with or without increasing concentrations of the extract and proteins were extracted as described in Materials and Methods. Western blot analysis was carried out using anti-PARP antibodies. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$). doi:10.1371/journal.pone.0056649.g002

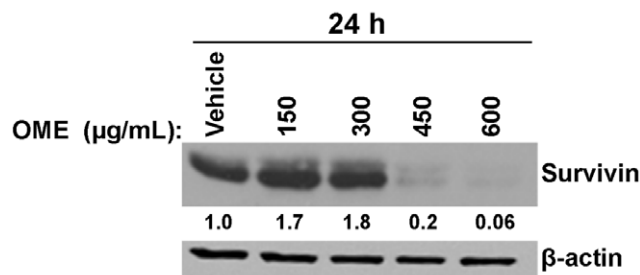


Figure 3. Differential regulation of survivin expression by OME in MDA-MB-231 cells. Western blot analysis showing a differential effect on survivin expression by different concentrations of OME in MDA-MB-231 cells. Whole cell protein were extracted from OME or vehicle (ethanol)-treated cells and subjected to Western blot analysis, as described in Materials and Methods, for survivin and β -actin (loading control) proteins.
doi:10.1371/journal.pone.0056649.g003

indicating that OME-treated MDA-MB-231 cells were arrested in G2/M phase. A slight increase in the sub-G1 population (6.2%) indicates that a small population of OME-treated MDA-MB-231 cells are undergoing cell death was also observed by these concentrations. Similar results were obtained for 300 μ g/mL of OME (data not shown). Interestingly, at higher concentrations of OME, flow cytometry analysis revealed a dramatic increase in the apoptotic population (sub-G1 peak) raising from 0.9% in the control to 48.4% and 56.7% in cells treated with 600 and 450 μ g/mL, respectively (Figure 2A).

To determine whether OME induced cell cycle arrest specifically at mitosis or G2 phase, we examined the phosphorylation status of histone H3 (Ser 10). Histone H3 is phosphorylated at serine 10 during mitosis by aurora kinase and the phosphorylation status of H3 is considered a marker of mitosis [21]. We therefore, investigated the expression of p(ser10)H3 and found that treatments 150 and 300 μ g/mL of *O. majorana* significantly increase the phosphorylation level of histone H3 (Figure 2B, upper panel). This result indicates that OME induces mitotic arrest of MDA-MB231 cells. Next, we investigated the mechanism of OME-induced mitotic arrest. Accumulation of cyclin B1 is well known to play an important role in G2/M transition. Knock-down of cyclin B1 with siRNA produces cell cycle arrest predominantly in the G2 phase [22], while an upregulation of cyclin B1 invokes mitotic arrest [23]. We, therefore, investigated the protein level of cyclin B1 in OME-treated MDA-MB-231 cells. We found that treatment with these concentrations of OME leading to mitotic arrest, caused also an increase of cyclin B1 protein in MDA-MB-231 cells (Figure 2B, lower panel), suggesting that cyclin B1 accumulation might play a crucial role in OM triggered mitotic arrest. Taken together, our data reveal a differential concentration effect of OME on cell cycle progression of the MDA-MB 231 cells. Whereas, lower concentrations of OME (150 and 300 μ g/mL) induced a major mitotic arrest with a slight increase in the apoptotic population, higher concentrations (450 and 600 μ g/mL) induced a massive cell death by apoptosis. The reduced cell viability observed in MDA-MB231 cells treated with low concentrations of OME, is possibly due to a large extent to an inhibition of cell proliferation rather than to cell death.

Apoptosis in OME-treated MDA-MB-231 cells was further examined by measuring caspase 3/7 activation in MDA-MB 231 cells treated with various concentrations (300, 450 and 600 μ g/mL) of OME after 24 h of treatment. A concentration- and time-dependent activation of caspase 3/7 was detected in treated cells (Figure 2C). Interestingly, cleavage of the poly(ADP-ribose)

polymerase (PARP) occurred only in cells treated with higher (450 and 600 μ g/mL) but not at lower concentrations (150 and 300 μ g/mL) of OME (Figure 2D). It is noteworthy to mention that at these lower concentrations of OME, only low apoptotic induction rate was observed despite the detection of caspase 3/7 activation.

Concentration-dependent Regulation of Survivin Expression by *O. majorana* Extract

Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family, plays an important role in both the regulation of cell cycle and the inhibition of apoptosis. Survivin levels increase in G2/M phase conferring resistance to apoptosis to the G2/M arrested cells. However, a decrease in survivin levels sensitizes the cells to apoptosis. Several studies have reported that survivin exerts its negative effect on apoptosis by inhibiting the activity of caspase 3, 7 and 9. Therefore, we examined a possible involvement of survivin in the cell cycle arrest and apoptosis triggered by OME. Toward this, we have analyzed, by Western blotting, the expression of survivin in response to various concentrations of OME after 24 h treatment. Interestingly, we observed a differential concentration-effect of OME on survivin expression on the MDA-MB-231 cells (Figure 3). We found that low concentrations of OME led to a substantial increase in the level of survivin, while higher concentrations caused a drastic decrease of survivin (99%). Based on these results, we conclude that OME exerts a concentration-dependent effect on MDA-MB-231 cells. Low concentrations of OME induced a mitotically arrested cells accompanied by survivin upregulation which, in turn, conferred resistance to cell death to this population of cells, probably by inhibiting the activity of caspase 3/7 which was monitored by the absence of PARP cleavage at these concentrations. Treatment of MDA-MB-231 cells with higher concentrations of OME caused a dramatic decrease in survivin expression and consequently sensitized MD-MB-231 cells to apoptosis.

