

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Mustapha Ben-Boulaïd, Batna 2

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



جامعة مصطفى بن بولعيد, باتنة 2

كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES

THÈSE

Présentée par

GHEDADBA Nabil

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT LMD

Filière: SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité

Biotechnologie des Molécules Bioactives et Pathologies Moléculaires

THÈME

**Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de
Marrubium vulgare L et *Marrubium deserti* de Noé
in vitro et *in vivo*.**

DEVANT LE JURY

Président

LAROUI Salah

Pr. Univ. Batna 2

Rapporteur

HAMBABA Leila

Pr. Univ. Batna 2

Examineurs

BAGHIANI Abderrahmane

Pr. UFA Sétif 1

ZELLAGUI Ammar

Pr. Univ. Oum-El Baouaghi

YAHIA Mouloud

Pr. Univ. Batna 2

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, je remercie ALLAH, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour réaliser cette thèse.

*Je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Madame **Leila Hambaba**, Professeur à l'Université de Batna 2 de m'avoir encadré, dirigé et soutenu au cours de la réalisation de cette thèse. Elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses précieux conseils et ses encouragements.*

*Je remercie vivement : Monsieur **LAROUI Salah**, Professeur à l'Université de Batna 2, d'avoir bien voulu accepter de présider ce jury.*

*Monsieur **BAGHIANI Abderrahmane**, Professeur à l'Université de Sétif 1, Monsieur **ZELLAGUI Ammar**, Professeur à l'Université d'Oum-El Baouaghi, et Professeur **YAHIA Mouloud** de l'Université de Batna 2 pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.*

*Je tiens également à remercier l'équipe de Mme **HAMBABA** du laboratoire de recherche de chimie des matériaux et des vivants : activité et réactivité et en particulier Melle **BOUHARRA Souhila**.*

*Mon respect et ma reconnaissance vont également aux docteurs **Aberkane Mohamed Chérif**, **Abddedaim**, **Ayachi Ammar** Maîtres de conférence à l'université de Batna 1 et **Dr Jaaba**, qui m'ont accueilli au sein de leurs laboratoire : laboratoire de Phytochimie ; laboratoire des Sciences des aliments, laboratoire de Bactériologie et laboratoire d'anatomo-pathologie, **CHU de Batna***

*Ma sympathie va à toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail, particulièrement Monsieur : **Hachemi Massoud**, M^{elle} **Boudiaf Kawthar**, Mr **Bousselsela Haoues**, M^{elle} **Bouzidi Soumia** et Mme **Aouachria Sana**.*

Dédicaces

- ✓ *A mes parents en témoignage de mon affection,*

- ✓ *A mes frères et sœurs,*

- ✓ *A tous mes professeurs qui m'ont enseigné leur*

savoir,

- ✓ *A mon promoteur,*

- ✓ *A toute ma famille,*

- ✓ *A tous mes amis.*

مساهمة لدراسة النشاط البيولوجي لنوعين من النباتات الطبية *Marrubium vulgare* و

Marrubium deserti de Noé في التجارب المخبرية والحية

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم بعض الأنشطة البيولوجية لنبتي المريوة (*Marrubium vulgare*) ونبته صحراوية "الجمدة" (*Marrubium deserti*): النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط الموقف للنزيف، اختبار السمية الحادة، النشاط المضاد للالتهاب، الفعالية المسكنة للألام، النشاط المضاد للداء السكري المحدث تجريبياً.

تم في البداية إجراء عملية استخلاص المركبات الفعالة من القمم الزهرية و أوراق النبتتين، خاصة تلك الناتجة عن الأبيض الثانوي (الفينولات، الفلافونويدات، الفلافونولات والدباغ) باستعمال المذيبات العضوية، ثم إجراء تقدير كمي و نوعي لهذه المستخلصات. أظهرت التحاليل النوعية الكيميائية لهذه المستخلصات بواسطة كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة (CCM) احتمال تواجد عدة مركبات منها حمض الغاليك، الكارستين، الريبيتين (sophorine) ومركبات أخرى. كما أوضح الفحص الكيميائي أن المستخلص الميثانولي لكلا النبتتين جد غني بالفلافونويدات، التاربانويدات، الألكلويدات والفينولات السكرية.

التقدير الكمي للفينولات الكلية بواسطة طريقة (Folin-Ciocalteu) و الفلافونويدات بواسطة طريقة (AlCl₃) أعطى قيماً أكثر ارتفاعاً مع المستخلصات القطبية خاصة المستخلص الميثانولي حيث قدرت النتائج بـ: **195 ± 0,36 mg EAG/g d'extrait**, **33,10 ± 0,60 mg EQ/g d'extrait** على التوالي مع نبتة *Marrubium vulgare* يليها المستخلص الميثانولي لنبته *Marrubium deserti* بـ **28,48 ± 0,40 mg مكافئ الكارستين / مغ مستخلص بالنسبة للفلافونويدات**. النشاط المضاد للبكتيريا بواسطة طريقة الانتشار على وسط صلب بجرعة **500 مغ / مل** بين فعالية المستخلصات المائية، الميثانولية والكلوروميثانية ضد سلالة الستافيلوكوك المقاومة للميثيسيلين مع ظهور منطقة تثبيط قدرت بـ 16,34 مم والإشيريشياكولي بمنطقة تثبيط قدرت بـ 14,73 مم. بينما أظهرت بقية السلالات المدروسة بما فيها الخمائر والفطريات مفعول مقاوم لمستخلصات النبتتين. تثبيط الأكسدة المزوجة لحمض لينولييك و β كاروتين بواسطة طريقة تفسخ β كاروتين مكن من تسليط الضوء على وجود ثلاثة مراحل: مرحلة البداية، مرحلة التقدم و مرحلة النهاية تميز خلالها المستخلص الميثانولي بنشاط مضاد للأكسدة جد عالي. من جهة أخرى أكد التقدير الكمي للنشاطية الازاحية تجاه جذر DPPH أن المستخلص الأكثر نشاطاً هو مستخلص الميثانول (IC₅₀ = 12,40 µg/ml) مع نبتة *M. vulgare* و (IC₅₀ = 15,43 µg/ml) مع نبتة *M. deserti*. التحليل بواسطة طريقة FRAP أكد هذه النتائج حيث أن المستخلص الميثانولي للنبتتين يمتاز بقدرة عالية على إرجاع شوارد الحديد الثلاثي إلى شوارد الحديدوز الثنائي حيث أنه كلما زادت جرعة المستخلص زادت قدرة الإرجاع. قيم IC₅₀ المحصل عليها كانت: **50,01 ± 0,24 µg EAA/g de l'extrait**; **80,01 ± 1,00 µg EAA/g de l'extrait** مع نبتتي المريوة و الجعيدة على التوالي. بينت كذلك نتائج الدراسة بأن المستخلص المائي لأوراق النبتتين كانت له فعالية جد عالية في تخثر البلازما وهو نشاط يتوافق مع إيقاف النزيف (hémostatique)، حيث بينت التحاليل الكيميائية ثراء هذه المستخلصات المائية بالتانينات المكثفة التي يعتقد بأنها تلعب دور مهم في هذا النشاط.

اختبار السمية الحادة لمدة 14 يوم بحقن المستخلصات الميثانولية عن طريق الفم في أجسام الجرذان بجرعة (2 و 5 غ/كغ وزن الجسم) لم تؤد إلى موت أي حيوان من حيوانات التجارب وعليه فإن DL₅₀ تعتبر أكبر من 5 غ/كغ من وزن الجسم. هذه النتائج تم تأكيدها عن طريق إجراء تحاليل دموية، بيوكيميائية وتحاليل البول. تقييم النشاط المضاد للالتهاب للمستخلصين الميثانولين بجرعة 200 مغ/كغ من وزن الجسم بين أن كلا المستخلصين له قدرة عالية في تثبيط الإلتهاب الناجم عن الكاراجينان مقارنة مع المجموعة الشاهدة التي لم تعالج. هذا المفعول كان قريب جداً من تأثير دواء Diclofénac. بالمثل نتائج النشاط المسكن للألام (analgésique) بين أن المستخلصين لهما نشاط مسكن جانبي الذي يعود ربما إلى تخفيض تركيز المادة P.

بينت نتائج النشاط المضاد للداء السكري التجريبي المستحدث في الجرذان عن طريق حقن الستربتوزونوسين بجرعة 50 مغ/كغ أن المجموعات التي تمت معالجتها بمستخلص النبتتين (600 مغ/كغ) أدى إلى انخفاض محسوس في مستوى السكر وبصورة ملحوظة. وقد لوحظ أنه في اليوم الثالث من المعالجة كان تأثير المستخلص ضعيفاً، ولكن في اليوم الخامس ازداد تأثير المستخلص واستمر التأثير في الازدياد إلى غاية اليوم الخامس عشر وعند المقارنة بين تأثير دواء الغليبينوكلاميد (5 مغ/كغ) وتأثير المستخلص (600 مغ/كغ) وجدنا أن النتائج كانت تقريباً متماثلة. هذا يبين أن المستخلصات لها مفعول مخفض لسكر الدم، إلا أنه بحاجة إلى دراسة أعمق خاصة المادة الفعالة في النبات المؤدية إلى هذا التأثير. أما في ما يخص اختبار تحمل الجلوكوز الفموي فقد حسنت المستخلصات الميثانولية القدرة على تحمل السكر بشكل واضح، وكان تأثيرها قريباً جداً من تأثير الغليبينوكلاميد.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium deserti*, *Marrubium vulgare*, المركبات الفعالة، الأنشطة البيولوجية.

Contribution à l'étude de l'activité biologique de deux espèces de *Marrubium vulgare* L et *Marrubium deserti* de Noé *in vitro* et *in vivo*.

Résumé

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les activités biologiques des deux plantes d'Elmarioua (*Marrubium vulgare*) et une plante saharienne djaada (*Marrubium deserti*) *in vitro* et *in vivo* : activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité hémostatique, test de toxicité aigüe, activité anti-inflammatoire, activité analgésique et l'activité antidiabétique. Tout d'abord on a effectué l'extraction des principes actifs à partir des sommités fleuries et les feuilles des deux plantes : (les polyphénols, les flavonoïdes, les flavonols, les tanins) par l'utilisation des solvants organiques, puis évaluer quantitativement et qualitativement les extraits. L'analyse qualitative des extraits par la chromatographie sur couche mince (CCM) a révélé probablement la présence de l'acide gallique, la quercétine et la rutine (sophorine). L'analyse chimique indique aussi que les extraits méthanoliques des deux plantes sont très riches en flavonoïdes, terpenoïdes, alkaloïdes et les phénols sucrés.

La quantification des phénols totaux par la méthode (Folin-Ciocalteu) et des flavonoïdes par la méthode (AlCl_3) a donné des valeurs élevées avec les extraits polaires (EMeOH) où la plus grande valeur est estimée par: (**$195 \pm 0,36$ mg EAG/g d'extrait, $33,10 \pm 0,60$ mg EQ/g d'extrait**) respectivement avec la plante *M. vulgare*, suivi par l'EMeOH de *M. deserti* avec des valeurs de l'ordre de **$184 \pm 0,78$ mg EAG/g d'extrait** pour les polyphénols et **$28,48 \pm 0,40$ mg EQ/g d'extrait** pour les flavonoïdes. L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé a montré que les extraits aqueux, méthanoliques et dichlorométhaniques sont actifs pour l'ensemble des souches testées et ont révélés à une dose de 500 mg/ml une activité antibactérienne significative contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline avec une zone d'inhibition égale à 16,34 mm et *Escherichia coli* (Gram -) avec une zone d'inhibition = 14, 73 mm. Alors que, les autres souches étudiées dont les levures et les champignons montrent un effet résistant vis-à-vis les extraits des deux plantes. L'inhibition double de l'oxydation de l'acide linoléique et β - carotène a permis de focaliser la lumière sur l'existence de trois phases : « phase d'initiation, phase de propagation et la phase de terminaison » dont lequel l'EMeOH a été caractérisé par une activité antioxydante remarquable. D'autre part, l'évaluation quantitative de l'activité antiradicalaire vis-à-vis DPPH a montré que l'extrait le plus actif est l'EMeOH ($\text{IC}_{50} = 12,40$ $\mu\text{g/ml}$) pour la plante *M. vulgare* et ($\text{IC}_{50} = 15,43$ $\mu\text{g/ml}$) pour le *M. deserti*. L'analyse FRAP indique que l'EMeOH ayant une capacité importante dans la réduction de l'ion ferrique « Fe^{+3} » d'une manière dose dépendante et enregistre des valeurs IC_{50} magistrale : $50,01 \pm 0,24$ $\mu\text{g EAA/g}$ de l'extrait ; $80,01 \pm 1,00$ $\mu\text{g EAA/g}$ de l'extrait pour les deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* respectivement en. L'évaluation de l'activité hémostatique a montré que les extraits aqueux des deux plantes les plus riches en tanins sont très efficaces dans la coagulation du plasma.

L'étude de la toxicité aigüe sur des rats « *Wister albinos* » par gavage de l'EMeOH à la dose de 2 à 5 g/kg montre que les deux plantes n'ont pas un effet toxique, aucun signe de mortalité apparaitre pendant les 14 jours de traitement, de même les analyses biochimiques, hématologiques sont normale et aucune différence obtenue en comparaison avec le groupe témoin. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a montré que les extraits méthanoliques (200 mg/kg) des deux plantes ont une capacité très élevées dans l'inhibition de l'inflammation causée par la carraghénine et proche à celui du Diclofénac par rapport le groupe témoin non traité. L'estimation de l'activité analgésique contre la douleur induit par l'acide acétique montre que l'EMeOH des deux plantes a un effet antalgique périphérique par la diminution de la substance P.

L'évaluation de l'activité antidiabétique contre le diabète induit par la stréptozotocine (50 mg /kg) montre que l'EMeOH à une dose de 600 mg/kg diminue le taux de la glycémie, cette diminution est en fonction du temps après le traitement, dans les 3 premiers jours été faible, mais, après le cinquième jour cette diminution est augmente et cet effet ce continue jusqu'à les 15 ème jours du traitement, les analyses montrent que cet effet est proche a celui de glibenclamide (5mg/kg) ayant utilisé dans le test comme un contrôle positif. En ce qui concerne le test de tolérance au glucose *per os*, la dose de 600 mg/kg de l'EMeOH améliorée la capacité des rats pour tolérer le sucre et leur effet est très proche à celui de glibenclamide. Les résultats montrent que l'extrait alcoolique du marrube a un effet hypoglycémiant, mais, il est besoin à des études plus approfondie surtout la molécule bioactive dans la plante qui conduit à cet effet.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, *Marrubium deserti*, molécules bioactives, activités biologiques.

Contribution to the study of the biological activity of two species: *Marrubium vulgare* L and *Marrubium deserti* de Noé *in vitro* and *in vivo*.

Abstract

The objective of this study is to evaluate the biological activities of plants Marrubio (*Marrubium vulgare*) and a plant Saharan Djaada (*Marrubium deserti*) *in vitro* and *in vivo*: antioxidant activity, antimicrobial activity, hemostatic activity, acute toxicity, anti-inflammatory, analgesic and anti-diabetic activity. First we performed the extraction of active ingredients from the flowering tops and leaves of two plants: (polyphenols, flavonoïds, flavonols, tannins) by the use of organic solvents, then to estimate quantitatively and qualitatively extracts. Qualitative analysis of extracts by thin layer chromatography (TLC) was probably revealed the presence of gallic acid, quercetin and rutin (sophorin). Chemical analysis also indicates the richness of methanol extracts of plants by flavonoïds, terpenoïds, alkaloïds and sugary phenols. Quantification of total phenols by the method (Folin-Ciocalteu reagent) and flavonoïds by the method (AlCl_3) gave high values with the polar extracts (EMeOH) in which the greatest value estimated by: (195 ± 0.36 mg GAE / g extract, 33.10 ± 0.60 mg QE / g of extract) respectively with the plant *M. vulgare*, followed by EMeOH of *M. deserti* with the values estimated by 184 ± 0.78 mg GAE / g extract to the polyphenols and 28.48 ± 0.40 mg QE / g of extract for flavonoïds. The evaluation of the antimicrobial activity by the method of agar diffusion has shown that the aqueous, methanolic and dichloromethanic extracts are active for all strains tested and revealed at a dose of 500 mg / ml a significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin with a zone of inhibition equal to 16.34 mm and *Escherichia coli* (Gram -) with a zone of inhibition = 14.73 mm. While the other strains examined including yeasts and fungi show a resistant effect towards extracts from two plants. The dual inhibition of oxidation of linoleic acid and β - carotene allowed focusing light on the existence of three phases: "initiation phase, propagation phase and the terminating phase" with which the EMeOH was characterized by a remarkable antioxidant activity. Moreover, the quantitative evaluation of the anti-radical activity towards DPPH showed that the MeOH extract is the most active ($\text{IC}_{50} = 12.40$ g / ml) for the plant *M. vulgare* and ($\text{IC}_{50} = 15.43$ mg / ml) for *M. deserti*. The FRAP analysis indicates that EMeOH with significant capacity reduction of ferric ion " Fe^{+3} " in a dose dependant manner with IC_{50} values: 50.01 ± 0.24 mg EAA / g of extract; 80.01 ± 1.00 mg EAA / g of extract for both plants *M. vulgare* and *M. deserti* respectively. The evaluation of haemostatic activity showed that aqueous extracts of the two plants most rich in tannins are very effective in clotting plasma. The study of acute toxicity on rats Wister albino by gavage of EMeOH at a dose of 2 to 5 g / kg shows that the two plants do not have a toxic effect, any sign of mortality appear during 14 days of treatment, biochemical and hematological analyzes are normal and any difference obtained by comparison with the control group. The evaluation of the anti-inflammatory activity showed that the methanol extracts (200 mg / kg) of the two plants have a very high ability in inhibiting inflammation caused by carrageenan very close to that of Diclofenac. The estimation of the analgesia activity against the pain induced by acetic acid show that EMeOH of the two plants has an analgesic effect by the peripheral rating decrease of P substance. The evaluation of the antidiabetic activity against diabetes induced by streptozotocin (50 mg / kg) shows that EMeOH at a dose of 600 mg / kg decreases the rate of blood glucose levels, this decrease is a function of time after the treatment in the first 3 days was low, but after the fifth day the decline is increasing and that this effect continues until the 15th day of treatment, the analyzes show that this effect is similar to that of Glibanclamid (5mg / kg) having used in the test as a positive control. Regarding the tolerance test of glucose, *per os* dose of 600 mg / kg of the EMeOH improved the ability of rats to tolerate sugar and their effect is very close to that of Glibanclamid. The results show that the alcoholic extract of horehound has a hypoglycemic effect, but it is needed to further study mainly the bioactive molecule in the plant which leads to this purpose.

Keywords: *Marrubium vulgare* L, *Marrubium deserti*, bioactive molecules, biological activities.



PUBLICATIONS

Publications & Communications

Articles

Notre travail a fait l'objet de trois (3) publications :

1- N. Ghedadba, L. Hambaba, A. Ayachi, M. C. Aberkane, H. Bousselsela, S. M. Oueld-Mokhtar, Polyphenols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé ex Coss, *Phytothérapie*, (2015), 13: 118-129.

2- Ghedadba Nabil and Hambaba Leila, Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract from *Marrubium deserti* leaves and evaluation of their acute toxicity, *Der Pharmacia Lettre*, 2016, 8 (4): 33-40 (<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)

3- Nabil Ghedadba, Leila Hambaba, Houas Bousselsela, Massoud Hachemi, Asma Drid, Asma Abd-essmad, Sidi Mohammed Oueld-Mokhtar, (2016), Evaluation of *In Vitro* Antioxidant and *In Vivo* Anti-inflammatory Potential of White Horehound (*Marrubium vulgare* L) Leaves, *International Journal of Pharmaceutical Sciences research and Review*, 41(1), pp 252-259..

Communications

Nabil Ghedadba, Nassima Fercha, Leila Hambaba, Ammar Ayachi & Aberkane M C. *Congrès International de « Biologie et Développement », Nouakchott, 2013*

Nabil Ghedadba, Haoues Bousselsela, Souhila Benbia, Leila Hambaba and Yahia Mouloud, *2nd African Congress On Biology and Health (ACBH 2012):Setif, Algeria*

Samira Abdessemed , Nabil Ghedadba , Leila Hambaba , Sidi Mohamed Ould Mokhtar , Nassima Fercha , Houas Bousselsela. Assessment of hemostatic activity of the aqueous extract of leaves of *Marrubium vulgare* L, a mediterranean Lamiaceae Algeria, *11th International Conference on Healthcare and Biological Research (ICHBR), United Arab Emirates*, February 21-22, 2016

Liste des Abréviations

- AA :** Activité antiradicalaire.
- AAPH :** 2,2'-azobis-2-méthylpropionamide
- AAR :** Activité antioxydante relative.
- ABTS :** 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- ACTH:** Adrénocorticotrophine
- AGPI:** Acides gras polyinsaturés
- AIS:** Anti-inflammatoires stéroïdiens
- AINS :** Anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- AMPK:** AMP-activated protein kinase
- ANOVA :** Analyse de variance.
- APR :** Pouvoir antiradicalaire
- AR:** Acide arachidonique
- ALT:** Alanine aminotransférase
- AST :** Aspartate aminotransférase
- ATCC :** Collection du type Américain de culture.
- BAW:** n-Butanol/Acide acétique/eau.
- BHT :** Hydroxytoluène Butylé (antioxydant synthétique).
- CBP:** Cyclic AMP response element binding protein
- CCl₄ :** carbone tétrachlorure
- CCM :** Chromatographie sur couche mince
- CDKs:** Cyclin-Dependent Kinases
- CG/SM :** Chromatographie Gazeuse couplé à la Spectroscopie de Masse.
- CI₅₀ :** Concentration inhibitrice à 50%.
- CINC-1 :** *cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1*
- CMI :** Concentration Minimale Inhibitrice.
- CMW :** Chloroforme/Méthanol/Eau

COX : Cyclo-oxygénase

CRP: Protéine C Réactive

DC : Diabétique contrôle

DDP-4: Dipeptidylpeptidase-4

Dic : Diclofénac

DID: Diabète insulino-dépendant

DL₅₀ : Dose létale à 50%

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DNID: Diabète non insulino-dépendant

DNPH : Dinitrophénylhydrazine

DNT : Diabétique non traité

DPPH : 1-1' Diphényl-2-Picrylhydrazyl.

EAQ : Extrait aqueux.

EDTA: Ethylène diamine tétraacétique

EEp : Extrait d'éther de pétrole.

EDcM : Extrait dichlorométhanique.

EMeOH (Mv): Extrait méthanolique de *M. vulgare*.

EMeOH (Md): Extrait méthanolique de *M. deserti*.

EBuOH : Extrait butanolique

EP : eau physiologique

EPI: extrinseque pathway inhibitor

ERO : Espèces Réactives Oxygénées.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant power

FCR : Réactif de Folin Ciocalteu.

GADD : Growth arrest and DNA damage.

GLDH : Glutamate déshydrogénase

GLP-1 : Glucagon like-1 peptide

GR : glutathion réductase

GRE: Glucocorticoid-Response Elements

GR α : récepteurs des glucocorticoïdes

GSH-Px : glutathion peroxydase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxide

HDAC: histone déacétylase

HDL : High Density Lipoprotein.

HeLa : *Henrietta Lacks* (cellules cancéreuses du col utérin humain).

HPLC-RP : High Performance Liquid Chromatography-Reverse phase.

ICAM: Inter-Cellular Adhesion Molecule

ID₅₀ : Inhibition Dose 50%

INT : enflammé non traité

LDL : Low Density Lipoprotein.

LPS : Lipopolysaccharides.

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*

mg EAA/g d'extrait : milligramme d'équivalent acide ascorbique par g d'extrait.

mg EAG/g d'extrait : milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait.

mg EQ/g d'extrait : milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait.

mg EC/g d'extrait : milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait.

MDA: Malondialdehyde

MPO : Myelopéroxydase

MRSA : Methicillin Resistant *S. aureus*

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduite

NADPH : Nicotinamide Adénosine Diphosphate (sous sa forme réduite).

NF- κ B : Nuclear transcription Factor κ B.

NO : monoxyde d'azote

PAF : Platelet activating factor.

PC : poids corporel

PCAF: P300/CBP associated factor

PG (PGE₂ α , PGF₂ α) : Prostaglandine

FIG : P₅₃-Inducible Gene 3

PMNs : Polymorphonucléaires neutrophiles

PPARs : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes

Ppm : Partie par million

PTA: plasma thromboplastin antecedent

RL : Radicaux libres.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

rpm (tpm): Rotation (tours) par minute

SD : Standard déviation.

SEM: Standard error of mean

SOD: superoxyde dismutase

SRC-1: steroid receptor coactivator 1

STZ : Stréptozotocine

TGO: Glutamate Oxaloacétate Transaminase.

TGP: Glutamate Pyruvate Transaminase.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α .

Trolox : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Vs: Vitesse de sédimentation

VWF: Facteur Von Wille brand

TABLE DES MATIERES

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction Générale	01
------------------------------------	-----------

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. Activités biologiques

I.1. Activité antimicrobienne des extraits des plantes.....	03
I.1.1. Mode d'action des composés sur les bactéries	03
I.1.2. Souches microbiennes étudiées	04
I.2. Activité hémostatique	07
I.2.1. Rappel sur l'hémostase	07
I.2.2. Les hémostatiques.....	09
I.3. Activité antioxydante.....	10
I.3.1. Radicaux libres (RLs).....	10
I.3.2. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques	10
I.3.3. Systèmes de défenses antioxydants	14
I.4. Activité anti-inflammatoire	18
I.4.1. Définition	18
I.4.2. Mécanismes de l'inflammation	19
I.4.3. Anti-inflammatoires.....	19
I.4.4. Marqueurs biologiques de l'inflammation	24
I.4.5. Méthodes d'étude de l'activité anti-inflammatoire	25
I.5. Activité analgésique	25
I.5.1. Notion de physiologie : la douleur	25
I.5.2. Activation des nocicepteurs.....	26
I.5.3. Les antalgiques	26
I.6. Le diabète sucré : un syndrome métabolique	27
I.6.1. Définition.....	27
I.6.2. Différents types de diabète	27
I.6.3. Traitement du diabète sucré.....	29

II. Biologie des plantes sélectionnées

II.1. Description botanique de <i>Marrubium vulgare</i>	30
II.1.1. Taxonomie.....	30
II.1.2. Morphologie de <i>Marrubium vulgare</i>	30
II.1.3. Localisation géographique	31
II.1.4. Utilisation traditionnelle de <i>Marrubium vulgare</i>	32
II.1.5. Composition biochimique de <i>Marrubium vulgare</i>	33
II.1.6. Propriétés pharmacobiologiques de <i>Marrubium vulgare</i>	35
II.2. Etude chimique et biologique d'autres espèces du genre <i>Marrubium</i> : exemple de <i>Marrubium deserti</i> de Noé	36
II.2.1. Localisation géographique	36
II.2.2. Description morphologique de <i>Marrubium deserti</i> de Noé	37
II.2.3. Analyse phytochimique de <i>Marrubium deserti</i>	38
II.2.4. Utilisation traditionnelle de <i>Marrubium deserti</i>	38

III. Les molécules bioactives des plantes

III.1. Les polyphénols	40
III.1.1. Les flavonoïdes	41
III.1.2. Les tanins	45
III.2. Diterpènes labdanes	48
III.3. Les huiles essentielles	49

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel.....	50
1. 1. Matériel biologique.....	50
1. 1. 1. Matériel végétal	50
1. 1. 2. Les animaux	51
1. 1. 3. Souches bactériennes	51
1. 1. 4. Souches fongiques	51
1. 2. Solvants et réactifs	51
2. Méthodes.....	52
2. 1. Préparation des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Marrubium deserti</i>	52
2. 1. 1. Préparation des extraits organiques	52
2. 1. 2. Préparation de l'extrait aqueux	54

2. 2. Analyse des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	54
2. 2. 1. Analyse qualitative des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	54
2. 2. 2. Analyse quantitative des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	58
2. 3. Evaluation des activités biologiques des extraits <i>in vitro</i>	60
2. 3. 1. Activité antimicrobienne	60
2. 3. 2. Tests de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	62
2. 3. 3. Test de l'activité hémostatique	63
2. 4. Evaluation des activités biologiques des extraits <i>in vivo</i>	64
2. 4. 1. Etude de la toxicité aigüe	64
2. 4. 2. Tests de l'activité anti-inflammatoire	65
2. 4. 3. Étude de l'activité analgésique (<i>Writhing test</i>)	70
2. 4. 4. Test de l'activité antidiabétique	71
2. 5. Analyse statistique	73

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Rendement des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> de Noé	74
2. Analyse des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	77
2. 1. Analyse qualitative des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	77
2. 1. 1. Criblage phytochimique des extraits (Tests préliminaires)	77
2. 1. 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	81
2. 2. Analyse quantitative des extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	90
2. 2. 1. Dosage des polyphénols totaux	90
2. 2. 2. Dosage des flavonoïdes	94
2. 2. 3. Dosage des tanins condensés	97
2. 2. 4. Dosage des flavonols	99
3. Evaluation des activités biologiques des extraits <i>in vitro</i>	100
3. 1. Activité antimicrobienne	100
3. 1. 1. Test de l'activité antibactérienne	100
3. 1. 2. Activité antifongique	108
3. 2. Tests de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	111
3. 2. 1. Test de blanchiment du β -Carotène	111
3. 2. 2. Effet scavenger du radical DPPH	117
3. 2. 3. Méthode FRAP <i>in vitro</i> (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	126
3. 3. Test de l'activité hémostatique <i>in vitro</i>	130

4. Evaluation des activités biologiques des extraits <i>in vivo</i>	133
4. 1. Etude de la toxicité aigüe	133
4. 2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	138
4. 2. 1. Méthode de l'œdème plantaire induit par la carraghénine.....	138
4. 2. 2. Méthode de l'œdème de l'oreille induit par le xylène	145
4. 2. 3. Evaluation de la pleurésie chez le rat (<i>test anti-pleurétique</i>).....	149
4. 3. Étude de l'activité analgésique (<i>Writhing test</i>)	152
4. 4. Étude de l'activité antidiabétique.....	154
4. 4. 1. Effet des extraits sur la tolérance au glucose	154
4. 4. 2. Effet des extraits sur la glycémie	155
4. 4. 3. Effet des extraits sur le poids corporel.....	157
4. 4. 4. Effet des extraits sur les différents paramètres biochimiques.....	159

Conclusion et Perspectives..... 162

Références Bibliographiques

Liste des Tableaux

N° du Tableau	Titre	Page
1	Identification de quelques bactéries de l'étude	06
2	Les principaux agents antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète de type 2	29
3	Données taxonomiques	30
4	Effets biologiques des biomolécules de <i>Marrubium vulgare</i>	35
5	Principales classes des polyphénols	40
6	Couleurs, aspects et rendements des extraits des feuilles sèches et des sommités fleuries de <i>Marrubium vulgare</i> par différents solvants de polarité croissante	74
7	Couleurs, aspects et rendements des extraits des feuilles sèches et des sommités fleuries de <i>Marrubium deserti</i> par différents solvants de polarité croissante	74
8	Les molécules bioactives révélées dans les extraits de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> par les tests de criblage phytochimique	78
9	Les principaux métabolites secondaires détectés dans les extraits des deux plantes <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	79
10	Caractérisation d'après une comparaison de tous les métabolites possibles de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	80
11	Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits apolaires des feuilles et des sommités fleuries de <i>M. vulgare</i>	82
12	Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits apolaires des feuilles et des sommités fleuries de <i>M. deserti</i>	83
13	Rapports frontaux des standards dans le système CMW (60:35:5 ; v/v/v)	85
14	Résultats de la CCM des extraits polaires des feuilles de <i>M. vulgare</i> dans le système chloroforme/méthanol/eau (60:35:5; v/v/v)	85

15	Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de <i>M. vulgare</i>	91
16	Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de <i>M. deserti</i>	91
17	Teneur des flavonoïdes dans les extraits des feuilles et les sommités fleuries de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	95
18	Contenu total de tanins condensés dans les extraits de feuilles de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	98
19	Contenu total des flavonols dans les extraits de feuilles de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	99
20	Résultats de l'activité antibactérienne de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i>	101
21	Résultats de l'activité antibactérienne de l'EMeOH de <i>M. deserti</i>	101
22	Résultats de l'activité antibactérienne de l'EAQ de <i>M. vulgare</i>	102
23	Résultats de l'activité antibactérienne de l'EDCM de <i>M. deserti</i>	102
24	La sensibilité des souches bactériennes envers les extraits de <i>M. vulgare</i>	104
25	La sensibilité des souches bactériennes envers les extraits de <i>M. deserti</i>	104
26	Diamètres des zones d'inhibitions obtenus par l'effet des extraits méthanoliques de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur les souches fongiques	109
27	Valeurs d'IC ₅₀ obtenues pour les différents extraits et standards	120
28	Temps de coagulation obtenus après le traitement du plasma avec l'extrait aqueux de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	131
29	Effet des différentes doses de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur les paramètres hématologiques des rats	133
30	Effet des différentes doses de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur les paramètres biochimiques des rats	134

31	Résultats des paramètres biochimiques obtenus par la chimie des urines pour l'EMeOH de <i>M. vulgare</i>	136
31	Résultats des paramètres biochimiques obtenus par la chimie des urines pour l'EMeOH de <i>M. deserti</i>	137
33	Effet des extraits et des anti-inflammatoires de référence utilisés dans la présente étude sur l'œdème plantaire induit par la carraghénine chez les rats	139
34	Résultats du dosage de la protéine C réactive	143
35	Effet des extraits et de l'AINS (diclofénac) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les rats.	146
36	Effet analgésique de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur les contractions abdominales induites chez les rats par l'injection de l'acide acétique	152
37	Effet de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur la glycémie	155
38	Effet de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur le poids corporel	158
39	Effet de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i> sur les paramètres biochimiques	159

Liste des Figures

Figure 1. Schéma représentant les sites d'actions des antibiotiques chez les Bactéries.....	04
Figure 2. Principales sources cellulaires de radicaux libres	11
Figure 3. Etapes de la peroxydation lipidique.....	13
Figure 4. Exemples de transformations d'origine oxydative subies par l'ARN.....	14
Figure 5. Régulation de la production des espèces oxygénées activées (ERO) par des systèmes antioxydants de défenses primaire et secondaire.....	15
Figure 6. Rôle des glutathions peroxydases et réductases.....	16
Figure 7. Structure de quelques antioxydants d'origine alimentaire : α -tocophérol, acide ascorbique, β -carotène, acide caféique et quercétine.....	18
Figure 8. Représentation du site actif de la COX-1.....	20
Figure 9. Représentation du site actif de la COX-2.....	21
Figure 10. Représentation schématique de l'inhibition des cyclo-oxygénases par un anti-inflammatoire non stéroïdien non sélectif	22
Figure 11. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	23
Figure 12. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 1.....	27
Figure 13. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 2.....	28
Figure 14. La plante <i>Marrubium vulgare</i>	31
Figure 15. Structure de quelques flavonoïdes isolés de <i>M. vulgare</i>	33
Figure 16. Principales structures moléculaires présentes chez <i>M. vulgare</i> L.....	34
Figure 17. Carte représentant la distribution géographique de <i>M. deserti</i>	36
Figure 18. La plante <i>Marrubium deserti</i>	37
Figure 19. Structures moléculaires des principaux composés isolés de <i>Marrubium deserti</i>	39
Figure 20. Les différentes sous-classes des flavonoïdes.....	41
Figure 21. Les éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	42
Figure 22. Mécanisme d'action des flavonoïdes lors d'une inflammation.....	44
Figure 23. Structure des tanins hydrolysables.....	46
Figure 24. Structure des proanthocyanidines polymères.....	47
Figure 25. Matériel végétal broyé de <i>Marrubium vulgare</i> et <i>Marrubium deserti</i>	50

Figure 26. Extraction par polarité croissante de la poudre des sommités fleuries ainsi que les feuilles de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	53
Figure 27. Préparation de l'extrait aqueux lyophilisé de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>	55
Figure 28. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu.....	59
Figure 29. Protocole expérimental de la pleurésie induite chez les rats.....	69
Figure 30. Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires (EEp, EDCM) des feuilles et des sommités fleuries de <i>M. vulgare</i> dans le système éther de pétrole/ acétate d'éthyle (80/20; v/v).....	81
Figure 31. Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires (EEp, EDCM) des feuilles et des sommités fleuries de <i>M. deserti</i> dans le système éther de pétrole/ acétate d'éthyle (80/20; v/v).....	82
Figure 32. Chromatographie sur couche mince des extraits polaires (EMeOH, EBUOH, EAQ) issus des feuilles et des sommités fleuries de <i>M. vulgare</i> développée par deux systèmes: <i>n</i> -butanol/acide acétique/eau (60/15/25; v/v/v) et chloroforme/méthanol/eau (65:35:5; v/v/v).....	87
Figure 33. Chromatographie sur couche mince des extraits polaires issus des feuilles et des sommités fleuries de <i>Marrubium deserti</i> de Noé développée par le système chloroforme/méthanol/eau (65:35:5; v/v/v).....	89
Figure 34. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	90
Figure 35. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	94
Figure 36. Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	97
Figure 37. Droite d'étalonnage des flavonols.....	99
Figure 38. Histogrammes représentent les résultats de l'activité antifongique des extraits méthanoliques contre la croissance mycélienne de la levure.....	109
Figure 39. Cinétique de blanchiment du β -carotène à 490 nm en présence des extraits de <i>M. vulgare</i> et de l' α tocophérol.....	111
Figure 40. Cinétique de blanchiment du β -carotène à 490 nm des extraits de <i>M. deserti</i> et de l' α -tocophérol.....	112
Figure 41. Activité antioxydante relative des extraits de <i>M. vulgare</i> et de l' α tocophérol dans le système acide linoléique / β -carotène	114
Figure 42. Activité antioxydante relative des extraits de <i>M. deserti</i> et de l' α tocophérol dans le système acide linoléique / β -carotène.....	115

Figure 43. Pouvoir antiradicalaire des standards utilisés dans la présente étude.....	118
Figure 44. Activité antiradicalaire des extraits de <i>M. vulgare</i>	119
Figure 45. Activité antiradicalaire des extraits de <i>M. deserti</i>	119
Figure 46. Histogrammes des valeurs d'IC ₅₀ obtenues pour les différents extraits et standards.....	121
Figure 47. Structure chimique des phénylpropanoïdes glycosides de <i>Marrubium vulgare</i> et leur activité antioxydante.....	123
Figure 48. Pouvoir réducteur (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) des extraits de <i>M. vulgare</i> et des standards	126
Figure 49. Pouvoir réducteur (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) des extraits de <i>M. deserti</i> et des standards	126
Figure 50. Comparaison des pouvoirs réducteurs des extraits de <i>M. vulgare</i> et de <i>M. deserti</i> obtenus par la méthode FRAP	127
Figure 51. Histogrammes représentant les différences statistiques obtenues pour l'activité hémostatique	131
Figure 52. Histogrammes représentant le pourcentage de l'inhibition de l'œdème induit par la carraghénine des différents extraits et des standards	140
Figure 53. Inhibition des iso-enzymes de la cyclooxygénase par les AINS conventionnels ou les inhibiteurs sélectifs de COX-2.....	142
Figure 54. Histogrammes représentant la valeur de vitesse de sédimentation	145
Figure 55. Observation microscopique des coupes histologiques des oreilles droites des rats	148
Figure 56. Volume de l'exsudat récupéré à partir de la cavité pleurale chez les groupes de rats enflammés traités et non traités	150
Figure 57. Histogrammes représentant le nombre de PMNs récupérés de l'exsudat chez les rats enflammés traités et non traités	150
Figure 58. Evolution de la tolérance au glucose chez les rats hyper-glycémiques traités par les extraits méthanoliques des plantes étudiées	154



INTRODUCTION

Introduction Générale

Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle « la phytothérapie » est très répandue et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Dans les pays en voie de développement, l'usage de cette médecine est accessible et abordable particulièrement pour les patients les plus démunis, vu le coût élevé de certains médicaments ainsi que leur indisponibilité sur le marché (**Boudjelal et al., 2012**).

Les plantes soignent, parfois, non seulement la fatigue, l'insomnie, les maux de tête, la grippe, la toux, mais aussi de très nombreuses maladies chroniques parmi lesquelles on cite le diabète, les rhumatismes... En effet, le règne végétal est une source jugée inépuisable de molécules bioactives pouvant présenter un intérêt thérapeutique. Dans ce contexte, une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des métabolites secondaires qui constituent souvent des principes actifs des plantes médicinales et l'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites sur laquelle l'industrie pharmaceutique s'appuie pour le développement de nouveaux médicaments : l'aspirine, le taxol (**Hadj Salem, 2009**).

En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine arabe classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle (**Quezel et Santa, 1963**). Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes (**Zaabat et al., 2010**).

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution comme dans le cas du diabète, l'inflammation. Bien que quelques antioxydants synthétiques comme l'hydroxytoluène butylé (BHT), soient très utilisés, ils aient été suspectés d'être responsables des dommages de foie et de la carcinogénèse. Par conséquent, l'intérêt de développer et d'utiliser un antioxydant plus efficace d'origine naturel à augmenter ces dernières années (**Djeridane et al., 2010; Krishnaiah et al., 2010**).

Introduction Générale

De plus, l'utilisation des médicaments synthétiques anti-inflammatoires et antidiabétiques est accompagnée souvent à des effets secondaires indésirables, de ce fait, de nombreux chercheurs de part le monde, s'associent dans la recherche des composés d'origine végétale qui pourraient palier ces cotés négatifs.