O. majorana Extract Activates the Extrinsic Pathway for Apoptosis via an Upregulation of TNF- α and Activation of Caspase 8

Having shown that OME induces the activation of the effector caspases 3/7, we looked at the activity of the initiator caspases of the extrinsic and intrinsic cell death pathway, namely caspase 8 and caspase 9, respectively. Surprisingly, no caspase 9 activation was detected in response to various concentrations of OME after 24 h of treatment (Figure 4A). On the other hand, caspase 8 activity increased in a concentration-dependent manner in response to OME treatment (Figure 4A). This result demonstrates that the apoptotic effect of the extract on MDA-MB-231 is dependent on caspase 8 activity, which implicates only the extrinsic cell death pathway since neither caspase 9 activation (Figure 4A) nor a change in Bax/Bcl2 ratio (data shown) were observed. After showing that the extrinsic cell death pathway is implicated in OME-dependent apoptosis, we were then interested in determining how this pathway is activated by OME. We determined the changes in the expression level of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in response to OME after 24 h treatment. Western blot analysis revealed a clear increase in the level of TNF α in MDA-MB-231 cells in response to OME treatment (Figure 4B). The upregulation of TNF- α was further confirmed by immunofluorescence assay (Figure 4C). Even though we have shown that OME exerts its effect via the activation of the extrinsic pathway of cell death, we cannot rule out, at this stage,

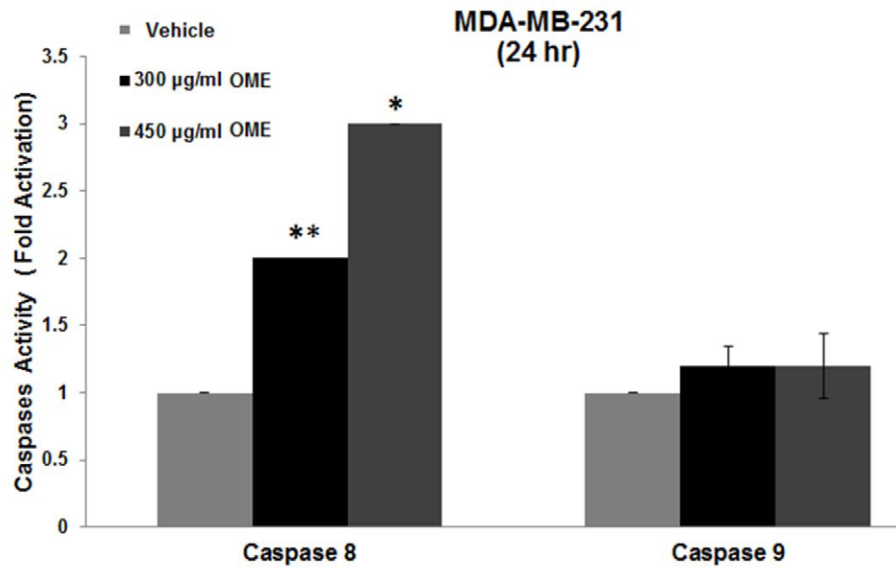
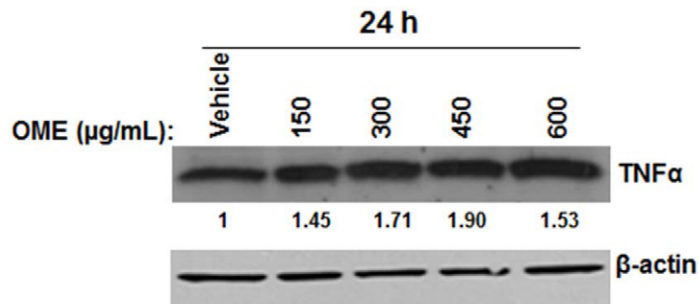
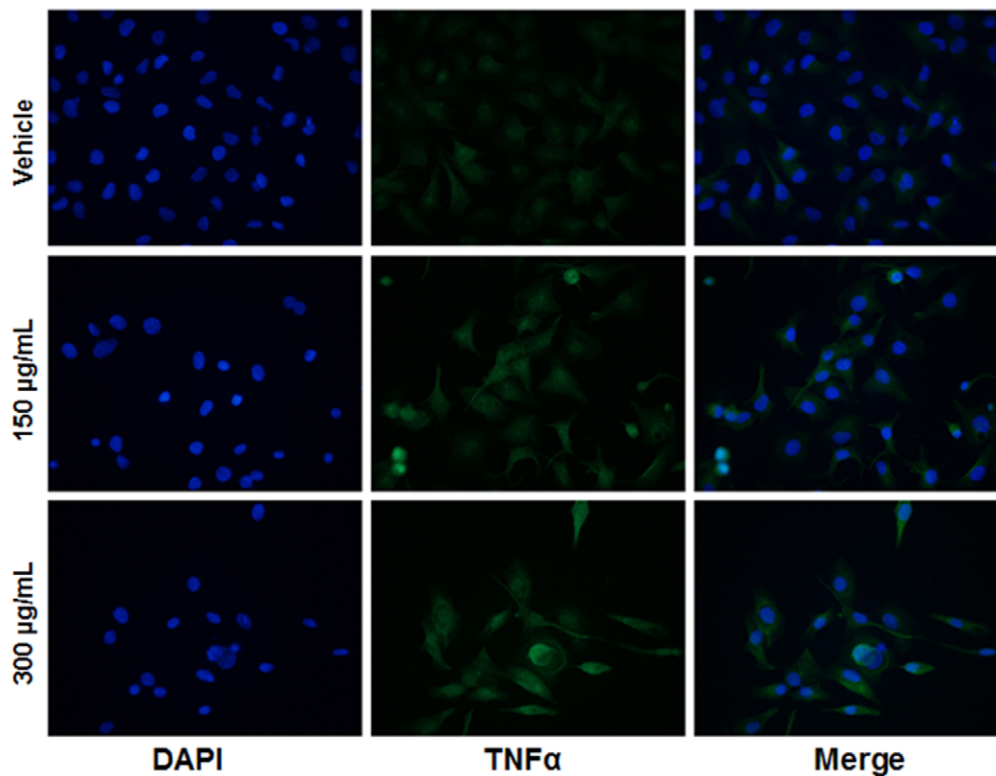
A.**B.****C.**

Figure 4. *O. majorana* induces apoptosis by activation of caspase 8 and upregulation of TNF- α . (A) *O. majorana* extract induces an activation of caspase 8 but not caspase 9 in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were incubated with various concentrations of the extract for 24 h. The caspase activation induced by the OME was assayed as described under Materials and methods. The relative caspase 8 and 9 activity was normalized to the number of viable cells per well and is expressed as fold of induction compared to the control. (B) Western blot analysis showing an increase in cellular TNF- α protein in the MDA-MB-231 cells treated with OME. Whole cell protein were extracted from OME-treated cells or vehicle (ethanol)-treated cells and subjected to Western blot analysis, as described in Materials and Methods, for TNF- α and β -actin (loading control) proteins. (C) Immunofluorescence staining for TNF- α in OME-treated MDA-MB-231 cells. Cells were treated with 150 and 300 μ g/mL of the extract for 24 h, fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence using antibodies against TNF- α protein. DAPI was used as a nuclear stain. (* p <0.05 and ** p <0.005). doi:10.1371/journal.pone.0056649.g004

the possibility of OME-dependent apoptosis could also be triggered by another mechanism.

O. majorana Lead to Depletion of Mutant p53 in MDA-MB-231 and Upregulation of p21^{WAF1/CIP1}

Next, we tested the effect of OME on the expression of the tumor suppressor p53 in MDA-MB-231. Toward this aim, cells were treated with various concentrations of OME and the protein level of the mutant p53 determined. We found that low concentrations of 150 and 300 μ g/mL of OME led to a slight increase in the protein level of mutant p53 (Figure 5, upper panel). Most importantly, Western blotting analysis revealed apoptotic concentrations (450 and 600 μ g/mL of OME) led to almost complete depletion of mutant p53 in MDA-MB-231 cells. This result is a potentially important finding because of the role of mutant p53 protein in human cancers. Because mutant p53 renders cancer cells more resistant to anticancer drugs, abolishing mutant p53 may therefore offer a promising approach for cancer prevention and therapy.

Because p21 protein has been reported to inhibit growth and apoptosis, we investigated whether the growth inhibition mediated by low concentrations (150 and 300 μ g/mL of OME) was also associated with an induction of p21. Western blotting showed an upregulation of p21 protein with at least 2.5 fold increase in cells treated with low concentrations of OME, while a little or no effect on p21 expression was observed with higher concentrations of OME (Figure 5, lower panel). Based on that, we can postulate that p21 upregulation contributes, at least partially, to the cell cycle arrest observed with lower concentrations, while it has little or no role in cell death occurring at higher concentrations of OME.

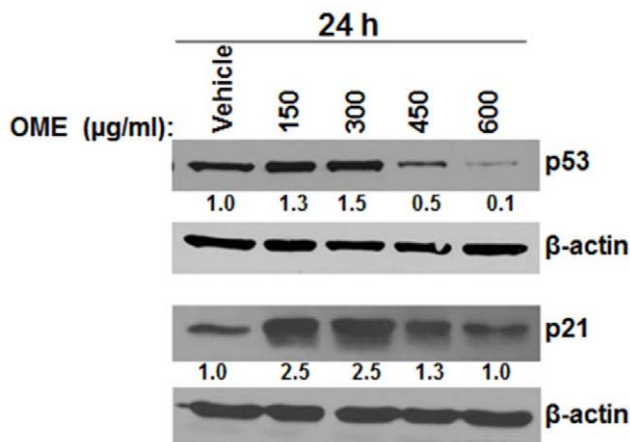


Figure 5. Expression levels of mutant p53 and p21 in *O. majorana*-treated MDA-MB-231 cells. Cells were treated with various concentrations of (150, 300, 450 and 600 μ g/mL) of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control for 24h and the expression of mutant p53, p21 and β -actin were estimated by Western blot. doi:10.1371/journal.pone.0056649.g005

O. majorana Extract Induces Hyperacetylation of Histone H3 and H4 in the MDA-MB 231 Cells

Previously, expression of p21 and increased histone hyperacetylation have been linked to apoptosis and to growth arrest. Therefore, we examined the acetylation profile of histone H3 and H4 in MDA-MB-231 in response to treatment for 24 h to increasing concentrations of OME. As shown in figure 6A, the time course analysis showed a gradual increase in acetylated histones, H3 and H4. A marked overall increase in the acetylation status of histone H3 and H4 was also detected by immunofluorescence staining (Figure 6B). Altogether, these results showed that OME induced hyperacetylation of histone H3 and H4.

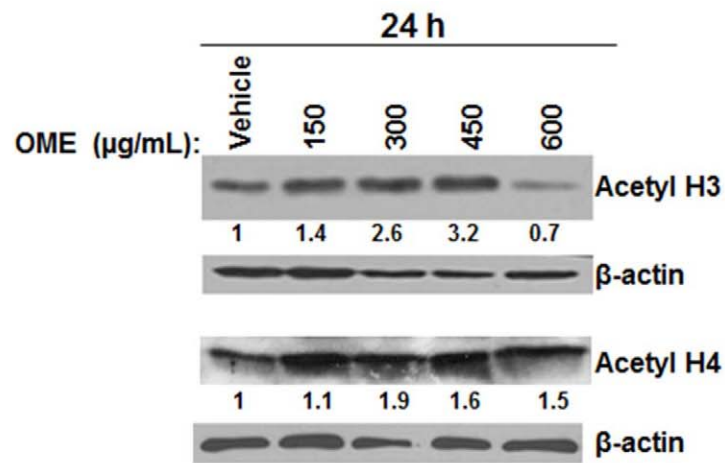
Accumulation γ H2AX, a Marker of Double Strand Breaks, in *O. majorana* Extract Treated MDA-MB 231 Cells

We sought to investigate whether OME induced DNA damage in MDA-MB-231 cells. For this purpose, MDA-MB 231 cells were cultured for 6 and 24 h in complete media containing either ethanol (control) or increasing concentrations of OME (75, 150, 300, 450 and 600 μ g/mL). DNA damage was determined by measuring the levels of phosphorylated H2AX (γ H2AX) after 6 and 24 h of treatment of the MDA-MB-231 cells with OME. Western blotting analysis revealed a time- and a concentration-dependent increase in the levels of γ H2AX in response to OME treatment (Figure 7A), indicating an accumulation of double strand breaks in these cells. The increase in DNA damage was also assessed by immunofluorescence staining of γ H2AX in cells treated with 150, 300 and 450 μ g/mL OME for 24 h. Figure 7C clearly shows a concentration-dependent increase of γ H2AX foci in response to OME. Since the activation of γ H2AX occurred as early as 6 h, a time in which no cell death (data not shown) or caspase 3/7 activation were observed (Figure 7B), this rules out the possibility that the resulting DNA damage is a consequence of DNA fragmentation resulting from caspases' activities and further confirms the potential of this OME extract to induce double strand DNA breaks in a dose-dependent manner.

O. majorana Inhibits Colony Growth of MDA-MB-231

To further confirm the inhibitory potential of *O. majorana* on MDA-MB 231 cells, we sought to determine if OME could inhibit the further growth of already formed MDA-MB-231 colonies. For this purpose, MDA-MB-231 cells were first allowed to grow and form visible colonies in absence of treatment. After 14 days of growth, colonies were incubated with ethanol as control and with OME and allowed to grow for one more week. Figures 8 shows that the size of the ethanol-treated (control) colonies kept growing compared to the size of the two weeks colonies; more large colonies were obtained in the three weeks plate, while less small colonies were counted, indicating that small colonies became larger in size. Interestingly, OM-treated colonies shows regression in colony size compared to the two weeks colonies. In OM-treated plates, the number of large size colonies counted was less than what was obtained in the two weeks plate, while the number of

A.