Les microbes (bactéries, levures, virus,...) représentent aussi un problème de santé majeur en santé publique. Bien que des antibiotiques existent pour traiter ces infections, ceux-ci ne sont pas toujours efficaces du fait de l'apparition de germes résistants et de la toxicité des produits (**Cushnie et Lamb, 2011**). La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère par conséquent nécessaire.

Notre travail porte sur l'étude de deux plantes Algériennes aromatiques appartenant à la famille des *Lamiacées* : *Marrubium vulgare* L et *Marrubium deserti* de Noé. Le genre *Marrubium* a été étudié en raison des propriétés thérapeutiques que leur attribuit la médecine traditionnelle en Algérie et l'importance de leur famille (les Lamiacées) pour sa richesse en métabolites secondaires (diterpènes labdanes, polyphénols, flavonoïdes, irrédoïdes, alcaloïdes, phénylpropanoïdes...). En effet, les plantes de la famille de Lamiaceae sont utilisées traditionnellement comme anti-nociceptive, antispasmodique, antidiabétique, tonique,...

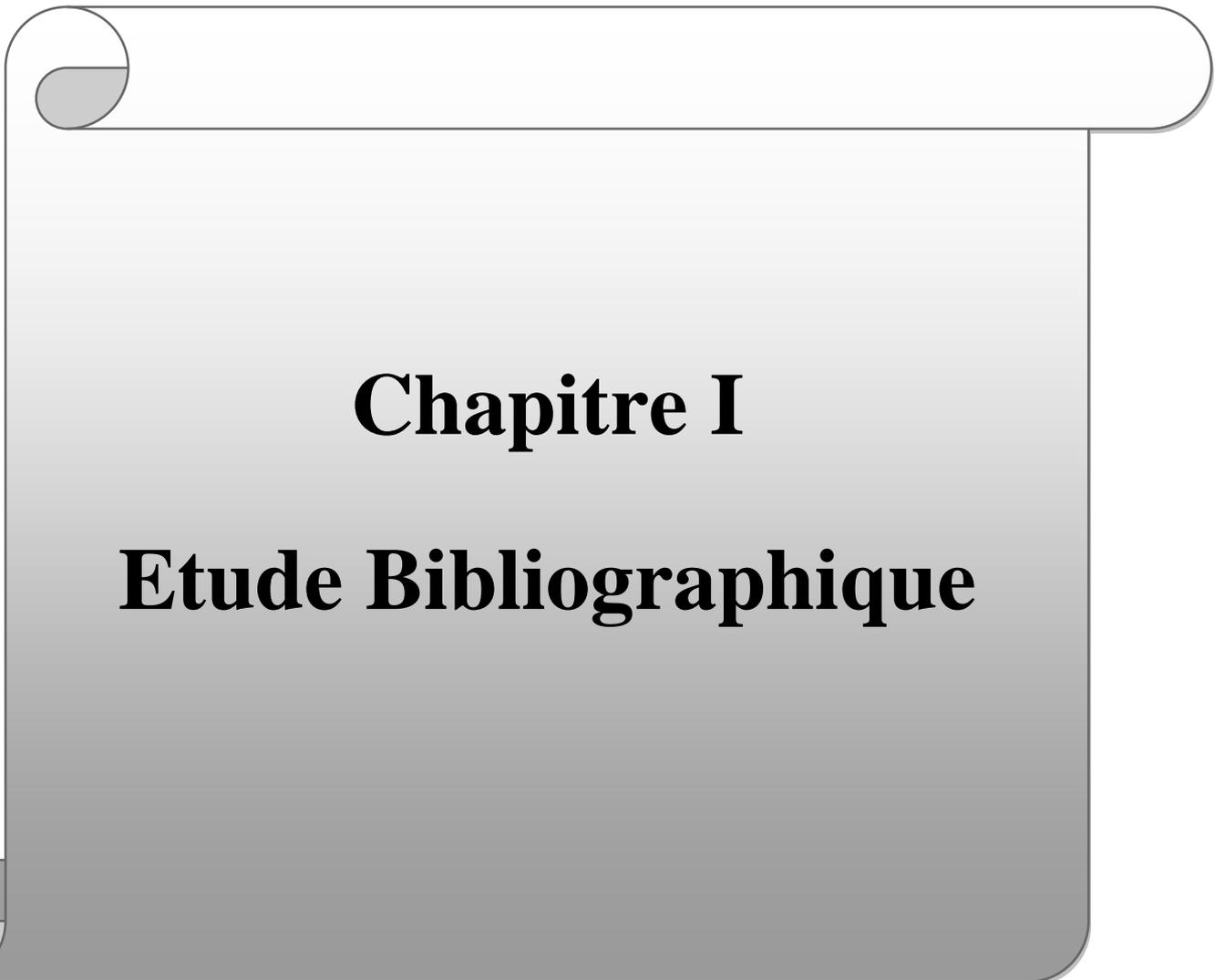
Notre présente étude s'inscrit dans cet objectif et elle a porté sur :

- Une étude phytochimique qui a permis d'identifier et de quantifier certains groupes chimiques bioactifs contenus dans les extraits organiques et aqueux des plantes étudiées : *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti*.

- Evaluer l'activité antioxydante, antimicrobienne et hémostatique *in vitro* des différents extraits des deux espèces végétales.

- Déterminer la toxicité aigüe et les activités anti-inflammatoire, analgésique et antidiabétique *in vivo* chez des rats à doses bien déterminées des extraits méthanoliques des deux plantes étudiées. Cette étude sera subdivisée en deux parties :

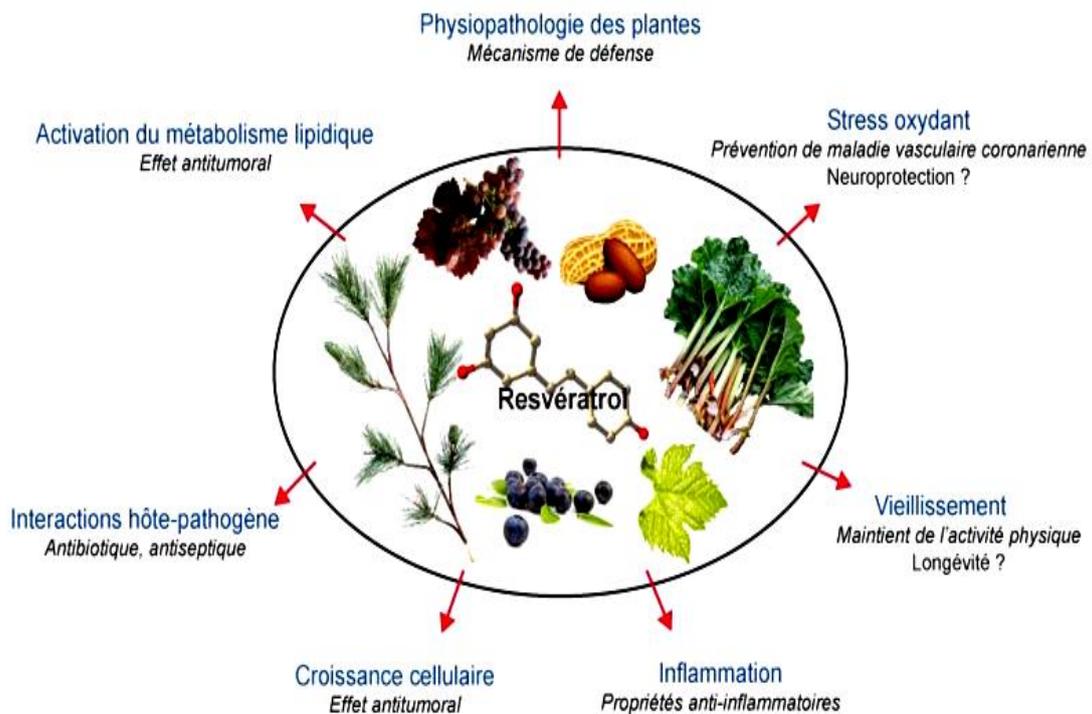
Une revue bibliographique : où nous apportons des données générales sur les différentes activités biologiques, les plantes étudiées dans cette recherche ainsi que les molécules bioactives des plantes. Une seconde partie « expérimentale » : dans laquelle nous rapportons les méthodes analytiques utilisées, les résultats obtenus ainsi que leur discussion et nous finirons par une conclusion.



Chapitre I

Etude Bibliographique

Activités biologiques



I. Activités biologiques

I. 1. Activité antimicrobienne des extraits des plantes

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes qui est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les composés synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (**García-Ruiz et al., 2008; Kempf et Zeitouni, 2012**). De nombreux chercheurs ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales, ils ont constaté que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (**Jürgen et al., 2009**). D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative et la thérapie naturelle (**Huang et al., 2008**).

I. 1. 1. Mode d'action des composés sur les bactéries

Il existe plusieurs types d'agents antimicrobiens (Figure 1). C'est le cas des agents physiques (Radiations UV, rayon γ), des agents chimiques (alcools, métaux lourds, agents alkylants, détergents, aldéhydes, halogènes, antibiotiques et composés poly-phénoliques dont ceux d'extraits de plantes) (**Bangou, 2012**).

A. Par la modification de la perméabilité membranaire

La membrane plasmique agit comme une barrière sélective. Elle régularise l'entrée et la sortie des substances chez les microbes. Une altération de la membrane plasmique peut inhiber la croissance de la bactérie ou conduire à sa mort. Dans ce cas, les antibiotiques utilisés sont les *polymixines* (**Bangou et al., 2012**).

B. Par inhibition de la paroi bactérienne

Certains agents antibactériens affectent la paroi de la bactérie en inhibant sa synthèse. C'est l'exemple de l'inhibition du peptidoglycane par la pénicilline ou par les polyphénols. Les antibiotiques utilisés sont les *β -lactamines* et les *glucopeptides* (**Bangou, 2012**).

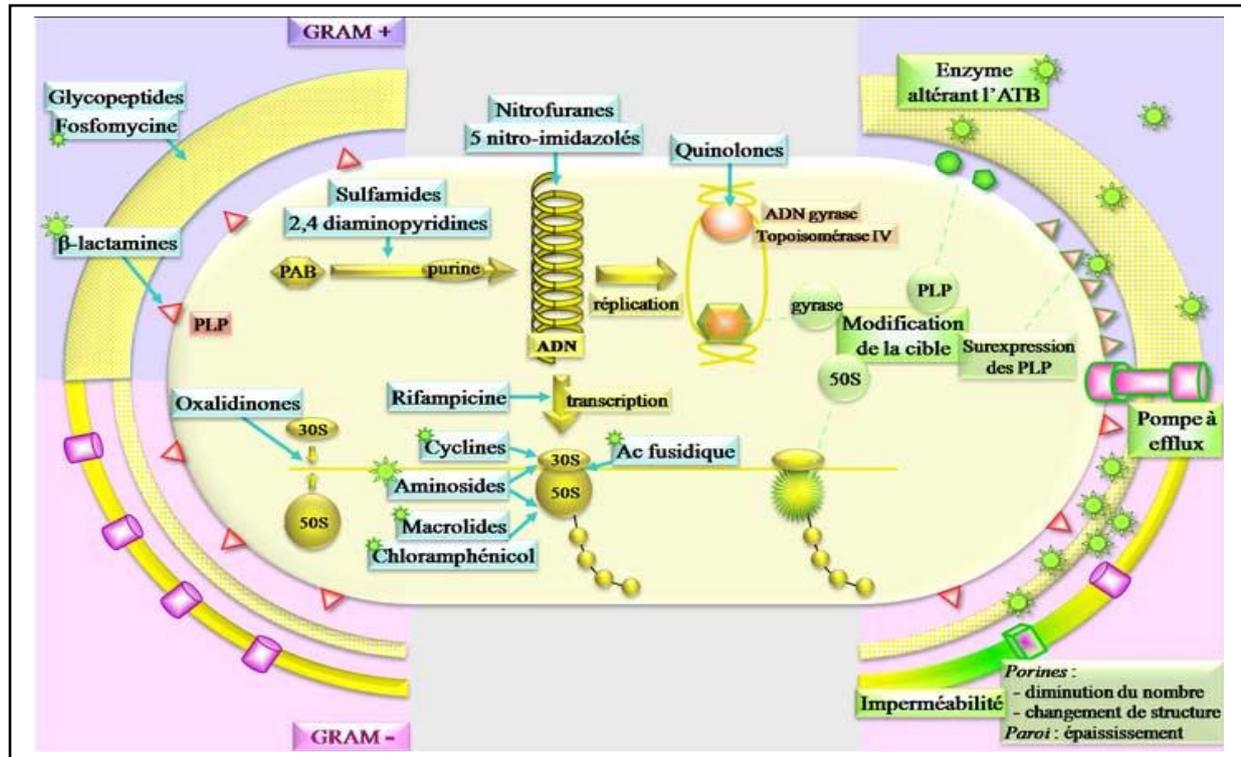


Figure 1. Schéma représentant les sites d'actions des antibiotiques chez les bactéries

(Bangou, 2012)

C. Par inhibition de la synthèse des protéines

C'est le cas des antibiotiques ou extraits de plantes qui agissent en inhibant l'incorporation des acides aminés dans les chaînes polypeptidiques. D'autres composés inhibent la combinaison aminoacide: ARN de transfert (ARN_t) avec le ribosome. Par contre d'autres inhibent la formation de la liaison peptidique par les peptidyl-transférases dans la bactérie. Les antibiotiques utilisés sont les *phénicol*s et les *tétracyclines* (Bangou, 2012).

I. 1. 2. Souches microbiennes étudiées

A. *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0,8 à 1 µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulées, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick et al., 1988 ; Sardet, 2003 ; Gao et al., 2011). Les espèces *S. aureus* peuvent provoquer de nombreuses pathologies telles que : la méningite, l'ostéomyélite et la diarrhée (Steven et al., 2004 ; Wiradharma et al., 2011).

B. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram-négatif opportuniste, aérobie, asporulée très mobile par un ou plusieurs flagelles polaires. Ce germe est inoffensif pour les individus en bonne santé mais devient rapidement très dangereux pour les personnes souffrant de déficiences immunitaires. *Pseudomonas aeruginosa* est la bactérie la plus souvent responsable d'infections nosocomiales telles que les infections urinaires, les pancréatites et les dermatites. Des études menées sur les souches de *P. aeruginosa* présentes dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose ont révélé que 20% de celles-ci présentent une forte activité de mutation, ce qui pourrait expliquer la grande adaptabilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux différents environnements hostiles ainsi que sa grande pathogénicité (Sabin *et al.*, 2006).

C. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif (Patrick *et al.*, 1988), de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm (Steven *et al.*, 2004).

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'Homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'Homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets immunodépressifs (Patrick *et al.*, 1988 ; Garcia et Le Bouguéneq, 1996).

D. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie appartenant au genre *Klebsiella*. Il s'agit d'un bacille à Gram-négatif immobile et souvent capsulé, fréquemment rencontré en pathologie humaine. Il cause des infections nosocomiales, il peut aussi être à l'origine des infections communautaires, surtout chez les patients présentant des facteurs de comorbidité tels que la cirrhose hépatique et le diabète sucré (Kassis-Chikhani, 2012).

E. *Salmonella typhimurium*

Les salmonelles font partie de la famille des entérobactéries, bacilles à Gram négatif. Les salmonelloses comprennent deux principaux types d'infections : d'une part, la fièvre typhoïde et les fièvres paratyphoïdes et d'autre part les salmonelloses non typhoïdiques (Aubry et Gaüzère, 2015). La détermination des nombreux sérotypes est antigénique. Chaque sérotype possède une mosaïque d'antigènes : somatique O, capsulaire Vi, flagellaire H. L'identification

précise de chaque sérotype s'effectue par séro-agglutination en présence de divers antisérums mono-spécifiques O et H (Aubry et Gaüzère, 2015). Le Tableau (1) représente les critères biochimiques d'identification des bactéries de l'étude.

Tableau 1. Identification de quelques bactéries de l'étude
(Bangou, 2012)

Tests										
Oxy	Glu	Lac	Malt	Sacch	NO ₃ R	ONPG	Indole	Urée	Genre	Espèce
-	+	+			+	+	+	-	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>
-	+	-/+				-	-	-	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhimurium</i>
-	+	-				-	-	-	<i>Shigella</i>	<i>S. flexneri</i>
-		-/+					-	+	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i>
-		+					-	+	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>
+	-	-		-			-	-	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
					+				<i>Staph.</i>	<i>S. aureus</i>

ONPG: ortho-nitro-phényl-β-D-galactosidase; **NO₃R:** nitrate réductase;

-/+ : fermente en cas d'acquisition d'un plasmide.

F. *Candida albicans*

Candida albicans est un champignon ovale, bourgeonnant ressemblant aux levures, qui produit un pseudo mycélium dans les cultures. Les infections causées par les espèces *Candida* sont connues sous le nom de candidoses. Les pathologies associées sont extrêmement variées puisque tout organe ou système du corps (sanguin, nerveux) peut être infecté. L'infection existe sous deux formes : l'une superficielle (cutanée, digestive et génito-urinaire), l'autre disséminée ou septicémique (candidose profonde ou candidémie) (El-Kirat-Chatel, 2010).

G. *Aspergillus niger*

Les *Aspergillus* sont des moisissures à filaments cloisonnés hyalins, souvent responsables de mycoses opportunistes, à l'origine d'infections localisées ou invasives, d'allergies ou de mycotoxicoses. La contamination se fait essentiellement par inhalation de spores, d'où l'atteinte préférentielle des poumons et des voies aériennes supérieures comme les bronches ou les sinus. La contamination directe par déposition de spores sur des plaies ou brûlures cutanées, ou un site opératoire, peut aboutir à des infections locales à risque de dissémination en fonction du contexte clinique (Mohammedi, 2013).

H. *Penicillium digitatum*

Les *Penicillium* sont des champignons filamenteux, de type moisissure. *P. digitatum* est universellement distribué, il est la cause de pourriture destructive sur agrumes. C'est la moisissure verte couramment rencontrée sur les agrumes et surtout les oranges, Il est isolé du sol ou d'autres aliments (Samson, 2004; Alilou *et al.*, 2007).

I. 2. Activité hémostatique

I. 2. 1. Rappel sur l'hémostase

Le terme *hémostase* sert à désigner l'ensemble des mécanismes permettant la prévention de la perte de sang à la suite d'un dommage subi au niveau de l'endothélium. En situation physiologique, l'activation des processus hémostatiques se reflète par la mise en œuvre de quatre principaux mécanismes qui sont : le déclenchement d'une vasoconstriction sous le contrôle du système nerveux et l'influence de certains facteurs plaquettaires, suivie par l'agrégation des plaquettes activées pour former le clou plaquettaire primaire. Ensuite, l'initiation de la formation d'un caillot de fibrine résultant de l'enclenchement des réactions de la coagulation sanguine et enfin la dégradation du caillot et la formation d'un tissu fibreux à l'intérieur du caillot sanguin (Borgel et Diehl, 2005). Les différentes étapes de l'hémostase sont: l'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse (Aouissa, 2002).

A. L'hémostase primaire

L'hémostase primaire assure la formation du clou plaquettaire. Ce processus fait intervenir des vaisseaux, des plaquettes, le facteur Von Willebrand: VWF et le fibrinogène. Il se déroule en deux phases: vasculaire et plaquettaire. Au niveau des vaisseaux, on peut distinguer une surface thromborésistante représentée par l'endothélium et une surface thrombogène représentée par le sous endothélium. Après la rupture des vaisseaux, une vasoconstriction instantanée réduit le diamètre de celui-ci et également le flux sanguin local, c'est la phase vasculaire. La mise à nue du sous endothélium initie la phase plaquettaire qui englobe l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire (Aouissa, 2002).

L'accolement des plaquettes aux cellules du sous endothélium vasculaire fait intervenir une glycoprotéine Ib, le facteur VWB, le collagène et les microfibrilles. Un changement de forme des plaquettes va caractériser l'activation plaquettaire. Elle survient rapidement après l'adhésion des plaquettes qui vont émettre des pseudopodes accompagnés avec des invaginations. Une sécrétion plaquettaire succède à ce changement de forme et équivaut à une

exocytose qui va conduire à une excrétion du contenu des granules plaquettaires. Au cours de cette activation, la thromboxane A, puissant vasoconstricteur est synthétisé. En dernière étape, sous l'action d'agents agrégants comme l'ADP et la Thromboxane A₂, il se produit un accollement de plaquettes les unes contre les autres. C'est l'agrégation plaquettaire conduisant à la formation du clou plaquettaire (**Aouissa, 2002**).

B. La coagulation

Elle représente la deuxième étape et aboutit à la formation du caillot de fibrine assurant ainsi l'hémostase définitive. Elle s'effectue en 3 phases: la génération de la prothrombinase, la thrombinoformation et la fibrinoformation. La génération de la prothrombinase s'effectue selon une voie endogène qui implique la prékalicreine, le facteur Hageman, la PTA (plasma thromboplastin antecédent), le facteur antihémophilique B, le facteur antihémophilique A, le facteur Stuart, la proaccélérine, le facteur 3 plaquettaire et le Ca⁺⁺. La voie extrinsèque ou tissulaire implique la proconvertine, la thromboplastine tissulaire, le facteur Stuart, la proaccélérine et le Ca⁺⁺. Une dernière voie dite cellulaire fait intervenir les monocytes et les macrophages (**Aouissa, 2002**).