B.

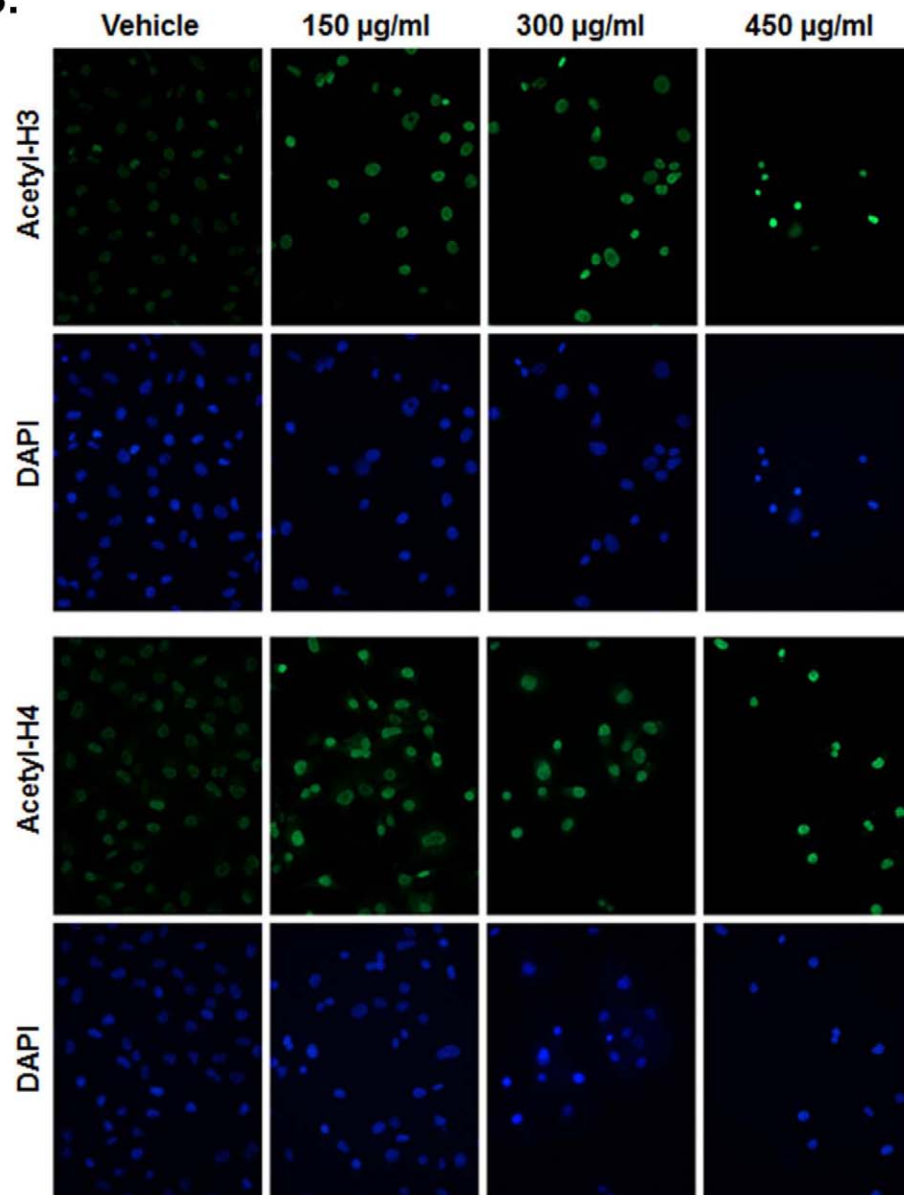


Figure 6. *O. majorana* induces hyperacetylation of histone H3 (AcH3) and H4 (AcH4). (A) Protein levels of Ac-H3 and Ac-H4, extracted from OME-treated cells, were detected by western blot using antibodies specific for the modified histone (Ac-H3) and Ac-H4. β -actin was used as loading control. (B) Immunofluorescence staining of Ac-H3 and Ac-H4 in MDA-MB231 cells treated with 150, 300 and 450 μ g/mL of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control for 24 h. Cells were fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence using antibodies against the indicated modified histones. DAPI was used as a nuclear stain.
doi:10.1371/journal.pone.0056649.g006

small colonies was significantly greater, suggesting size regression in the large colony induced by OME. This result along with the viability and flow cytometry data confirm the anti-cancer effect of OME on the triple negative mutant p53 MDA-MB-231 breast cancer cells.

Discussion

Common cancer treatment drugs aim at inhibiting the cell cycle progression and at inducing cell death and apoptosis. Cancer chemoprevention through these two events (cell cycle arrest and apoptosis) has been reported for several natural compounds [6–10].

In the present study, we have shown that the extract of an ethanolic fraction of *Origanum majorana* inhibited the proliferation of the mutant p53 triple negative breast cancer (TNBC) cell line, MDA-MB-231. We have also demonstrated that OME induces a differential concentration-dependent effect on these cells. OME induces a cell cycle arrest at G2/M phase and more precisely a mitotic arrest at low concentrations. This finding is supported by a body of evidence: (i) increase in the level of p(ser10)H3, a mitotic marker, and (ii) an increase of cyclin B1 protein level, whose upregulation was reported in several mitotically arrested cells. We have also shown that the cell cycle arrest correlates with an upregulation of the CDK inhibitor p21 and the anti-apoptotic protein, survivin. At high concentrations, however, OME induced a massive apoptosis demonstrated by a dramatic increase in the sub-G1 population. We have demonstrated that OME exerts its apoptotic effect by activating the cell death extrinsic pathway is mediated, at least partially, via the activation of TNF- α . We have also shown that OME-induced apoptosis is also mediated by an increase in DNA damage, revealed by an upregulation of γ H2AX, severe depletion of the mutant p53 and survivin proteins from the treated cells.

The process of apoptosis can be induced either by the extrinsic pathway which involves signalling from death receptors at the cell surface or by the intrinsic mitochondria-mediated pathway [24]. Activation of the death receptor-mediated apoptosis requires the interaction of the ligands such as TNF- α and Fas with their transmembrane receptors [25]. The ligand-receptor interaction leads to the activation of the effector caspase 8, which in turn activates the effector caspase 3 directly and/or through mitochondria [26]. The mitochondria-mediated apoptosis pathway is associated with permeabilization of the mitochondria outer membrane, reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ /m), change in expression of the anti-apoptotic Bcl2 family members, such as Bcl2 and Bcl-XL and the pro-apoptotic members such as Bax and Bak leading to the formation of the apoptosome, activation of caspase 9 and consequently activation of caspase 3 [27]. Intrinsic- and extrinsic-pathways activated caspase 3 cleave poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), thus resulting in apoptosis [28]. In the present study, we showed that OME induced TNF- α -mediated extrinsic apoptotic pathway. TNF- α receptor was activated at 24 h and induced downstream signalling such as caspase 8, caspase 3, and PARP cleavage. On the other hand, OME did not induce mitochondria-mediated apoptotic pathway since no change in the BAX/Bcl2 ratio or activation of caspase 9

were detected. We suggest that OME induces apoptosis solely through TNF- α activated signal pathway in MDA-MB-231 cells.

Studies have reported that DNA damage is one of the molecular events associated with cell cycle arrest and apoptosis. Indeed, and many anti-cancer drugs have been shown to induce DNA damage [29,30]. Moreover, cancer cells are reported to be more susceptible than normal cells to DNA damaging agents [31], therefore there is a growing interest in dietary phytochemicals that possess DNA-damaging activity. In the present study we showed that OME elicited DNA damage measured by an increase in a concentration-dependent manner of the marker of DNA damage, γ -H2AX, after treatment with OME for 6 or 24 h. The differential response to the different concentrations of OME (G2/M arrest and/or apoptosis), may be partially mediated by the extent of DNA damage occurred within the genome. Low levels of DNA damage may trigger recruitment of DNA repair complexes, expression of anti-apoptotic and survival proteins leading to arrested cell cycle until the genotoxic lesions are repaired. In this case, survival protein such as survivin gets activated in order to maintain the viability of G2/M arrested cells. On the other hand, when genomes are overwhelmed by DNA damage, cells are eliminated by apoptosis [32,33]. In this study, we have found that high concentrations of OME triggered high level of DNA damage to the genome, causing cell to enter apoptosis. Our data suggest that *Origanum majorana* possess a genotoxic effect on MDA-MB-231 cells. At this stage, the mechanism(s) by which OME induces DNA damage remain(s) unknown, and certainly deserves further studies.

Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), which includes survivin, represents a family of anti-apoptotic proteins that bind and inactivate active caspase 3, 7 [34,35] and caspase 9 [36] and can modulate cell division and cell cycle progression [37].

Interestingly, survivin has no effect on caspase 8 activity. Survivin has been shown to be highly expressed in most cancers, where it functions as inhibitor of apoptosis. In breast cancer, overexpressed survivin was shown to protect cells against apoptosis induced by chemotherapeutic agents, such as etoposide [34]. Based on these reports, survivin protein represents an attractive target of particular importance in cancer therapy at large and in breast cancer therapy in particular. In consideration of the recognized role for survivin as a custodian of cancer cell survival, our results suggest that OME might exert its cytotoxic anti-cancer effects at least partly via the down-regulation of survivin. In our study, we have shown that survivin expression is differentially regulated in a concentration-dependent manner by OME. Lower concentrations of OME induced an upregulation of survivin which causes cells to arrest the cell division and to resist apoptosis by inhibiting the cell death program. In fact, we showed that in these arrested cells, PARP cleavage was not detected despite the activation of caspase 3/7. This effect might be mediated by the inhibition of active 3/7 by the upregulated survivin. Survivin function could also account for the mitotic arrest induced by OME. In fact, Survivin, has also been shown to be required for mitotic arrest of HeLa cells induced by the anticancer drug UCN-01 [38].

The tumor suppressor protein, p53 is found to be mutated in about 50% of human cancers [39]. Mutant p53 is reported to play a key role in cancer cells resistance to certain anticancer drugs and

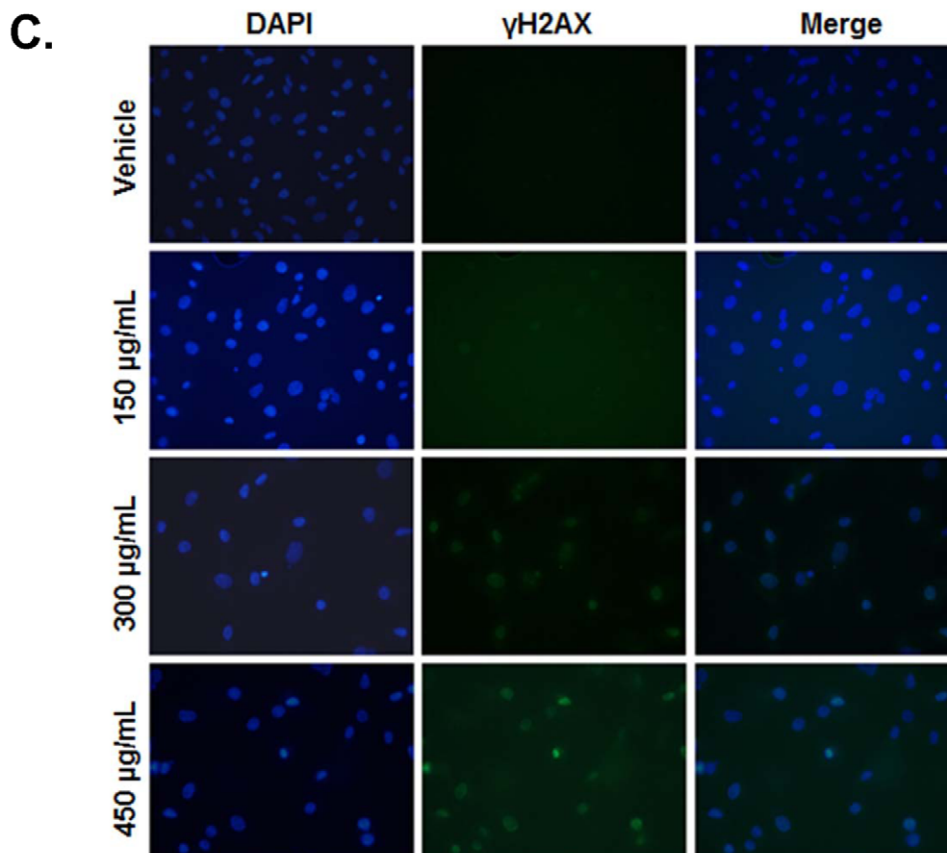
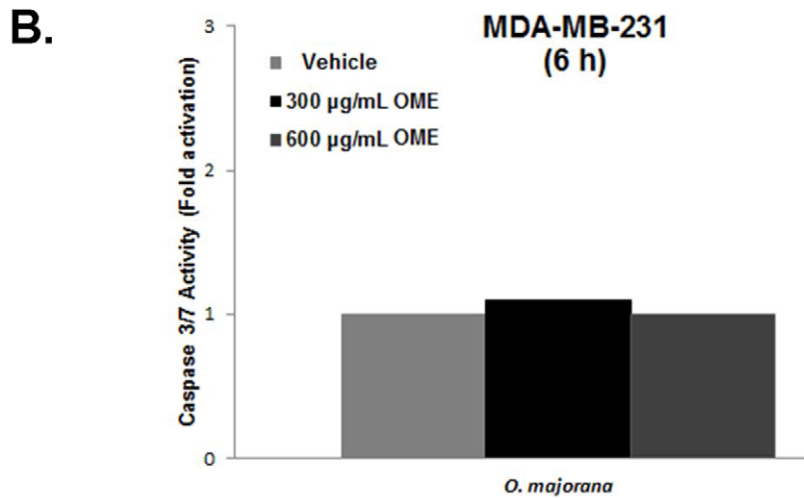
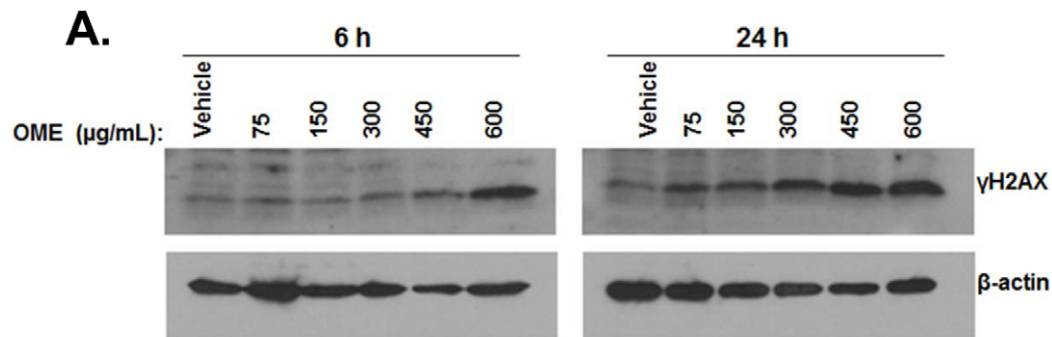