Cette prothrombinase ainsi générée va catalyser la formation de la thrombine à partir de la prothrombine. La thrombine va participer à l'hydrolyse partielle du fibrinogène conduisant à la formation de monomères de fibrine et de fibrinopeptides A et B. Ces monomères de fibrine se polymérisent alors et conduisent à la formation de « fibrine » ou de fibrine soluble.

Un facteur stabilisant la fibrine FSF intervient et transforme les liaisons hydrogènes en liaisons covalentes. Il renforce la cohésion du réseau de polymères de fibrine: c'est la formation de fibrine insoluble. La rétraction du caillot est directement liée à une fonction vitale de la plaquette, mais influencée par l'hématocrite et la concentration du plasma en fibrinogène. Il est important de souligner que l'organisme dispose d'un système de régulation grâce à l'activité d'inhibiteurs de la coagulation parmi lesquels on a les antithrombines physiologiques: l'antithrombine III, l' α -1 antitrypsine, l' α -2 macroglobuline; les inhibiteurs de la C1- estérase, le système Protéine S-Protéine C, et l'inhibiteur de la voie extrinsèque (EPI extrinseque pathway inhibitor) (**Aouissa, 2002**).

C. La fibrinolyse

Dernière étape de l'hémostase, elle assure la dissolution du caillot sanguin permettant une perméabilisation. Elle met en jeu un système fibrinolytique et un système d'inhibiteur de la fibrinolyse. La fibrinolyse physiologique se déroule selon un schéma analogue à celui de la coagulation et elle est toujours localisée (**Aouissa, 2002**).

Le système fibrinolytique met en jeu les activateurs du plasminogène qui sont essentiellement la kallitrene et l'urokinase qui a la capacité de transformer le plasminogène en plasmine. Le plasminogène est une glycoprotéine plasmatique existant sous forme de proenzyme. Il est synthétisé au niveau du foie. Sa protéolyse aboutit à la formation de plasmine dont le spectre d'action inclut la fibrine, le fibrinogène et même l'hémoglobine. L'action de cette plasmine aboutit à la formation de produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène. Ces produits sont éliminés par le système réticulo-endothélial.

Le système inhibiteur de la fibrinolyse regroupe des inhibiteurs de l'activation du plasminogène, des inhibiteurs de l'activation de la plasmine (α_2 antiplasmine, α_2 macroglobuline, α_2 antitrypsine) et des inhibiteurs utilisés en thérapeutique. C'est le cas de l'Apolinine extrait du poumon de bœuf, de l'acide tranexaminique. Ce système inhibiteur constitue un régulateur de la fibrinolyse (Aouissa, 2002).

I. 2. 2. Les hémostatiques

Les hémostatiques sont des médicaments qui ont pour but d'arrêter un écoulement sanguin. Les hémostatiques sont administrés oralement, par injection ou par perfusion, selon le produit utilisé et le degré d'urgence. Il existe de nombreux produits ayant chacun une spécificité bien précise (Aouissa, 2002 ; Lillo-Le Louët, 2006).

- **La vitamine K** : sert à traiter et à prévenir des hémorragies par carence en vitamine K ou à pallier un surdosage en anti-vitamine K. Les vitamines K interviennent dans la synthèse au niveau du foie de facteurs nécessaires à la coagulation dont la prothrombine (Lillo-Le Louët, 2006).
- **L'hémostatique Ercé**: est une préparation stérile de thromboplastine administrée localement ou *per os* (5 à 10 ml), dans toutes les hémorragies de pratique courante.
- **L'Adrenoxyl** : est utilisé *per os* et en injection intramusculaire ou sous-cutané.
- **Bleu de toluidine** : utilisé surtout en gynécologie dans les hémorragies utérines.
- **La protamine** : est un inhibiteur de la fibrinolyse est prescrite contre les hémorragies par surdosage en héparine (Lillo-Le Louët, 2006).

Enfin, parmi les produits issus du sang humain, le facteur VIII est indiqué pour l'hémophilie A, le facteur IX pour l'hémophilie B, les concentrés de plaquettes pour certaines thrombopénies. Ces produits sont contre indiqués en cas de grossesse et chez les personnes sujettes aux réactions allergiques. Les hémostatiques locaux s'appliquent sur la plaie pour arrêter l'écoulement sanguin. Les colles biologiques et les gazes résorbables servent lors des interventions chirurgicales (Lillo-Le Louët, 2006).

I. 3. Activité antioxydante

L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons au cours de la respiration cellulaire des organismes aérobies. Dans l'organisme absorbé au niveau des alvéoles pulmonaires, il est transporté par l'hémoglobine au niveau des organes où il diffuse dans les mitochondries (Allain, 1996). Il assure grâce à des enzymes, l'oxydation de divers substrats endogènes : les phospholipides des membranes cellulaires, les protéines, l'ADN. Cette oxydation conduit à la formation des radicaux libres ou espèces réactives oxygénées (ERO). La formation des ERO est un processus tout à fait naturel et joue un rôle essentiel dans l'organisme : efficacité de l'apoptose, prolifération cellulaire normale, régulation de la pression sanguine, état redox normal pour l'expression des gènes (Rolland, 2004; Migdal et Serres, 2011).

Mais, ces ERO peuvent causer des dommages à l'organisme, en effet en cas de stress entraînant un défaut de régularisation de l'oxydation, de conditions environnementales ou de déséquilibre alimentaire, ils provoquent des désorganisations cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort des cellules (Rolland, 2004). Cela peut conduire à l'apparition de nombreuses pathologies telles que : les maladies inflammatoires, l'athérosclérose, l'ischémie cérébrale, le cancer et le diabète (Diallo *et al.*, 2001; Sies *et al.*, 2017).

1. 3. 1. Radicaux libres (RLs)

Définissent comme tout atome ou molécule, neutre ou ionisée, comportant au moins un électron célibataire dans une orbitale externe. Ils sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie. Leurs agressions sur l'organisme sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil ou d'un effort physique intense.

Les RLs sont : $O_2^{\bullet -}$ (radical anion superoxyde), OH^{\bullet} (radical hydroxyle), HO_2^{\bullet} (radical perhydroxyle), RO^{\bullet} (radical alkoyle), ROO^{\bullet} (radical peroxyde), NO^{\bullet} (nitrogen monoxide). Les espèces à l'origine de RL sont : 1O_2 (oxygène singulet), H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), $ROOH$ (hydroperoxyde), OCl^- (hypochlorite) (Sies *et al.*, 2017). Les principales sources d'espèces réactives de l'oxygène sont représentées dans la Figure 2.

I. 3. 2. Action néfaste des ERO dans les tissus biologiques

Les dérivés de l'oxygène produits étant hautement réactifs, ils sont susceptibles de jouer un rôle d'oxydants ou d'initiateurs de réactions radicalaires vis-à-vis de nombreuses biomolécules. Ils peuvent ainsi entraîner le dysfonctionnement ou l'inactivation de protéines et de systèmes enzymatiques, altérer la structure des cellules, de leurs organites ou des acides nucléiques (cassure de brin) (Hannebelle, 2006; Migdal et Serres, 2011).

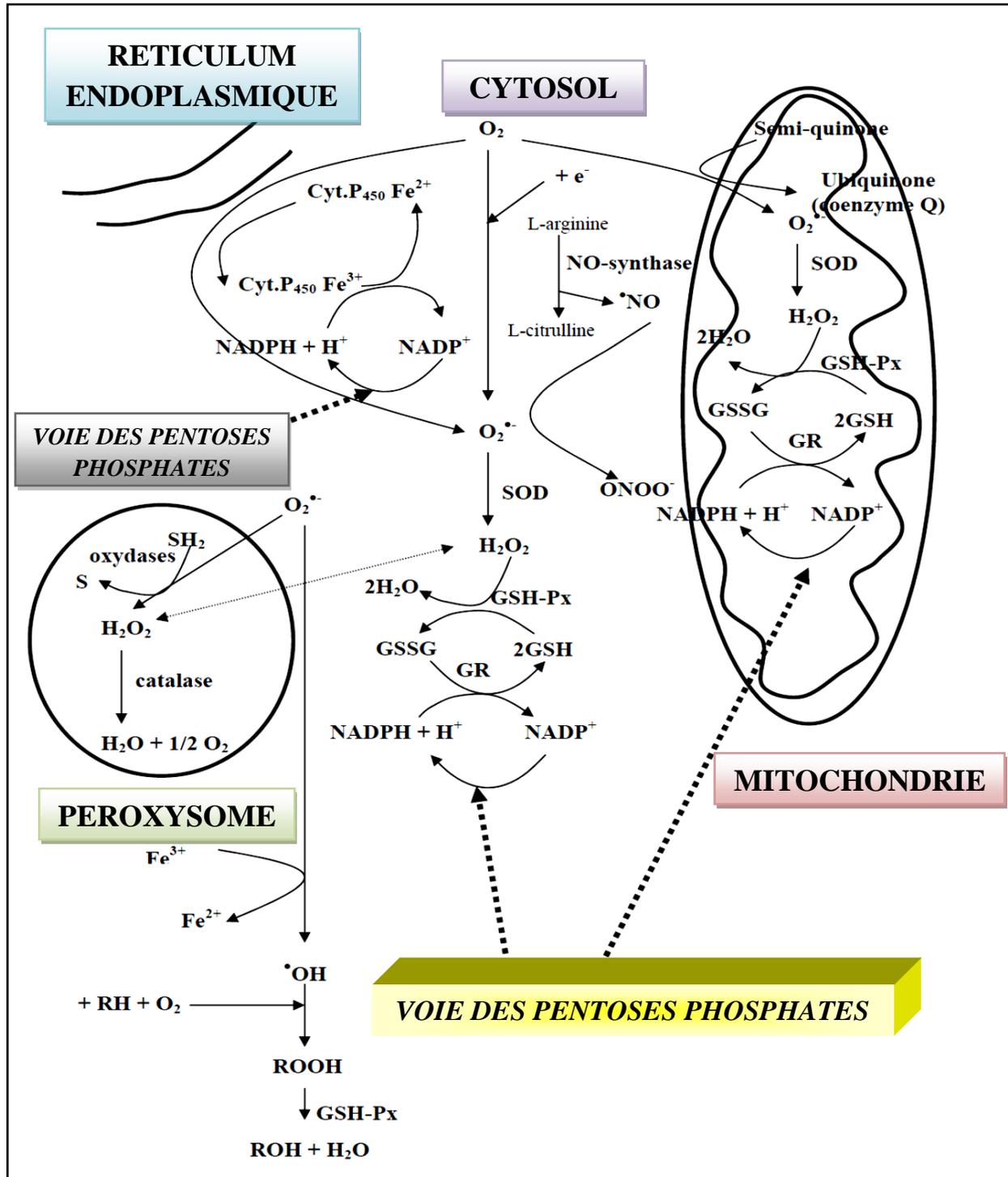


Figure 2. Principales sources cellulaires de radicaux libres (Bonfond-Rousselot et al., 2003).

RH : acide gras polyinsaturé, ROOH : hydroperoxyde lipidique, SH₂ : substrat réducteur, S : substrat oxydé, SOD : superoxyde dismutase, GSH-Px : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé.

A. Lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des ERO en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières. Les produits d'oxydation formés peuvent participer en tant que second messager à la régulation de fonctions métaboliques, de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaire. Ils peuvent aussi se comporter comme des substances toxiques responsables des dysfonctionnements et d'altérations cellulaires (perte d'acides gras polyinsaturés, diminution de la fluidité membranaire, modification de l'activité des enzymes,...) (**Favier, 2003**).

En ce qui concerne les dégradations oxydatives des acides gras, il en existe deux types : la rancidité cétonique et la rancidité oxydative. La première ne sera pas détaillée ici car elle est due à l'action de certaines moisissures (*Eurotium amstelodani*) sur des graisses saturées et constitue un problème d'ordre microbiologique pour l'industrie agroalimentaire. La rancidité oxydative résulte de l'action directe de l'oxygène sur les acides gras et survient dans les huiles alimentaires comme dans les tissus biologiques, *in vivo* (**Hannebelle, 2006**).

La réaction expliquant le phénomène de rancidité oxydative a pour nom peroxydation lipidique. Cette réaction radicalaire se déroule en trois phases (Figure 3) :

- **L'initiation** : l'attaque par un radical OH^\bullet du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'AGPI produit un radical carboné R^\bullet (OH^\bullet enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxyde RO_2^\bullet (**Pincemail et al., 2001; Favier, 2003; Hannebelle, 2006**).

- **La propagation** : le radical RO_2^\bullet enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical R^\bullet puis un radical RO_2^\bullet , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (**Pincemail et al., 2001; Favier, 2003; Hannebelle, 2006; Sies et al., 2017**).

- **La terminaison** : cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite « briseur de chaîne » (**Pincemail et al., 2001; Favier, 2003; Hannebelle, 2006**).

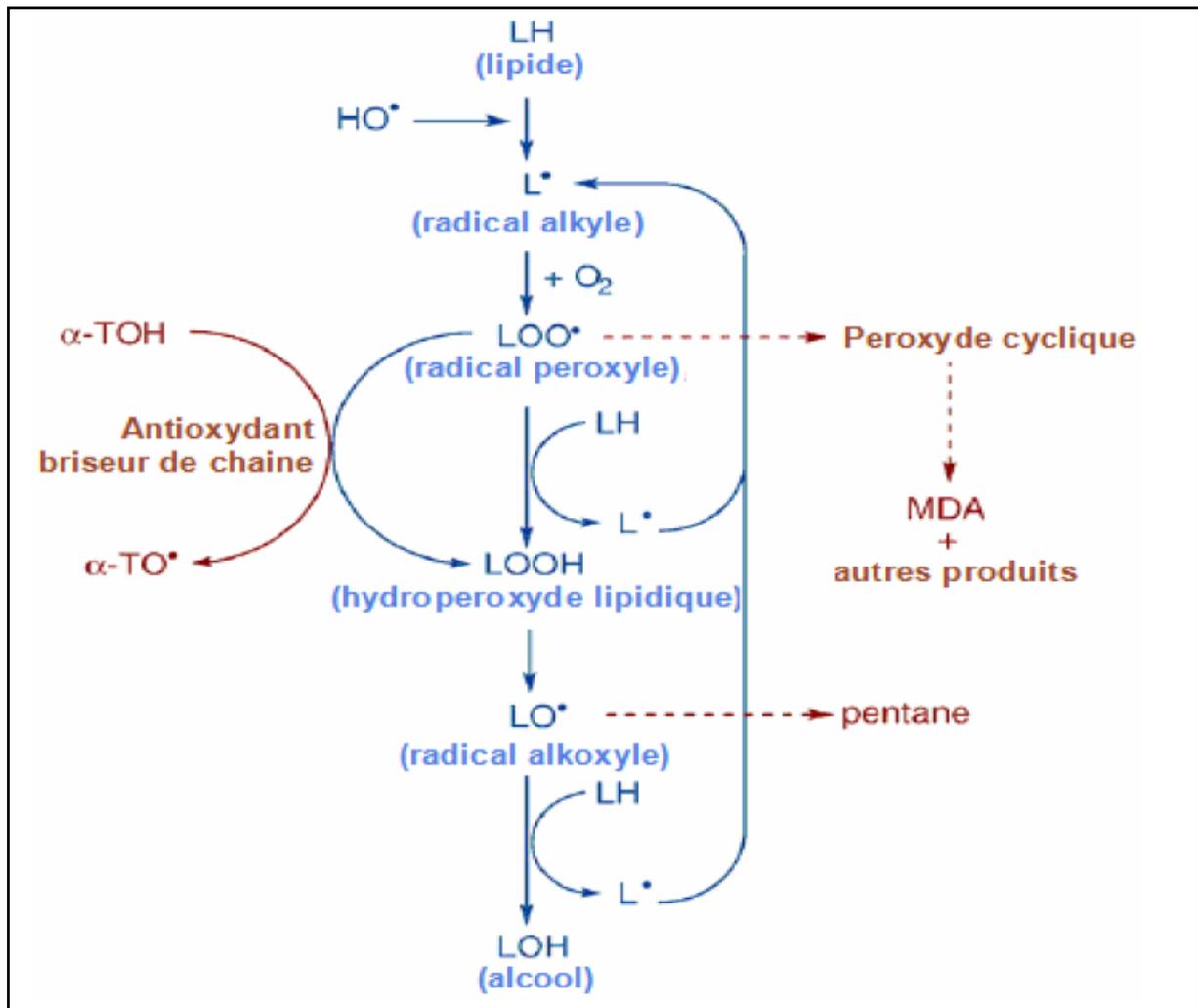


Figure 3. Etapes de la peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008).

B. Lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (Haleng *et al.*, 2007).

C. Acides nucléiques

Les modifications induites par des processus oxydatifs dans le matériel génétique appartiennent à quatre catégories: modifications des bases (possibilité de dimérisation), cassures simples et doubles de la chaîne d'ADN, sites abasiques et pontages avec des

protéines (Hennebelle, 2006). Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et dans le vieillissement cellulaire. L'ARN est également sujet à l'oxydation, avec des implications pour les processus pathologiques. Les microARN sont des ARN non codants, d'une longueur d'environ 18 à 25 nucléotides, qui se lient aux ARNm cibles et affectent la dégradation de l'ARNm ou inhibent la traduction des protéines (Sies *et al.*, 2017). Un sous-ensemble de micro-ARN régulant les voies redox a été appelé redoximiRs. La modification oxydative du microARN-184 lui permet de cibler l'ARNm des protéines B lymphocytaires Bcl-xL et Bcl-w, bloquant ainsi leur traduction (Sies *et al.*, 2017), ce qui conduit à l'apoptose (Figure 4).

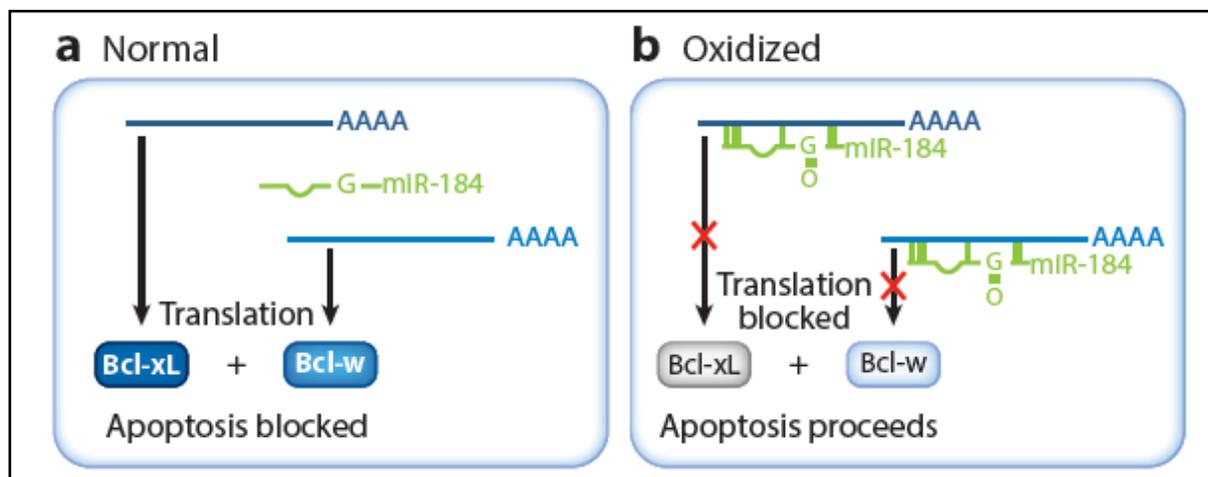


Figure 4. Exemples de transformations d'origine oxydative subies par l'ARN

(Sies *et al.*, 2017)

MicroARN oxydé (miR) peut changer la spécificité de l'ARNm. Le miR-184 natif ne se lie pas aux 3-UTR de Bcl-xL et Bcl-w, ce qui permet leur traduction, ce qui conduit à une apoptose bloquée (a). Une base de guanine oxydée dans miR-184 provoque une méconnaissance des 3 β -UTR des protéines de lymphome à lymphocytes B Bcl-xL et Bcl-w. Cela entraîne leur régulation négative, ce qui conduit à l'apoptose (b).

I. 3. 3. Systèmes de défenses antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO (Allain, 1996). Le terme d'antioxydant désigne toute substance, qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Hennebelle, 2006).

Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques. Mais, aussi à des petites molécules hydro ou liposolubles (Figure 5). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Delattre et al., 2005**).

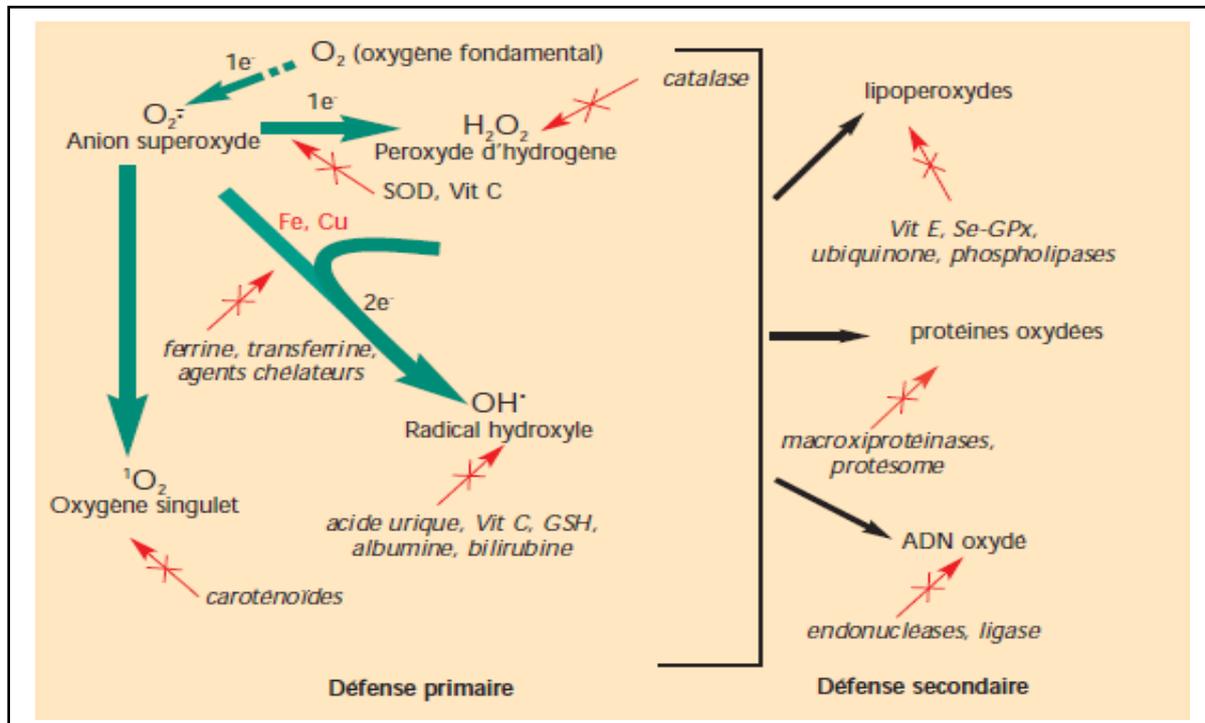


Figure 5. Régulation de la production des espèces oxygénées activées (ERO) par des systèmes antioxydants de défenses primaire et secondaire (**Pincemail et al., 2001**).

A. Le système antioxydant enzymatique

Il s'agit principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (**Haleng et al., 2007**).

a. La superoxyde dismutase : SOD

La superoxyde dismutase accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire ainsi que leur localisation cellulaire (**Haleng et al., 2007; Sies et al., 2017**).

b. La catalase :

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Haleng et al., 2007**).

c. Les glutathions peroxydases et réductases :

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG (Figure 6) (Gaschler et Stockwell, 2017; Sies *et al.*, 2017).

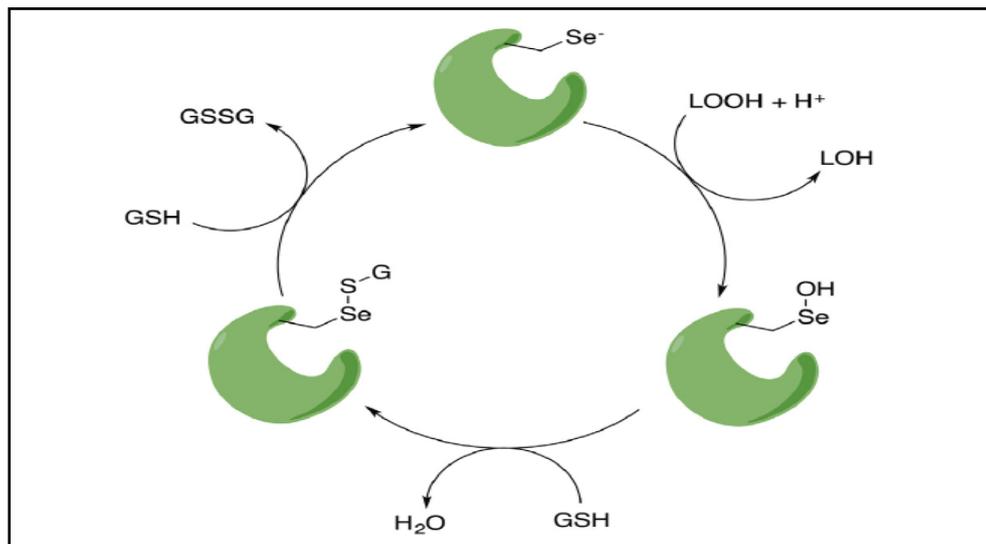


Figure 6. Rôle des glutathions peroxydases et réductases (Gaschler et Stockwell, 2017).

B. Systèmes antioxydants endogènes non enzymatiques

Renferme de nombreuses substances endogènes à savoir le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la mélanine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q. Parmi ces composés, le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le $\cdot\text{NO}$ (Favier, 2003). Le glutathion est un constituant intracellulaire présent à des concentrations milli-molaires dans la plupart des cellules et micro-molaires dans le plasma. Dans des conditions physiologiques, le glutathion sous forme réduite (GSH) représente la très grande majorité du glutathion total (90 à 98%). Lors d'un stress oxydant, le GSH est oxydé en GSSG avec la formation de pont disulfure. Le glutathion agit également comme co-substrat d'enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase. La bilirubine est capable de piéger des radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$ et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Hadj-Salem, 2009).

D. Molécules antioxydantes exogènes

a. La vitamine C : l'acide L-ascorbique (Figure 7) est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes et de l'oxygène singulet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, le produit formé étant le radical ascorbyle. En piégeant les radicaux peroxydes dans la phase aqueuse avant qu'ils initient la peroxydation lipidique, la vitamine C protège les biomembranes et les lipoprotéines (Delattre *et al.*, 2005).

b. La vitamine E : le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'Homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) en s'oxydant en quinone et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle (OH^\bullet). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) pour former un radical tocophéryle. Il est régénéré essentiellement selon deux voies; d'une part, la vitamine C, est capable de réduire le radical tocophéryle, d'autre part, une enzyme spécifique, glutathion dépendante, la tocophéryl réductase, est capable de réduire le radical tocophéryle en α -tocophérol. Parallèlement, le glutathion à l'état réduit (GSH) est oxydé en glutathion oxydé (GSSG). Ce métabolisme implique la participation de la vitamine B₂, cofacteur de la glutathion réductase, nécessaire à la régénération du GSH après son oxydation par le radical tocophéryle (Delattre *et al.*, 2005).

c. β -carotène : le β -carotène (Figure 7) est apporté par l'alimentation. Il est doué de plusieurs capacités : il est précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et avec les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante (Delattre *et al.*, 2005 ; Hadj-Salem, 2009).

d. Polyphénols : les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre *et al.*, 2005).

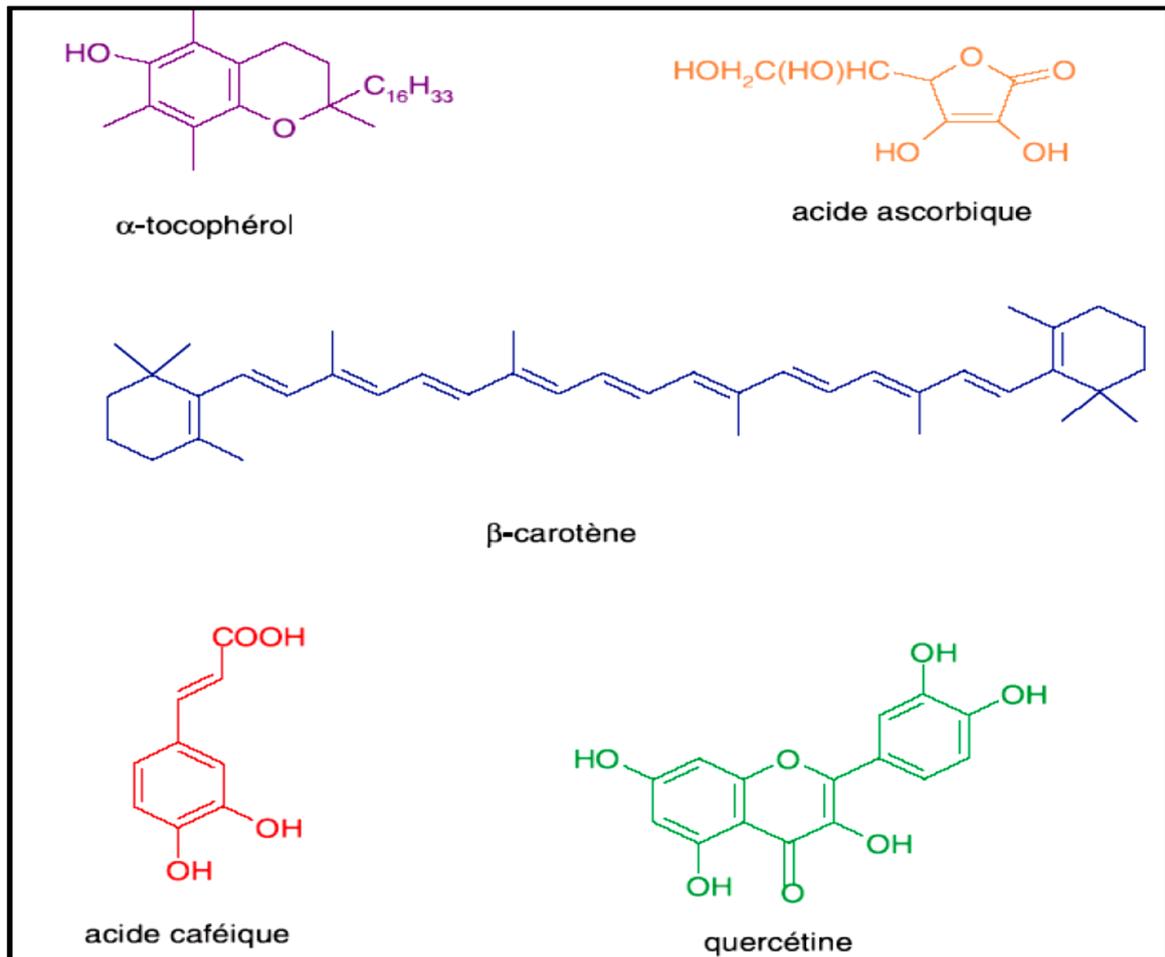


Figure 7. Structure de quelques antioxydants d'origine alimentaire :
 α-tocophérol, acide ascorbique, β-carotène, acide caféique et quercétine
 (Hannebelle, 2006)

I. 4. Activité anti-inflammatoire

I. 4. 1. Définition

L'inflammation est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène. Elle se traduit par quatre symptômes cardinaux : chaleur, douleur, rougeur et œdème. L'inflammation est un ensemble de réactions dont la finalité peut être :

- * utile : réaction de défense de l'organisme pour faire face à une agression.
- * nocive : inflammation secondaire à un processus auto-immune (**Moulin, 1998**).

On distingue :

- l'inflammation localisée ou primaire ;
- l'inflammation généralisée ou secondaire (chronique) : c'est le cas dans l'inflammation rhumatismale (**Moulin, 1998**).

I. 4. 2. Mécanismes de l'inflammation

Le déroulement du processus inflammatoire est toujours le même. Il évolue en trois phases successives : une phase caractérisée par les réactions vasculo-sanguines, suivie par une phase caractérisée par les réactions cellulaires (phase productive) et enfin une phase de cicatrisation (Moulin, 1998).

I. 4. 3. Anti-inflammatoires

Ils se classent en deux grandes classes : les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les anti-inflammatoires stéroïdiens.

A. Anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens demeurent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le cadre de la prescription médicale ou de celui de l'automédication, en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques ou antalgiques et même, pour trois d'entre eux (aspirine, flurbiprofène et indobufène), inhibitrices de l'agrégation plaquettaire (Jouzeau *et al.*, 2004).

Les AINS exercent un effet anti-inflammatoire essentiellement par l'inhibition compétitive, réversible ou non de l'activité enzymatique de la cyclooxygénase (COX) (Vane, 1971). Puisque celle-ci en utilisant l'acide arachidonique comme substrat génère plusieurs types de prostanoides ayant un rôle crucial dans l'inflammation. Les AINS permettent de limiter la quantité de médiateurs pro-inflammatoires produits lors de ce processus immunitaire, et par conséquent, constituent une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement de l'inflammation. Il existe deux principales isoformes de cyclooxygénase :

- ❖ **COX-1** : c'est l'isoforme constitutive, présente dans la plupart des tissus de l'organisme. Elle est impliquée dans la production de PGs à fonctions protectrices au niveau vasculaire (plaquettes sanguines, cellules endothéliales), au niveau de l'estomac et au niveau rénal (Jouzeau *et al.*, 2004).
- ❖ **COX-2** : elle est principalement induite lors des phénomènes inflammatoires. Elle peut aussi exprimée constitutivement par certains tissus tels que le rein et le cerveau.

a. Isoforme COX-1

La structure tridimensionnelle de la COX-1 a été établie au début des années 1990 par étude radio-cristallographique (Picot *et al.*, 1994). Le domaine catalytique est constitué d'un long canal hydrophobe relativement étroit (dimensions : $25 \times 8 \text{ \AA}$) (Figure 8).

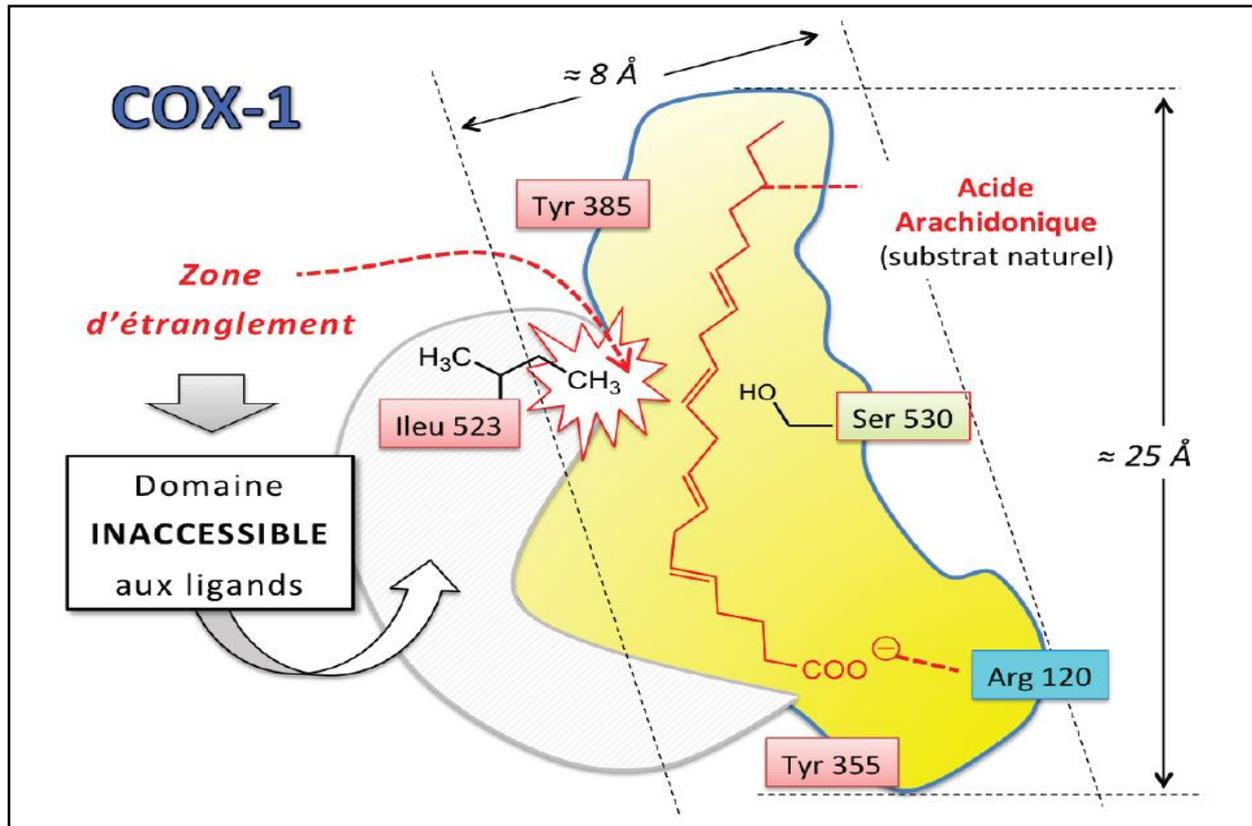


Figure 8. Représentation du site actif de la COX-1 (Picot *et al.*, 1994)

Divers aminoacides participent au fonctionnement de l'enzyme, soit par effet électronique, soit par effet stérique :

- ✓ **L'Arginine 120** : située à l'entrée du site actif, possède une chaîne latérale porteuse d'une fonction guanidine, facilement protonable. La charge cationique joue un rôle clé dans l'ancrage du substrat naturel de l'enzyme (*interaction électrostatique* avec le groupement carboxylate de l'acide arachidonique : AR) (Jouzeau *et al.*, 2004).
- ✓ **La Tyrosine 385** : située à l'autre extrémité du site, participe à l'activité cyclooxygénase en provoquant *l'arrachement stéréospécifique* de l'atome d'hydrogène en position 13 de l'acide arachidonique (Jouzeau *et al.*, 2004).
- ✓ **La Sérine 530** : au niveau de la partie centrale du site actif, intervient par sa chaîne latérale à fonction alcool. Ce résidu polaire impose une certaine courbure à la molécule de l'acide arachidonique, nécessaire à l'action de l'enzyme sur son substrat.
- ✓ **L'Isoleucine 523** : est responsable d'un effet *stérique* en raison de sa chaîne latérale *isobutyle*. Ce motif ramifié génère une *zone d'étranglement* dans la partie centrale du site catalytique de la COX-1 (Jouzeau *et al.*, 2004).

b. Isoforme COX-2

La structure 3D de la COX-2, déterminée en 1996 par Luong et *Coll.*, a permis de constater une grande similitude entre les deux isoformes : il existe environ 60 % d'homologie dans les séquences peptidiques (Figure 9).

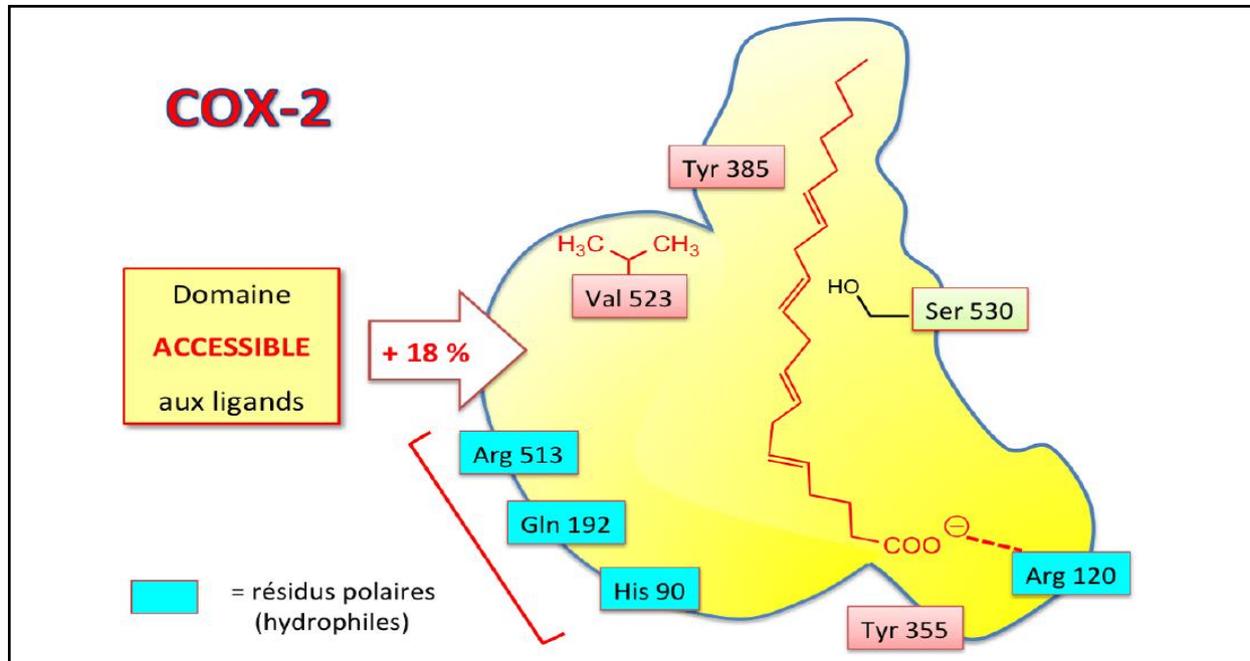


Figure 9. Représentation du site actif de la COX-2 (Luong et *Coll.*, 1996)

Les acides aminés essentiels à la fixation du substrat (Arg120) ou à la réaction d'oxygénation (Tyr385) sont également retrouvés dans la COX-2. Toutefois, des remplacements ponctuels de certains résidus vont entraîner des modifications d'ordre stérique au niveau du site enzymatique : le site actif COX-2 est dépourvu de l'isoleucine 523 et possède à la place une valine dont le groupement *isopropyle* est plus petit par rapport à l'*isobutyle*. La perte d'un groupe CH₃ permet de diminuer l'encombrement stérique : il se crée un passage vers une poche latérale qui devient alors accessible à des molécules relativement volumineuses (Jouzeau *et al.*, 2004). Cette poche latérale se distingue par certains résidus à caractère polaire : Arginine (Arg), Glutamine (Gln), Histidine (His).