Figure 7. *O. majorana* extract induces a dose-dependent activation of γ H2AX, a marker of DNA double-strands breaks, in MDA-MB 231 cells. (A) Western blot analysis of phosphor-H2AX (ser 139) in MDA-MB231 cells exposed for 6 and 24h with the indicated concentrations of OME or equal volume of vehicle (ethanol) as control. (B) Immunofluorescence staining for γ H2AX in OME-treated MDA-MB 231 cells. Cells were treated with vehicle or 150, 300 and 450 μ g/mL extract for 24 h, fixed, permeabilized, and then processed for immunofluorescence using antibodies against p-H2AX (ser 139) protein. DAPI was used as a nuclear stain.
doi:10.1371/journal.pone.0056649.g007

thus is considered as a potential cancer-specific target for pharmacologic interventions [40,41]. Studies have shown that inhibition of mutant p53 by RNA interference sensitizes cancer cell to cell death by chemotherapeutic agents [42]. Wang et al. 2011, showed that the naturally occurring isothiocyanates (ITCs) phenethyl isothiocyanate (PEITC), derived from watercress plant, and the synthetic ITC, 2,2-di phenethyl isothiocyanate selectively deplete mutant, but not the wild-type p53, and induce apoptosis in many cancer cells, including the MDA-MB-231 breast cancer cells [43]. Here, we showed that OME led to dramatic decrease in the mutant p53 level in MDA-MB-231 cells. As such, mutant p53 depletion may be an important target for chemoprevention and therapy by *O. majorana* for TNBC.

Increase in the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 has been shown to augment G2/M arrest via a p53-independent mechanism in human breast cancer [44]. In

most cases, growth arrest was found to be associated with apoptosis. In this study, we showed that low concentrations of OME treatment led to G2/M arrest without significant increase in cell death after 24h treatment. Histone hyperacetylation has been demonstrated to be directly linked to the upregulation of p21 and this activation can also occur independently of p53 [45]. Moreover, histone hyperacetylation was also shown to be associated with growth suppression and apoptosis. Our data showed that OME induced histone H3 and H4 hyperacetylation in MDA-MB-231 cells, suggesting that the anti-breast cancer effects of OME were at least partly mediated by histone H3 and H4 hyperacetylation by regulating the expression of the genes controlling these two events. The mechanism by which OME induces histone hyperacetylation might involve a histone deacetylase inhibitor (HDI) activity. Interestingly, the plant, *O. majorana*, contains luteolin, a dietary flavonoid with HDI activity [14]. In