Lors de notre description de COX, nous avons montré que le site catalytique de cette famille enzymatique ressemble à un long tunnel terminé par un cul-de-sac élargi. D'une part, les AINS non sélectifs bloquent l'entrée du site actif de COX en se liant via leur groupement carboxyl à un résidu arginine en position 120 (Arg-120) (Vane *et al.*, 1998). Ainsi, cette liaison à l'arginine située à l'entrée du tunnel empêche l'acide eicosa-5, 8, 11, 14-tétraénoïque d'atteindre le site catalytique de l'enzyme (Figure 10).

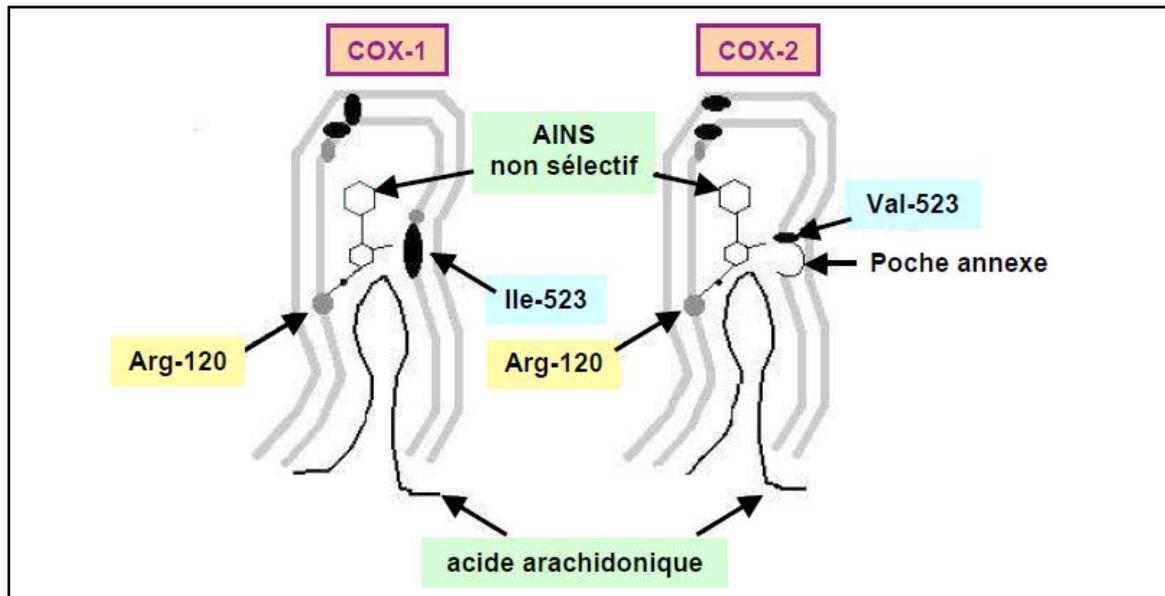


Figure 10. Représentation schématique de l'inhibition des cyclo-oxygénases par un anti-inflammatoire non stéroïdien non sélectif (Jouzeau *et al.*, 2004)

D'autre part, les AINS inhibant préférentiellement ou sélectivement la COX-2, comme la famille des *coxibs*, pénètrent également dans le site actif mais ne réagissent pas avec l'Arg-120. Dans le canal de COX-2, les *coxibs* se lient à une poche latérale grâce à leur groupement phénylesulfonamide, de manière lente, irréversible et temps-dépendante, empêchant l'AR d'entrer dans le tunnel. Cette poche annexe est inexistante dans le site catalytique de COX-1, puisqu'en position 523 se trouve un résidu isoleucine, plus volumineux que le résidu valine présent à la même position dans COX-2, et donc occupant tout l'espace (Vane *et al.*, 1998).

Certains AINS possèdent des propriétés anti-inflammatoires qui ne sont pas directement liées à l'inhibition des COX (Tegeder *et al.*, 2001; Süleyman *et al.*, 2007). Ces effets impliquent le plus souvent l'inhibition des facteurs de transcription tels que le NF- κ B. Cette inhibition peut être la conséquence d'une interaction directe avec les facteurs de transcription, ou plutôt, d'une altération de l'activité des protéines kinases.

Il est récemment suggéré que la stimulation des PPARs puisse jouer un rôle dans le mécanisme d'action des AINS (Tegeder *et al.*, 2001; Süleyman *et al.*, 2007). Les PPARs constituent un ensemble de récepteurs nucléaires. Ils sont activés par des ligands naturels, tels que les acides gras et les eicosanoïdes. L'activation des PPARs inhibe la transcription de certains gènes cibles, soit directement par la liaison avec leurs sites promoteurs, soit indirectement en freinant autres voies de facteurs transcriptionnels. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme des lipides, la différenciation cellulaire, l'homéostasie du glucose et surtout l'activation de certaines réponses inflammatoires (Jouzeau *et al.*, 2004).

B. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les anti-inflammatoires stéroïdiens constituent une large famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH sécrétée par l'adénohypophyse. Dans les tissus cibles, les glucocorticoïdes se fixent à leurs récepteurs des glucocorticoïdes ($GR\alpha$) du cytoplasme de la cellule. Une fois le complexe récepteur-ligand formé pénètre dans le noyau cellulaire où il se fixe à de nombreux éléments de réponse aux glucocorticoïdes dans la région du promoteur des gènes-cibles. Le récepteur, ainsi fixé à la molécule d'ADN interagit avec les facteurs de transcription basiques, provoquant une augmentation de l'expression génique de gènes-cibles spécifiques (Sibilia, 2003) (Figure 11).

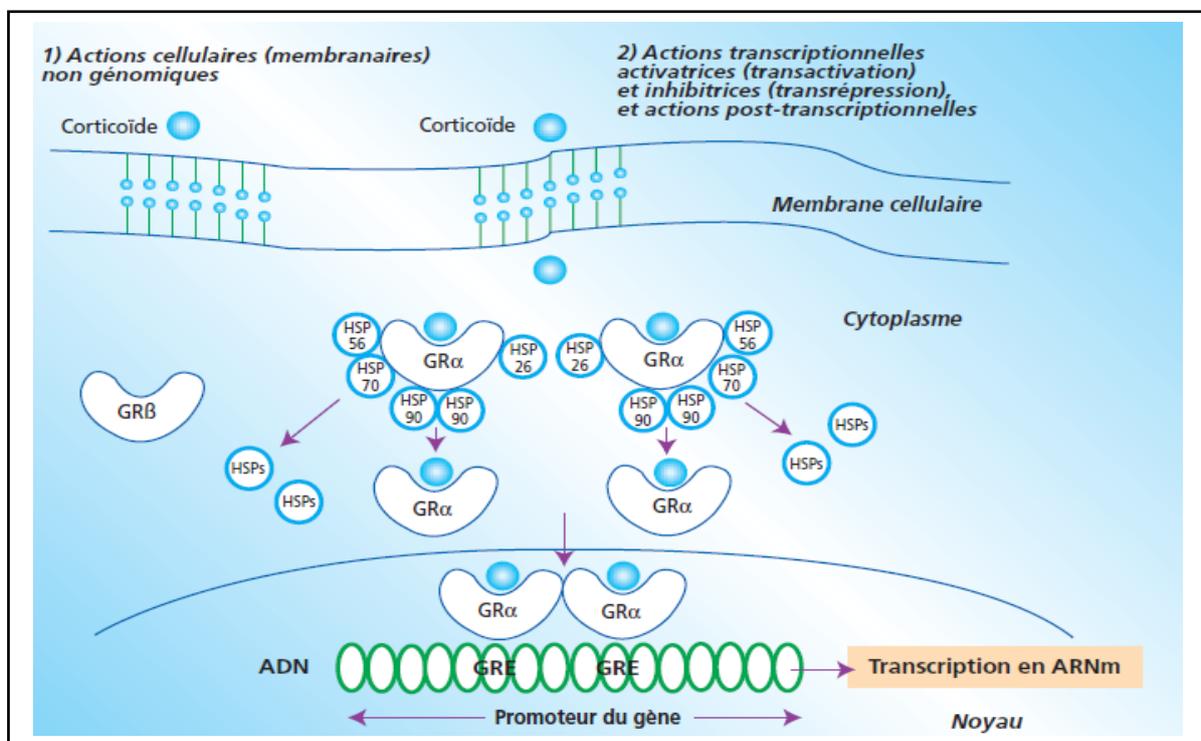


Figure 11. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Sibilia, 2003)

- * Les corticoïdes interagissent avec la membrane cellulaire (1) ou pénètrent dans le cytoplasme (2). * Dans le cytoplasme, ils se fixent sur des récepteurs cytosoliques spécifiques ($GR\alpha$), ce qui provoque la libération des «chaperonines» (HSP 90, 70, 56 et 26) de ces récepteurs. * Le couple $GR\alpha$ -corticoïdes ainsi libéré pénètre dans le noyau, où il va agir sur la transcription des gènes. Pour cela, il va :
- soit se fixer sous forme de dimère sur des séquences spécifiques de l'ADN présentes dans le promoteur de différents gènes (séquence GRE), cette fixation se traduit par une transactivation ou une transrépression des gènes ;
 - soit interférer de différentes façons avec les facteurs de transcription (FT) ou le complexe de transcription, cette fixation se traduit par une transrépression des gènes.

Les complexes GR-corticoïdes, fixés sur les séquences GRE (*glucocorticoid-response elements*), sont capables d'interagir avec différentes protéines intervenant dans les phénomènes de transcription. Les principaux cofacteurs sont la protéine CBP (*cyclic AMP response element binding protein*) et la protéine P300. Ce complexe transcriptionnel comprend aussi d'autres protéines, comme la GRIP-1 (*GR interacting protein 1*), le SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), le PCAF (*P300/CBP associated factor*) et la HDAC (histone déacétylase). Les principales actions exercées par ces protéines sont une acétylation / déacétylation des résidus lysines des histones de la chromatine. L'acétylation, qui s'exerce essentiellement par le biais des protéines CBP, P300, PCAF et SRC-1, permet le déroulement de l'ADN chromosomique. La chromatine ainsi « débobinée » va être capable de fixer différents facteurs de transcription (NF- κ B) nécessaires à l'activation de l'ARN-polymérase 2, enzyme clé de la transcription. Inversement, les éléments qui permettent la déacétylation (HDAC) entraînent une condensation de la chromatine qui va inhiber les phénomènes de transcription (Sibilia, 2003).

I. 4. 4. Marqueurs biologiques de l'inflammation

A. Vitesse de sédimentation (Vs)

C'est un examen de laboratoire qui consiste à laisser sédimenter les hématies dans un tube vertical. On mesure la distance parcourue pendant 1 heure (parfois également 2 heures). La méthode de référence est la méthode de Westergreen (Borghini *et al.*, 2013). La sédimentation des globules rouges est dépendante des caractéristiques morphologiques des hématies mais aussi des charges électrostatiques négatives qu'ils possèdent à leur surface. L'augmentation de certaines protéines de l'inflammation, dont le fibrinogène, inhibe ces charges négatives, favorise l'agrégation des hématies entre elles et augmente leur vitesse de sédimentation. La VS est un examen simple, peu coûteux, reproductible mais très peu spécifique. Il permet de détecter une anomalie des immunoglobulines (hyper-gammaglobulinémie, gammopathie monoclonale) (Borghini *et al.*, 2013).

B. Protéine C réactive (CRP)

Elle a été découverte en 1930, lors de la phase aiguë d'une infection à pneumocoques, car elle réagissait avec le polysaccharide C du pneumocoque, d'où son nom «C-reactive protein». C'est une glycoprotéine qui reflète l'inflammation aiguë. Elle s'élève très rapidement et est, de ce fait, un marqueur précoce de la réaction inflammatoire. La CRP est une protéine synthétisée par les hépatocytes, son rôle est de mobiliser les défenses immunitaires de l'organisme par l'activation de la voie classique du complément (Borghini *et al.*, 2013).

I. 4. 5. Méthodes d'étude de l'activité anti-inflammatoire (Cohen, 1986)

A. Perméabilité capillaire chez le lapin

On met en évidence une exsudation plasmatique par l'injection intraveineuse de bleu de Trypan ou de bleue Evans qui se lie aux protéines plasmatiques. L'étendue de la diffusion du bleu dans la substance fondamentale est réduite en présence d'anti-inflammatoires.

B. Œdème de la patte du rat

L'exsudation est évaluée par le gonflement de la patte postérieure du rat après injection intra articulaire d'un agent phlogogène comme la carraghénine (Cohen, 1986).

On mesure le diamètre de l'articulation tibiotarsienne à l'aide d'un pied à coulisse, on estime le volume dans un pléthysmomètre imaginé par Chevillard et Giono, ou l'on pèse la patte sélectionnée à l'articulation. La deuxième phase de l'inflammation est explorée par cet essai.

C. Granulome à la carraghénine chez le rat

Elle consiste à insérer dans le tissu cellulaire sous-cutané contre la cage thoracique une petite boule de coton imprégnée de carraghénine et à peser le tissu de prolifération au bout de sept jours. Les corticoïdes sont très actifs sur ce test (Cohen, 1986).

D. Arthrite à l'adjuvant de Freund

Une réaction œdémateuse se développe immédiatement (inflammation primaire) après injection intra articulaire dans la patte postérieure du rat d'adjuvant de Freund (suspension de bacilles tuberculeux tués ou émulsion de cire D de bacille tuberculeux). En deux ou trois semaines apparaissent à distance, sur la patte postérieure contra latérale, sur les pattes antérieures, à la queue, aux oreilles, une réaction inflammatoire avec gonflement, rougeur, échauffement et douleur (inflammation secondaire). Les anti-inflammatoires administrés pendant l'essai empêchant la réaction primaire et la réaction secondaire (Cohen, 1986).

E. Inflammation locale de l'oreille du rat

L'inflammation de l'oreille du rat, provoquée par l'application locale d'huile de croton peut être réduite par l'application de substances anti-inflammatoires (Cohen, 1986).

I. 5. Activité analgésique

I. 5. 1. Notion de physiologie : la douleur

La douleur est une sensation désagréable qui prend naissance par stimulation des terminaisons nerveuses suivie de leur intégration psychique, c'est une douleur nociceptive qui peut être superficielle (cutanée, somatique) consciente ou parfaitement localisée ou profonde (viscérale) mettant en cause le système nerveux autonome (Aouissa, 2002).

I. 5. 2. Activation des nocicepteurs

Il peut s'agir d'activation directe (mécanique, chimique, thermique) ou d'activation par des substances chimiques (ions H^+ , K^+ , histamine, sérotonine, bradykinine, leucotrien, prostaglandines,...). Les fibres nociceptives rejoignent la moelle par les racines dorsales puis, par les voies ascendantes médullaires, le message douloureux est transmis aux centres supérieurs. Le trajet de l'influx douloureux emprunte 3 neurones :

- * Le protoneurone conduit l'influx des nocicepteurs jusqu'à la corne postérieure de la moelle.
- * La deutoneurone assure la transmission spinothalamique (voies ascendantes médullaires)
- * Le troisième neurone assure la transmission thalamocorticale (**Aouissa, 2002**).

I. 5. 3. Les antalgiques

Les antalgiques sont des médicaments de la douleur utilisés dans le but de diminuer les sensations douloureuses. Ils sont généralement répartis en deux classes :

- * Les analgésiques morphiniques ou narcotiques ou centraux atténuent ou suppriment la douleur d'une façon globale et leur point d'impact est central (thalamique et cortical).
- * Les analgésiques non morphiniques (**Aouissa, 2002**).

A. Les analgésiques morphiniques

La morphine est le principal alcaloïde de l'opium. L'analgésie morphinique est sélective. Elle supprime les sensations douloureuses, sans altérer les autres sensations en préservant l'état de conscience. La durée et l'intensité de l'analgésie sont en rapport direct avec la voie d'administration, la sensibilité individuelle et la dose (au delà d'un seuil les effets toxiques sont majorés). La morphine soulage les douleurs sourdes (fractures), les douleurs viscérales et les douleurs aiguës (**Aouissa, 2002**).

B. Les analgésiques non morphiniques

Les analgésiques non morphiniques sont soit seulement sédatifs de la douleur (antalgiques purs), soit à la fois antalgiques et antipyrétique ou anti-inflammatoire.

Ces médicaments ont une action analgésique beaucoup moins forte que celle des analgésiques centraux comme la morphine. Leurs effets analgésiques se manifestent dans les douleurs peu intenses (céphalées, arthralgie, maux de dents...).

Certains sont antipyrétiques car normalisent une température élevée, en agissant sur le centre de la thermorégulation (**Aouissa, 2002**). L'analgésique antipyrétique et anti-inflammatoire le plus usuel est l'acide acétylsalicylique (Aspirine). Son action antalgique périphérique est due à une inhibition de la synthèse des prostaglandines. En effet ces dernières sensibilisent les terminaisons nerveuses aux stimuli allogènes comme la bradykinine.

I. 6. Diabète sucré : un syndrome métabolique

I. 6. 1. Définition

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie). Le dépistage du diabète est réalisé grâce à une prise de sang à jeun. On parle de diabète lorsque la concentration de glucose à jeun dans le sang veineux est supérieure à 1,26 g/l. Au cours de son évolution, le diabète peut engendrer de nombreuses complications touchant le cœur, les reins ou les yeux (Boyer, 2016).

I. 6. 2. Différents types de diabète

A. Diabète de type 1

Le diabète de type 1, encore connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID), est caractérisé par une absence ou une trop faible production d'insuline par les cellules du pancréas (Figure 12). C'est une maladie qui apparaît le plus souvent durant l'enfance ou l'adolescence. C'est une maladie auto-immune au cours de laquelle les défenses de l'organisme, en particulier des anticorps produit par des lymphocytes, détruisent les cellules bêta du pancréas, d'où l'incapacité de l'individu atteint à sécréter de l'insuline (Boyer, 2016).

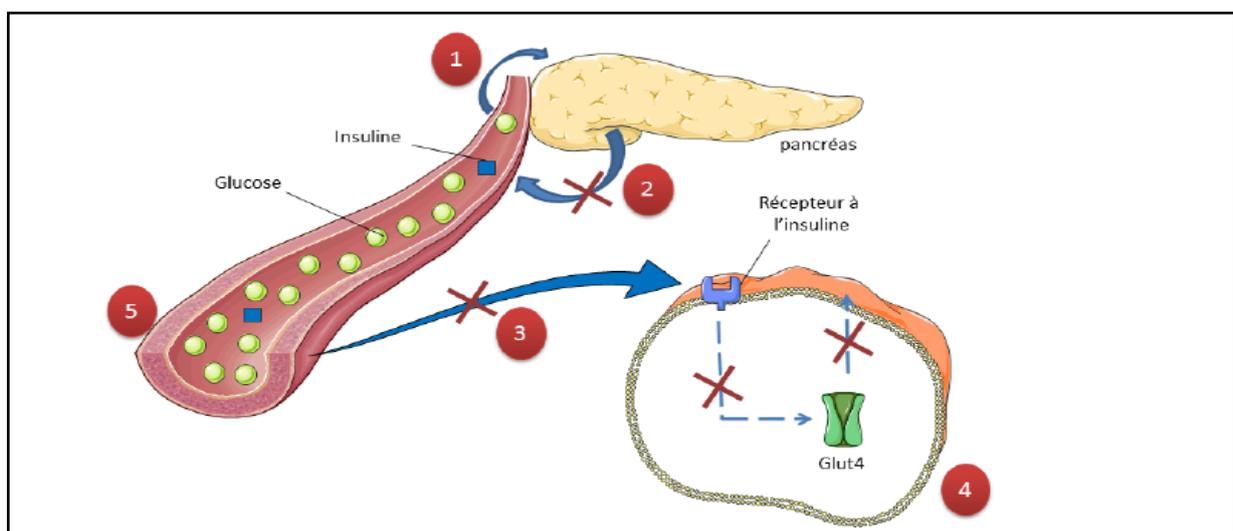


Figure 12. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 1 (Boyer, 2016). 1) La présence de glucose va stimuler les cellules du pancréas pour libérer de l'insuline. 2) Les cellules β du pancréas ne produisent pas ou très peu d'insuline. 3 et 4) Défaut de transduction du signal induit par l'insuline et défaut de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) ce qui conduit à un défaut de la captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie. 5) Hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang.

B. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID) est caractérisé par un défaut d'action de l'insuline (insulino-résistance) qui peut évoluer vers une insulino-pénie, c'est-à-dire une trop faible production d'insuline par le pancréas, dû à un épuisement des cellules sécrétrice d'insuline. Il en résulte une hyperglycémie chronique (Figure 13). C'est la forme la plus fréquente du diabète (90% des cas de diabète traités) (Boyer, 2016).

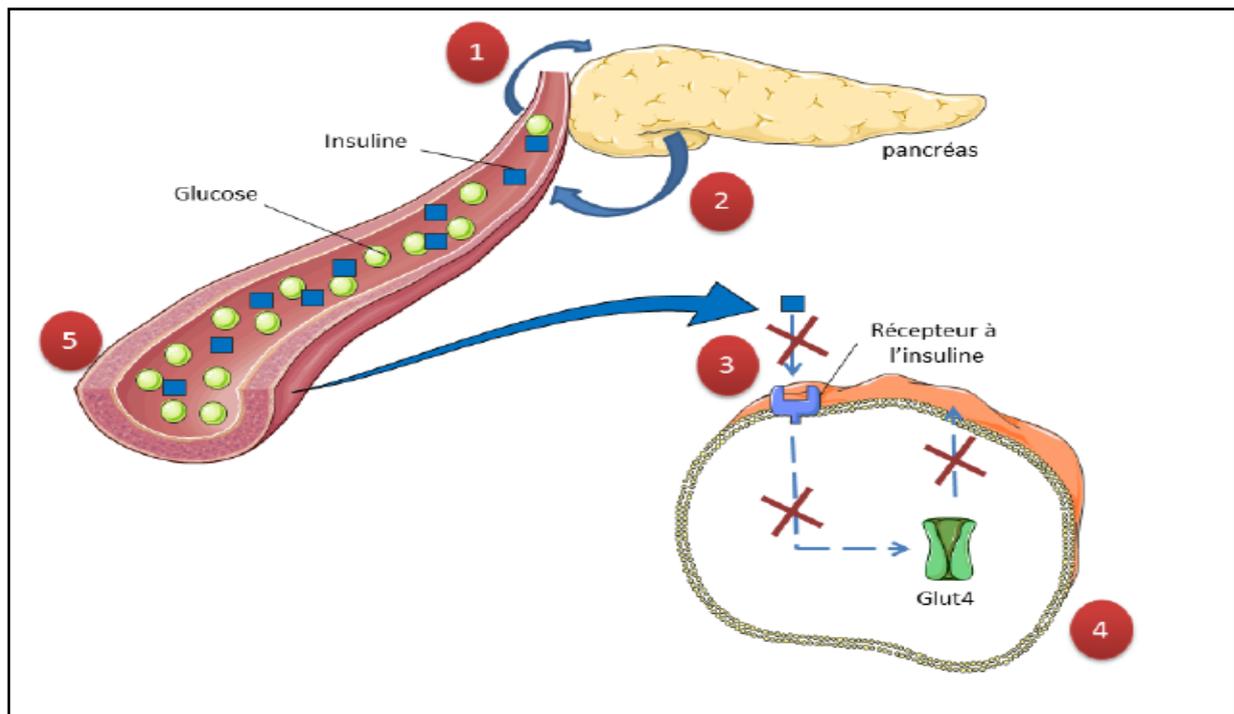


Figure 13. Mécanisme de dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose dans le diabète de type 2 (Boyer, 2016)

- 1) La présence de glucose va stimuler les cellules du pancréas pour libérer de l'insuline.
- 2) Production d'insuline par les cellules β -pancréatiques.
- 3 et 4) L'insuline ne fonctionne pas correctement et on a une défaillance de la transduction du signal induit par l'insuline et un défaut de la translocation du transporteur de glucose ($GLUT_4$) ce qui conduit à une mauvaise captation du glucose par les cellules musculaire lisses, les adipocytes ou le foie.
- 5) Hyperglycémie résultant d'une accumulation de glucose dans le sang.

Les causes du diabète du type 2 sont multiples. Il existe en effet plusieurs facteurs de risque responsables de l'apparition du diabète de type 2 : l'obésité, l'inactivité physique, une alimentation mal équilibrée,... En effet, 70% des personnes atteintes de diabète de type 2 sont obèses et l'obésité elle-même peut causer ou aggraver l'insulino-résistance (Boyer, 2016).

I. 6. 3. Traitement du diabète sucré

Le traitement du diabète sucré dépend du type du diabète et du degré du déficit en insuline. Pour le traitement du DID, l'insuline reste le moyen le plus efficace disponible à fin d'obtenir une glycémie normale bien régulée. Le rôle de l'insuline administrée au malade d'une façon strictement contrôlée, consiste à remplacer l'insuline propre à l'organisme, les principaux effets attendus sur l'homéostasie du métabolisme sont; une stimulation de l'utilisation périphérique du glucose et l'activation de la glycogénèse, de la glycolyse, de la lipogenèse et de la synthèse protéique (Oyagbemi *et al.*, 2014).

Le DNID, peut être contrôlé dans les stades précoces de la maladie par un régime alimentaire et une activité physique, mais si la glycémie normale n'est pas atteinte, une prescription d'antidiabétiques oraux s'avère obligatoire (Boyer, 2016). Les antidiabétiques oraux disponibles pour le traitement du DNID, peuvent être classés en cinq classes pharmacologiques. Les sulfonylurées, les biguanides, les inhibiteurs de α -glucosidases et les thiazolidinediones. A souligner aussi le développement de nouveaux insulinosécrétagogues, les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs du DDP-4 (Oyagbemi *et al.*, 2014). Les principaux points de différence entre ces classes pharmacologiques sont : le mécanisme d'action, la toxicité et les effets secondaires (Tableau 2).

Tableau 2. Les principaux agents antidiabétiques oraux utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (Oyagbemi *et al.*, 2014)

Agents antidiabétiques	Exemples	Mode d'action	Effets secondaires
Les sulfonylurées	Glibenclamide Gliburide	Augmentation de la sécrétion pancréatique de l'insuline.	Hypoglycémie Prise de poids
Les biguanides	Metformine	Inhibition de la production hépatique du glucose.	Acidose lactique, Nausées
Les inhibiteurs des α -glucosidases	Acarbose	Inhibition de l'absorption intestinale du glucose.	Troubles Gastro-intestinaux, Diarrhé
Les thiazolidinediones	Rosiglitazone	Amélioration de l'action de l'insuline via l'activation des PPAR- γ .	Hépatotoxique

Biologie des plantes sélectionnées

II. Biologie des plantes sélectionnées

II. 1. Description botanique de *Marrubium vulgare*

II. 1. 1. Taxonomie

Le genre *Marrubium* comporte 97 espèces, parmi lesquelles on peut citer : *M. globosum*, *M. peregrinum*, *M. velutinum*, *M. parviflorum*, *M. deserti* et *M. vulgare*. Cette dernière espèce appartient à l'ordre des Lamiales, qui font partie des Angiospermes (plante à fleurs) Phanérogames (plante à graines) dicotylédones (**Hennebelle et al., 2007**). La classification systématique de la plante *M. vulgare* se fait comme indique le Tableau 3.

Tableau 3. Données taxonomiques (**Bonnet, 2012**)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae (Labiatae)
Genre	<i>Marrubium</i>
Nom binominal	<i>Marrubium vulgare</i> L.
Nom commun	Marrube Blanc ou White Horehound

II. 1. 2. Morphologie de *Marrubium vulgare*

C'est une plante herbacée pérenne de couleur grisonnante qui peut atteindre 25 à 60 cm de hauteur et qui présente une légère ressemblance avec la menthe. Les tiges carrées sont simples ou ramifiées, droites ou légèrement couchées à la base, blanches et cotonneuses (**Bouterfas et al., 2013**). Les feuilles duveteuses sont opposées, pétiolées, ovales-arrondies, bordées de dents inégales, ridées et vert blanchâtre. C'est une plante à reproduction entomophile (**Bonnet, 2012**). *Marrubium vulgare* fleurit à partir d'avril à octobre (**Kearney et Peebles, 1960; Parker, 1972**). Elle fleurit généralement tôt au printemps, aisément foragée par des abeilles pour le nectar (**Stritzke, 1975; Weiss et al., 2000**).

Les fleurs sont petites et blanches (1,2-1,5 cm de long) réunies en glomérules compacts espacées sur la tige, corolle à deux lèvres, l'inférieure trilobée, la supérieure à deux lobes. Calice à dix dents courtes. Quatre étamines sont cachées dans le tube de la corolle. Fruits : quatre petits akènes cachés à la base du calice persistant. Ils sont lisses et glabres et mûrissent en automne. En ce qui concerne la partie souterraine, *M. vulgare* possède gros rhizome qui se dresse jusqu'à 6 à 8 dm (Figure 14) (Schlempher *et al.*, 1996; Boullard, 2001).

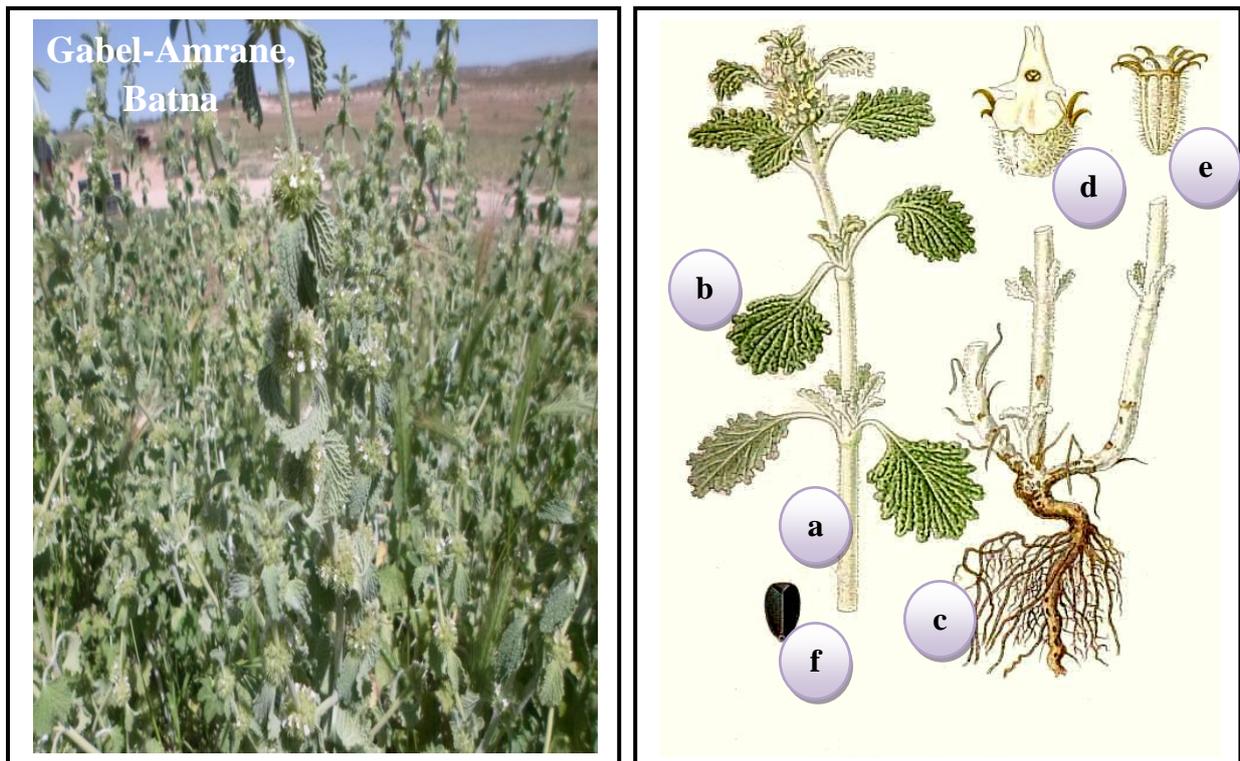


Figure 14. La plante *Marrubium vulgare* (Boullard, 2001).

a. Tige ; b. Feuille ; c. Racine (partie souterraine) ; d. Fleur ; e. Calice ; f. Graine.

II. 1. 3. Localisation géographique

Cette espèce se trouve dans toute l'Europe, surtout la région Méditerranéenne, Afrique du nord, Asie occidentale et dans quelques pays d'Amérique Latine particulièrement au Mexique et au Brésil. *M. vulgare* pousse à l'état sauvage principalement le long des routes, dans des lieux incultes, décombres, terrains vagues, prairies chaudes et sèches, en général sur sols calcaires (Boullard, 2001; Aouadhi *et al.*, 2013; Bouterfas *et al.*, 2016).

En Algérie, il existe sept espèces dont deux sont très fréquentes : *Marrubium vulgare* appelée marrube blanc, répandue au nord du pays, à l'est Algérien est appelée "El marioua" et *Marrubium deserti* ou marrube du désert très présente au Sahara et dans les hautes plaines steppiques utilisée surtout dans la région de Ghardaïa et Ouargla contre les piqûres des scorpions. Elle est nommée localement « *Djaada* » (Zaabat *et al.*, 2010; Zaabat *et al.*, 2011).

II. 1. 4. Utilisation traditionnelle de *Marrubium vulgare*

M. vulgare est une plante médicinale utilisée dans plusieurs pays pour le traitement d'une variété de maladies, y compris les troubles inflammatoires (dermatite, otite) et gastroentérique dans le cas de l'ulcère (Balmé, 1982; Salinas *et al.*, 2005; Yousefi *et al.*, 2014). Elle est recommandée comme antispasmodique, insecticide et vermifuge en détruisant les vers intestinaux (Newal *et al.*, 1996; De Souza *et al.*, 1998; Pavela, 2004; Stulzer *et al.*, 2006).

M. vulgare est utilisée également dans le traitement des maladies neurodégénératives y compris la maladie d'Alzheimer par son effet inhibiteur sur la cholinestérase en augmentant la fonction cholinergique centrale (Orhan *et al.*, 2010). Marrube blanc est surtout antitussif connu comme un remède contre la toux, présents dans le sirop (par exemple Ricola®) et préparations de thé. Le marrube blanc est antiseptique, une infusion utilisée comme un lavage ou une préparation de pommade, marrube est utile pour désinfecter les plaies (Karryev *et al.*, 1976; Pukalskas *et al.*, 2012; Yousefi *et al.*, 2013; Bouterfas *et al.*, 2016).

Il est utilisé comme stimulant général de l'appétit et de la digestion, une infusion à froid acte comme un tonique amer, il est utilisé pour combattre les états fébriles des enfants en abaissant la fièvre et pour traiter les maladies du foie et surtout les affections hépatobiliaires, en augmentant la sécrétion de la bile d'où l'action cholérétique (Ahmed *et al.*, 2008; Zaabat *et al.*, 2010). Le marrube blanc fluidifie les sécrétions bronchiques et facilite l'expectoration. La présence de mucilages anti-inflammatoires le rend utile dans le traitement des inflammations de la gorge. C'est un dilatateur des bronches, donc il a une action bénéfique sur l'asthme (Bouterfas *et al.*, 2016). Il a été utilisé pour le traitement de l'ictère (la jaunisse), la fièvre typhoïde (Boullard, 2001) et est employé pour favoriser la perte de poids en augmentant le métabolisme des graisses (diminution des triglycérides et du cholestérol). En Algérie, la décoction d'El marioua est employée comme antidiabétique, seule ou associée à d'autres plantes médicinales, elle est prescrite aussi comme antithyroïdien, anti-inflammatoire, antipyrétique et anti-diarrhéique (Boudjelal *et al.*, 2012; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014; Bouterfas *et al.*, 2014).

II. 1. 5. Composition biochimique de *Marrubium vulgare*

A. Flavonoïdes de *Marrubium vulgare*

La plupart des flavonoïdes de *M. vulgare* sont isolés à partir des feuilles en utilisant des solvants polaires comme l'éthanol et le *n*-Butanol. Ce sont généralement des hétérosides flavoniques et flavonoliques du quercétol, de la lutéoline et de l'apigénine (Figure 15), lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique (Nawwar *et al.*, 1989; Wolski *et al.*, 2007).

Alkhatib *et al.* (2010); Pukalskas *et al.* (2012); Boudjelal *et al.* (2012) ont pu isoler un nouveau flavonoïde à partir des sommités fleuries de *M. vulgare* : "ladanéine" qui a été identifiée comme : (5,6-dihydroxy-7-4'-diméthoxyflavone). Ce composé possède une activité anti-leucémique importante (Alkhatib *et al.*, 2010).

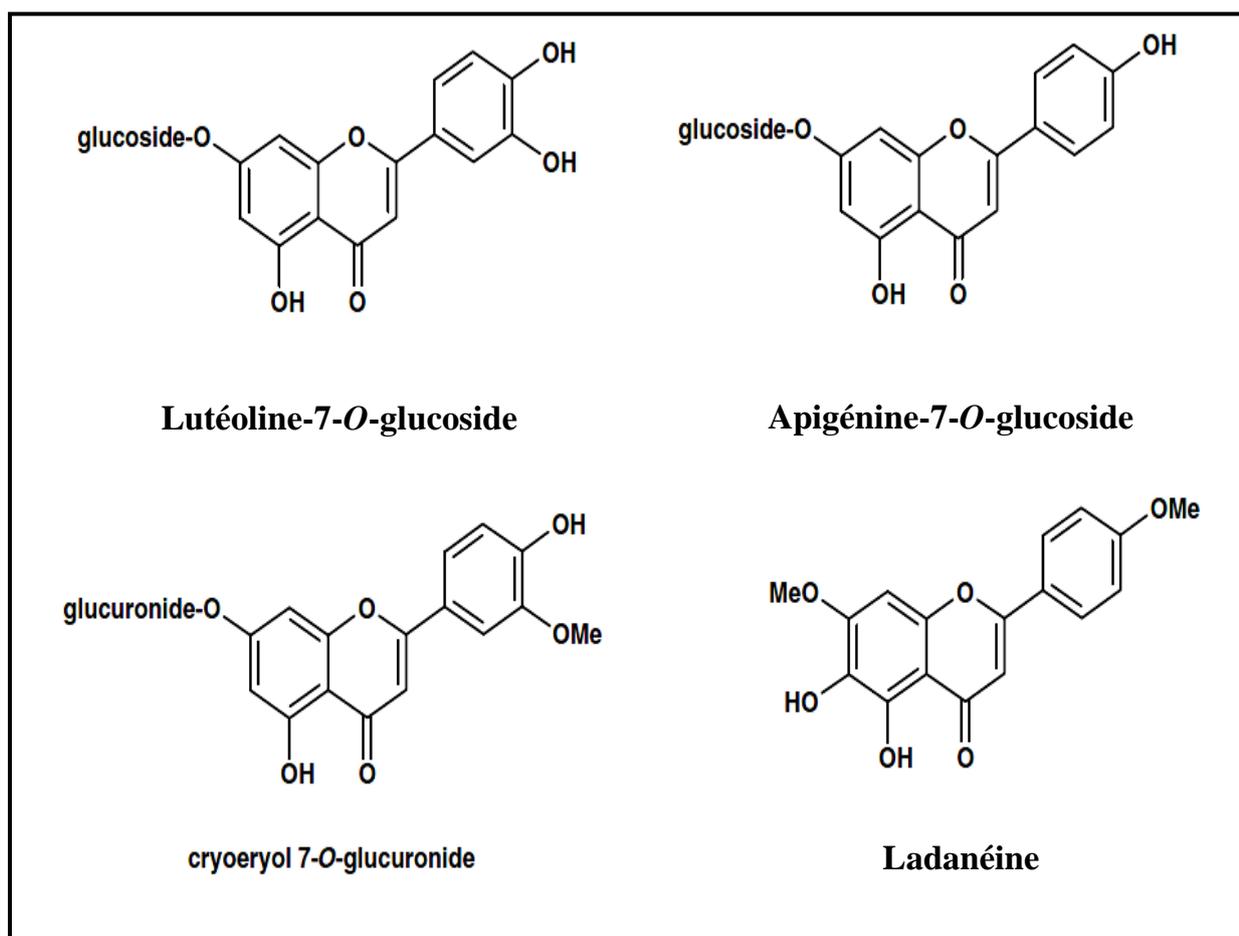


Figure 15. Structure de quelques flavonoïdes isolés de *M. vulgare*

(Boudjelal *et al.*, 2012 ; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014).

B. Lactones diterpéniques labdaniques et autres composés

Marrubium vulgare L est une plante riche en principes actifs dont les principales structures moléculaires sont représentées dans la figure 16 :

- **Lactones diterpéniques labdaniques** : prémarrubiine, marrubiine, marrubénol, marrubiol, acide marrubique, marrulibacétal A, geshoidine et deacétyl-forskoline (Stulzer *et al.*, 2006 ; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014 ; Yousefi *et al.*, 2014).
- **Phénylpropanoïdes glycosides** : marruboside, verbascoside, forsythoside B, arénarioside et ballotétroside (Sahpaz *et al.*, 2002a ; Sahpaz *et al.*, 2002b).
- **Tanins spécifiques des Lamiacées**, dérivés de l'acide hydroxycinnamique : acide caféique, acide chlorogénique, acide *p*-comarique (Wojdylo *et al.*, 2007).
- **Huiles essentielles** : limonène, sabinène, α -pinène, camphène, para-cymène,...