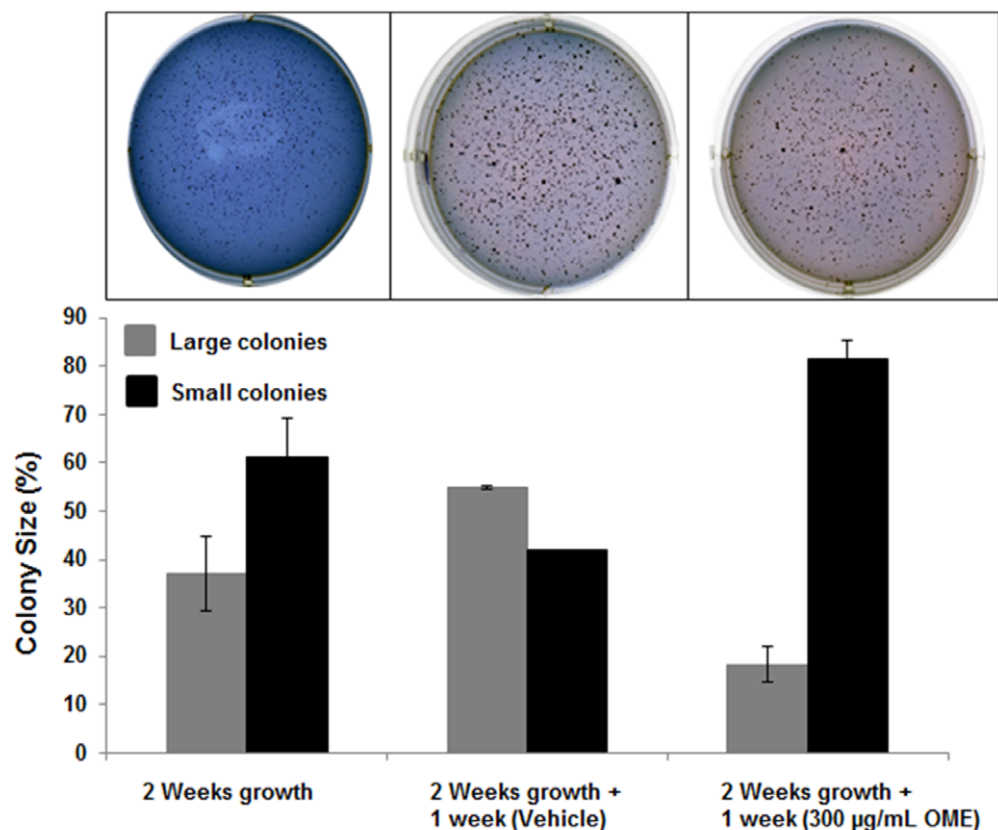


Figure 8. Inhibition of colony growth by *O. majorana* extract. Inhibition of colony growth was assessed by measuring the size of the colonies obtained in vehicle (ethanol)- and OME-treated plates. Data were compared with those obtained for the 2 weeks colonies. Two types of colonies were counted and depending on their diameter were categorized as large ($\geq 200 \mu\text{m}$) and small ($< 200 - \geq 50 \mu\text{m}$).
doi:10.1371/journal.pone.0056649.g008

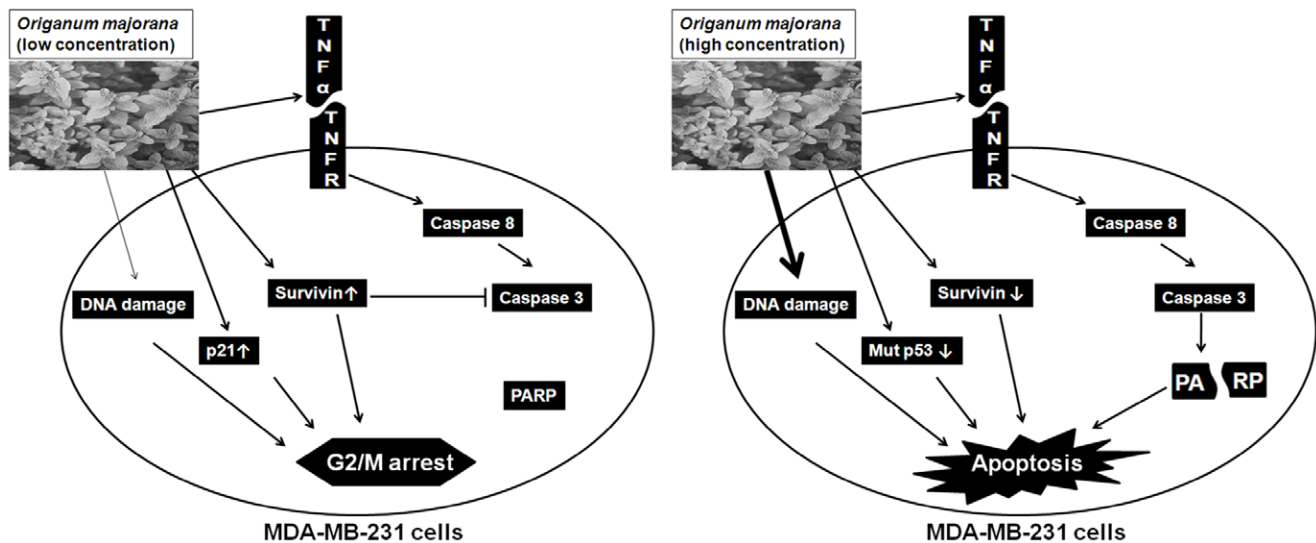


Figure 9. The proposed signal pathways on *O. majorana*-induced cell cycle arrest, at low concentrations, and apoptosis, at high concentrations, in the triple negative mutant p53 human breast cancer MDA-MB-231 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0056649.g009

fact, luteolin was able to decrease the viability of lung, colon, liver and breast cancer cells and induce hyperacetylation of histone H3 and H4 [46]. In light of these data, we conclude that the histone hyperacetylation induced by OME is involved with the HDI activity of luteolin. We are currently undertaking further investigations to better understand the mechanism(s) by which OME induces histone hyperacetylation.

In conclusion, our data are consistent with a model shown in figure 9 which shows the concentration-dependent differential effect of *O. majorana* extract on mutant p53, triple negative MDA-MB-231 cells. At low concentrations, OME induced a mitotic arrest associated with low level of DNA damage (Figure 9, thin arrow), upregulation of the CDK inhibitor p21 and the inhibitor of apoptosis, survivin. We believe that these events along with other “yet to be identified” events contribute to the cell cycle arrest. In addition we also propose that, at these concentrations, survivin is also implicated in the blockade of the TNF-mediated apoptosis pathway, by directly inhibiting the activity of the active caspase 3. On the other hands, high concentrations, OME induce massive apoptosis via the activation of the TNF-α extrinsic pathway which is associated with high level of DNA damage (Figure 9, thick arrow) and almost complete depletion of the mutant p53 and surviving proteins from these cells. Our findings provide the first

instance of a potential role for OME as an anti-breast cancer agent *in vitro* which certainly deserves more attention for further explorations to identify novel compounds for breast cancer.

Acknowledgments

We thank Prof. Joan Massague from Howard Hughes Medical Institute for providing the MDA-MB-231 cells. We also wish to thank Dr. Mohamed Tahar Moussa for his contribution in confirming the identity of the *Origanum majorana* used in this study. We are also grateful to Kholoud Ararat for her precious technical help.

Author Contributions

Performed most of the cellular and biochemical studies and participated in data analysis: YD. Provided the OM plant and performed cellular viability and caspase experiments: AE. Performed some biochemical analysis, provided antibodies against acetylated histones H3 and H4 and critically revised the manuscript: SAQ. Prepared the OME extract used in this study: MK SH. Performed the colony assay experiments, participated in data analysis of cellular studies and critically revised the manuscript: SA. Carried out FACS experiments: GA. Participated in the conception, design, execution, data analysis, coordination of the study and drafted the manuscript: RI. Read and approved the final version of the manuscript: YAD AE SAQ SA MK GA SH RI.

References

1. American Cancer Society. Cancer facts and figures (2012) Available: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>. Accessed 2013, Jan 30.
2. Cragg GM, Newman DJ (2000) Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 2783–2797.
3. Kaczirek K, Schindl M, Weinhausel A, Scheuba C, Passler C, et al. (2004) Cytotoxic activity of camptothecin and paclitaxel in newly established continuous human medullary thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metabol* 89: 2397–2400.
4. Nawab A, Yunus M, Mahdi AA, Gupta S (2011) Evaluation of Anticancer Properties of Medicinal Plants from the Indian Sub-Continent. *Molecular and Cellular Pharmacology* 3: 21–29.
5. Watson WH, Cai J, Jones DP (2000) Diet and apoptosis. *Annual Review of Nutrition* 20: 485–505.
6. Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T (2012) Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry* 3: 156–173.
7. Teiten M-H, Gaascht F, Eifes S, Dicato M, Diederich M (2010) Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr* 5: 61–74.
8. Adams LS, Phung S, Yee N, Sceram NP, Li L, et al. (2010) Blueberry Phytochemicals Inhibit Growth and Metastatic Potential of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells through Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *Cancer Research* 70: 3594–3605.
9. Gu Y-H, Leonard J (2006) *In vitro* effects on proliferation, apoptosis and colony inhibition in ER-dependent and ER independent human breast cancer cells by selected mushroom species. *Oncology Reports* 15: 417–423.
10. Lee HS, Seo EY, Kang NE, Kimb WK (2008) [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 313–319.
11. Vági E, Rapavi E, Hadolin M, Väsárhelyiné Perédi K, Balázs A, et al. (2005) Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 17–21.

12. Al-Harbi NO (2011) Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 5479–5485.
13. Miron TL, Plaza M, Bahrim G, Ibariez E, Herrero M (2011) Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A* 1218: 4918–4927.
14. Tsimogiannis D, Stavrakaki M, Oreopoulou V. (2006) Isolation and characterisation of antioxidant components from *Oregano* (*Origanum heracleoticum*). *International Journal of Food, Science, and Technology* 41: 39–48.
15. Leeja L, Thoppil JE (2007) Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (Sweet marjoram). *J. Environ. Biol.* 28: 145–146.
16. El-Ashmawy IM, El-Nahas AF, Salama OM (2005) Protective effect of volatile oil, alcoholic and aqueous extracts of *Origanum majorana* on lead acetate toxicity in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 97: 238–243.
17. El-Ashmawy IM, Amal S, Salama OM (2007) Acute and long term safety evaluation of *Origanum majorana* essential oil. *Alex. J. Pharm. Sci.* 21: 29–35.
18. El-Ashmawy IM, Saleh A, Salama OM (2007) Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 101: 320–327.
19. Yazdanparast R, Shahriyari L (2008) Comparative effects of *Artemisia dracunculus*, *Satureja hortensis* and *Origanum majorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion. *Vascul. Pharmacol.* 48: 32–37.
20. Lin LT, Liu LT, Chiang LC, Lin CC (2002) In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytotherapy Research* 16: 440–444.
21. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, et al. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106: 348–60.
22. Maurer M, Komina O, Wesierska-Gadek J (2009) Roscovitine differentially affects asynchronously growing and synchronized human MCF-7 breast cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171: 250–256.
23. Choi HJ, Fukui M, Zhu BT (2011) Role of Cyclin B1/Cdc2 Up-Regulation in the Development of Mitotic Prometaphase Arrest in Human Breast Cancer Cells Treated with Nocodazole. *PLoS ONE* 6(8): e24312. doi:10.1371/journal.pone.0024312.
24. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, et al. (1999) Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 457: 217–36.
25. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.*, 254: 439–459.
26. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 1142: 181–90.
27. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. (1999) An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.*, 274: 11549–56.
28. Gupta S. (2003) Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol.*, 22: 15–20.
29. Zhu H, Huang M, Yang F, Chen Y, Miao ZH, et al. (2007) R16, a novel amonafide analogue, induces apoptosis and G2-M arrest via poisoning topoisomerase II. *Mol Cancer Ther.* 6: 484–95.
30. Cai Y, Lu J, Miao Z, Lin L, Ding J (2007) Reactive oxygen species contribute to cell killing and P-glycoprotein downregulation by salivine in multidrug resistant K562/A02 cells. *Cancer Biol Ther.* 611: 1794–9.
31. Rajendran P, Ho E, Williams DE, Dashwood RH (2011) Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenetics*. 3: 4. doi:10.1186/1868-7083-3-4.
32. Norbury CJ, Zhivotovsky B (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23: 2797–808.
33. Ljungman M (2010) The DNA damage response—repair or despair? *Environ Mol Mutagen*, 51: 879–89. Review.
34. Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, et al. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 58: 5315–20.
35. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, et al. (2001) An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry*, 40: 1117–23.
36. Chandle A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR (2004) Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia*, 6: 29–40.
37. Reed JC (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med*, 7: 314–9.
38. Vogel C, Hager C, Bastians H (2007) Mechanisms of Mitotic Cell Death Induced by Chemotherapy-Mediated G₂ Checkpoint Abrogation. *Cancer Res*, 67: 339–345.
39. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature*. 408: 307–10.
40. Selivanova G (2001) Mutant p53: the loaded gun. *Curr Opin Investig Drugs*, 2: 1136–41. Review.
41. Fojo T (2002) p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53. *Drug Resist Updat.* 55: 209–16. Review.
42. Bossi G, Lapi E, Strano S, Rinaldo C, Blandino G, et al. (2006) Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene*, 25: 304–9.
43. Wang X, Di Pasqua AJ, Govind S, McCracken E, Hong C, et al. (2011) Selective depletion of mutant p53 by cancer chemopreventive isothiocyanates and their structure-activity relationships. *J Med Chem.* 54: 809–16.
44. Han J, Kim S, Yang JH, Nam SJ, Lee JE (2012) TPA-induced p21 expression augments G2/M arrest through a p53-independent mechanism in human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 27: 517–22.
45. Sambucetti LC, Fischer DD, Zabloudoff S, Kwon PO, Chamberlin H, et al. (1999) Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem.* 274: 34940–7.
46. Attoub S, Hassan AH, Vanhoecke B, Iratni R, Takahashi T, et al. (2011) Inhibition of cell survival, invasion, tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 651: 18–25.