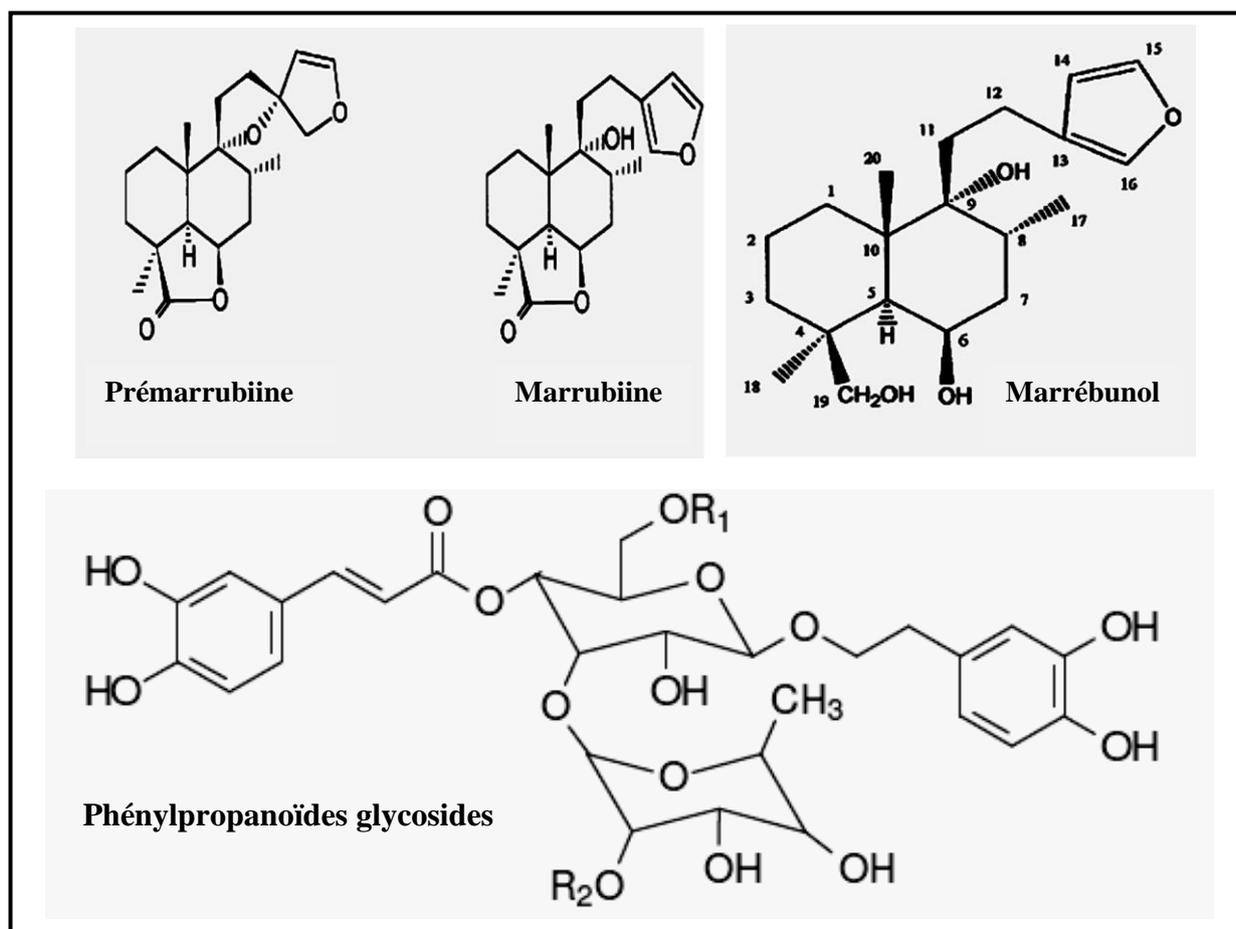


Figure 16. Principales structures moléculaires présentes chez *M. vulgare* L

(Stulzer *et al.*, 2006 ; Boudjelal *et al.*, 2012 ; Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014).

Des travaux très récents permettent d'identifier ses différents constituants actifs de *M. vulgare* et leurs fonctions (Tableau 4).

Tableau 4. Effets biologiques des biomolécules de *Marrubium vulgare*.

Biomolécules	Fonctions	Références
Diterpènes labdanes (marrubiine, marrubénol)	Antispasmodique, anti-inflammatoire Cholérétique, anti-hypertensive	(El-Bardai <i>et al.</i> , 2004 ; Stulzer <i>et al.</i> , 2006 ; Yousefi <i>et al.</i> , 2014).
Acides phénoliques, phényléthanoides (marruboside)	Antioxydants, anti-inflammatoire, Antimicrobienne, Anticancéreuse	(Berrougui <i>et al.</i> , 2006; Ahmed <i>et al.</i> , 2008 ; Xue et yang, 2016).
Flavonoïdes	Antioxydants, anti-inflammatoire, Analgésique, antidiabétique, antibactérienne	(Elberry <i>et al.</i> , 2015; Yousefi <i>et al.</i> , 2014 ; Bouterfas <i>et al.</i> , 2016).
Huiles essentielles (Eugénol)	Antioxydants, anti-cholinestérase, antibactérienne	(Orhan <i>et al.</i> , 2010 ; Kadri <i>et al.</i> , 2011 ; Bokaeian <i>et al.</i> , 2014).

II. 1. 6. Propriétés pharmacobiologiques de *Marrubium vulgare*

A. Effet antihypertenseur: par effet antagoniste calcique, provoque une relaxation artérielle identique à celle de l'amlodipine et supérieure à celle de l'adrénaline (marrubénol), entraîne une correction du dysfonctionnement endothélial dû à l'hypertension, inhibition de la contraction de l'aorte induite par le potassium (marrubiine et marrubénol) (El Bardai *et al.*, 2001, El-Bardai *et al.*, 2003a, 2003b; El-Bardai *et al.*, 2004).

B. Effet anti-cholinestérase : des extraits éthanoliques et acétoniques de six plantes ont été examinés pour évaluer leur activité inhibitrice d'acétylcholinestérase et de butyrylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique d'Ellman. L'extrait de l'acétone de *M. vulgare* a montré une inhibition significative (76.30 ± 0.18 % à 100 $\mu\text{g/ml}$) pour l'acétylcholinestérase et (83.51 ± 1.27 % à 50 $\mu\text{g/ml}$) pour le butyrylcholinestérase. Ces deux enzymes sont inhibées par les huiles essentielles de Marrube blanc (Orhan *et al.*, 2010).

II. 2. Etude chimique et biologique d'autres espèces du genre *Marrubium* : exemple de *Marrubium deserti* de Noé

II. 2. 1. Localisation géographique

Marrubium deserti de Noé est une espèce endémique en milieu désertique, occupe la totalité du Sahara centrale, répandue beaucoup plus dans les wilayas de Ghardaïa : Sebseb, Ouargla, El-Goléa et Bechar : Daya-Mogheul (Figure 17) (Chebrouk et Hadj Mahhamed, 2009; Dendougui *et al.*, 2011). Cette espèce pousse également au Sahara du Maroc (Bellakhdar, 1997) et dans les régions arides en Tunisie (Edziri *et al.*, 2012). Le nom Tamahaq (targuie) de *M. deserti* est *Telhert* (Hammiche et Maiza, 2006).

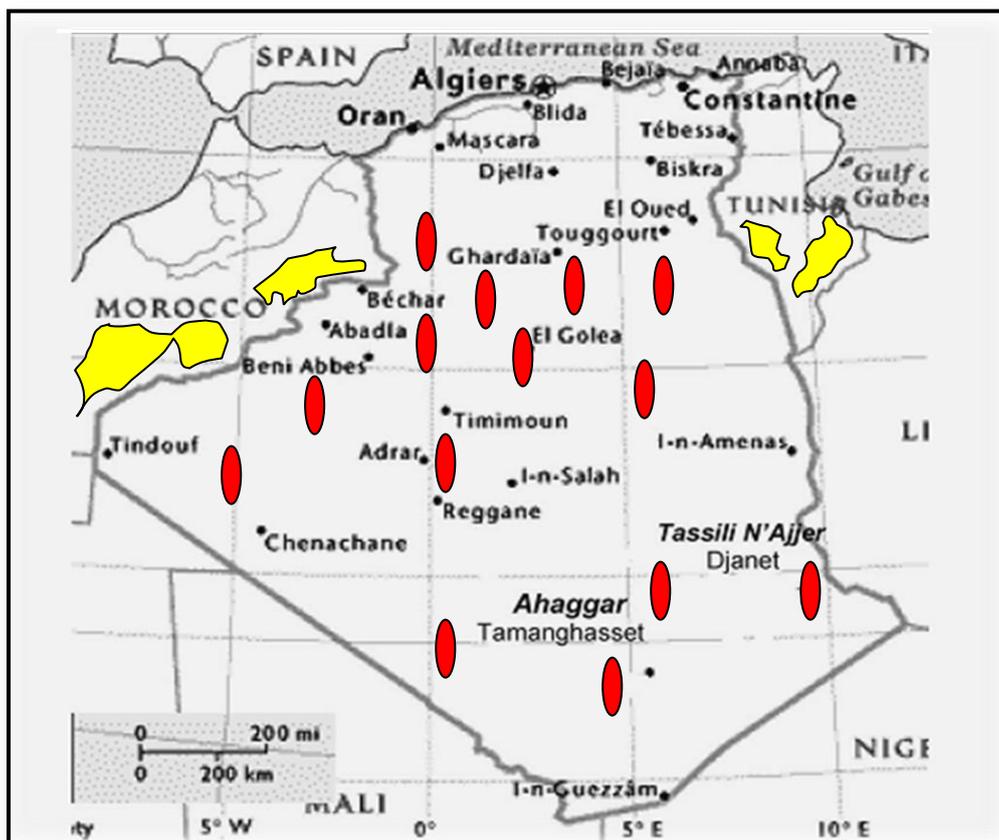


Figure 17. Carte représentant la distribution géographique de *M. deserti*

En Algérie (en rouge), en Tunisie et en Maroc (en jaune)

(Hammiche et Maiza, 2006)

II. 2. 2. Description morphologique de *Marrubium deserti* de Noé

C'est une plante avec une hauteur de 20 à 30 centimètre. Les tiges droites nombreuses couvertes de poils blancs donnent à la plante un aspect laineux. Les feuilles sont petites, opposées avec des nervures évidentes. Les fleurs roses dégageant une forte odeur et sont généralement réunies en glomérules compacts espacés sur la tige. Les pétales sont petits et de couleur violette pâle. Le calice est vert clair et le fruit est un tétra-akène typique du Labiaceae (Figure 18). Il fleurit au printemps entre Mars et Avril (**Bellakhdar, 1997; Hammiche et Maiza, 2006 ; Chebrouk et Hadj Mahhamed, 2009; Elkhalifa Chemsal et al., 2016**).



Figure 18. La plante *Marrubium deserti* (Zaabat et al., 2010).

II. 2. 3. Analyse phytochimique de *Marrubium deserti*

A partir de l'extrait dichlorométhanique des parties aériennes de *M. deserti*, **Zaabat et al. (2011)** ont pu isoler pour la première fois deux nouveaux diterpènes labdaniques : la désertine ($C_{22}H_{36}O_8$) et la marrulibacetal A ($C_{21}H_{32}O_7$), en plus d'autres diterpènes ont déjà été identifiés : cyllenine A et 15-épi-cyllenine A (**Karioti et al., 2005**), marrubiine (**Knöss et al., 1997**) et marrulactone (**Rigano et al., 2009**).

M. deserti est riche en flavonoïdes, **Zaabat et al. (2011)** ont pu isoler quatre hétérosides de l'apigénine : apigénine-7-*O*- β -neohesperidoside; apigénine-7-*O*-glucoside (la cosmosiine); la terniflorine : apigénine-7-*O*-6'-*E*-*p*-coumaroyl-glucoside et l'apigénine-7-*O*-glucuronide. Ces flavonoïdes ont été isolés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle et de *n*-butanol des parties aériennes de *M. deserti*. En plus, deux phénylpropanoïdes glycosylés ont été identifiés dans le même extrait : l'actéoside et le forsythoside B (**Li et al., 2005; cité par Zaabat et al., 2011**). La Figure 19 indique la liste et les principales structures moléculaires des composés identifiés. Les huiles essentielles du *M. deserti*, obtenues par hydrodistillation, ont été analysées par GC-MS. L'analyse a abouti à l'identification de 37 composés : 83,53% de l'huile essentielle est appartenant essentiellement à la classe des sesquiterpènes. Les composés majoritaires sont tétracosane (31,11%), 9-Méthyl-undec-1-ène (21,30%), δ -cadinène (12,20%) et germacrène D (11,90%) (**Chebrouk et Hadj Mahhamed, 2009 ; Elkhalfa Chemsal et al., 2016**).

II. 2. 4. Utilisation traditionnelle de *Marrubium deserti*

A l'état jeune, les feuilles et les petites tiges sont appréciées par les chèvres, les moutons et les chameaux, ce qui augmente la quantité de beurre dans le lait (**Quézel et Santa, 1963 ; Ozenda, 1991**). **Bellakhdar (1997)** a décrit l'utilisation des feuilles de *M. deserti* dans plusieurs recettes traditionnelles au Maroc pour guérir différents maux et maladies : colite, colique, la toux (sous forme d'infusion) et la fièvre.

Edziri et al. (2012) ont indiqué que les feuilles de *M. deserti* sont employées dans la médecine traditionnelle en Tunisie sous forme de décoction comme un remède pour l'asthme, le diabète et en tant que diurétique. Cette espèce est utilisée également pour le traitement des désordres digestifs, elle est en plus fébrifuge, vermifuge et antispasmodique (**Ould El Hadj et al., 2003 ; Hammiche et Maiza, 2006**). Récemment, **Elkhalfa Chemsal et al. (2016)**, ont montré que l'extrait méthanolique de *M. deserti* possède une faible activité vis-à-vis l'acétylcholinestérase et le butyrylcholinestérase.

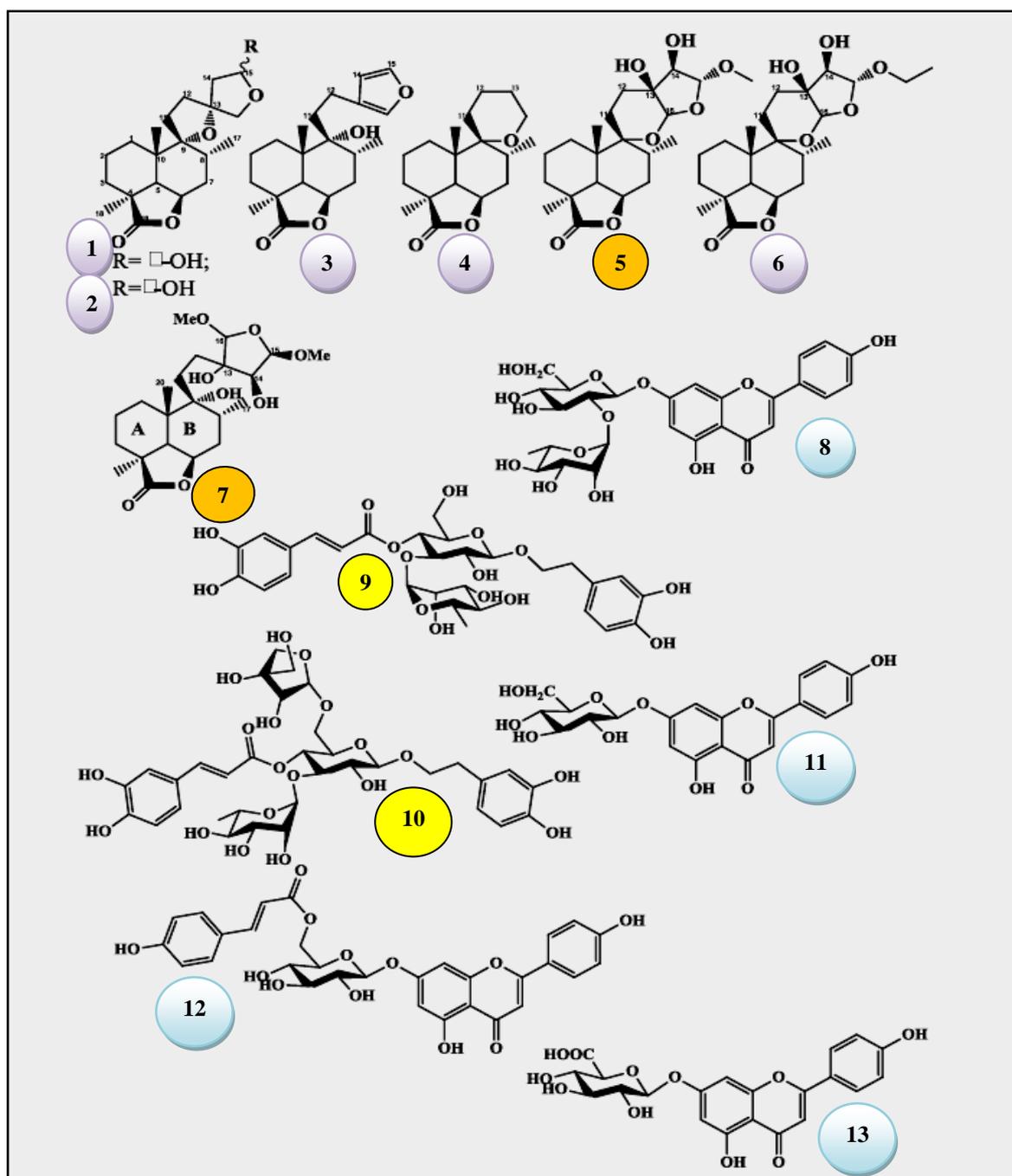


Figure 19. Structures moléculaires des principaux composés isolés de *Marrubium deserti*

(Zaabat *et al.*, 2011)

1. Cyllenine A; 2. 15-épi-cyllenine A; 3. Marrubiine; 4. Marrulactone; 5. Marrulibacétal A; 6. Marrulibacétal;
7. Désertine; 8. Apigénine-7-O-β-néohespéridoside; 9. Actéoside; 10. Forsythoside B; 11. Cosmosiine;
12. Terniflorine; 13. Apigénine-7-O-glucuronide.

Les molécules bioactives des plantes

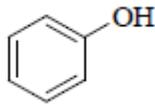
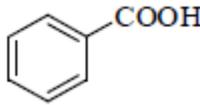
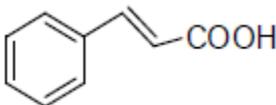
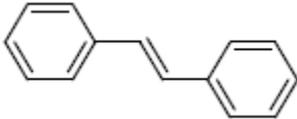
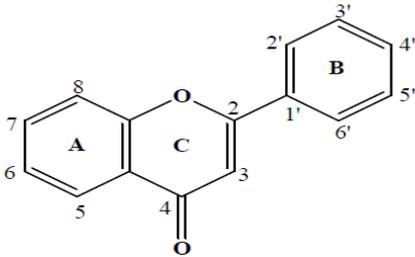


III. Les molécules bioactives des plantes

III. 1. Les polyphénols

Regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles. Il existe de nombreuses classes de polyphénols : acides phénoliques, stilbénoides, coumarines, flavonoïdes, tanins (Tableau 5). Ces structures peuvent être acylées, glycosylées, ce qui donne une grande variété de structures et de polarités. Leur origine biosynthétique est proche, tous dérivant de l'acide shikimique (Bruneton, 1999; Hennebelle, 2006).

Tableau 5. Principales classes des polyphénols (Bravo, 1998 ; Bruneton, 1999).

Squelette carboné	Classe	Structures de base	Exemple
C ₆	Phénols simples		Catéchol
C ₆ -C ₁	Acides hydroxy-benzoïques		- Acide gallique - Acide vanillique
C ₆ -C ₃	- Acides hydroxy-cinnamique - Coumarines		- Acide caféique - Scopolétine
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes		- Resvératrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes : - Flavonols - Flavanols - Flavanones - Anthocyanes		-Kaempférol } - Quercétine } - Catéchine - Naringénine - Cyanidine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	/	/
(C ₁₅) _n	Tanins	/	/

III. 1. 1. Les flavonoïdes

A. Classification

Les flavonoïdes sont des composés largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement dans l'alimentation. Ils sont retrouvés également dans les plantes médicinales. Ils possèdent un même squelette de base (Tableau 5), la 2-phényl chromone à quinze atomes de carbones, deux cycles en C₆ (A et B), reliés par un hétérocycle en C₃ (**Bruneton, 1999; Pietta et al., 2000**). Ils sont divisés en plusieurs classes qui incluent les flavones, flavonols, flavanones, flavanols, anthocyanidines, chalcones et aurones (Figure 20) (**Heim et al., 2002 ; Hendrich et al., 2006**).

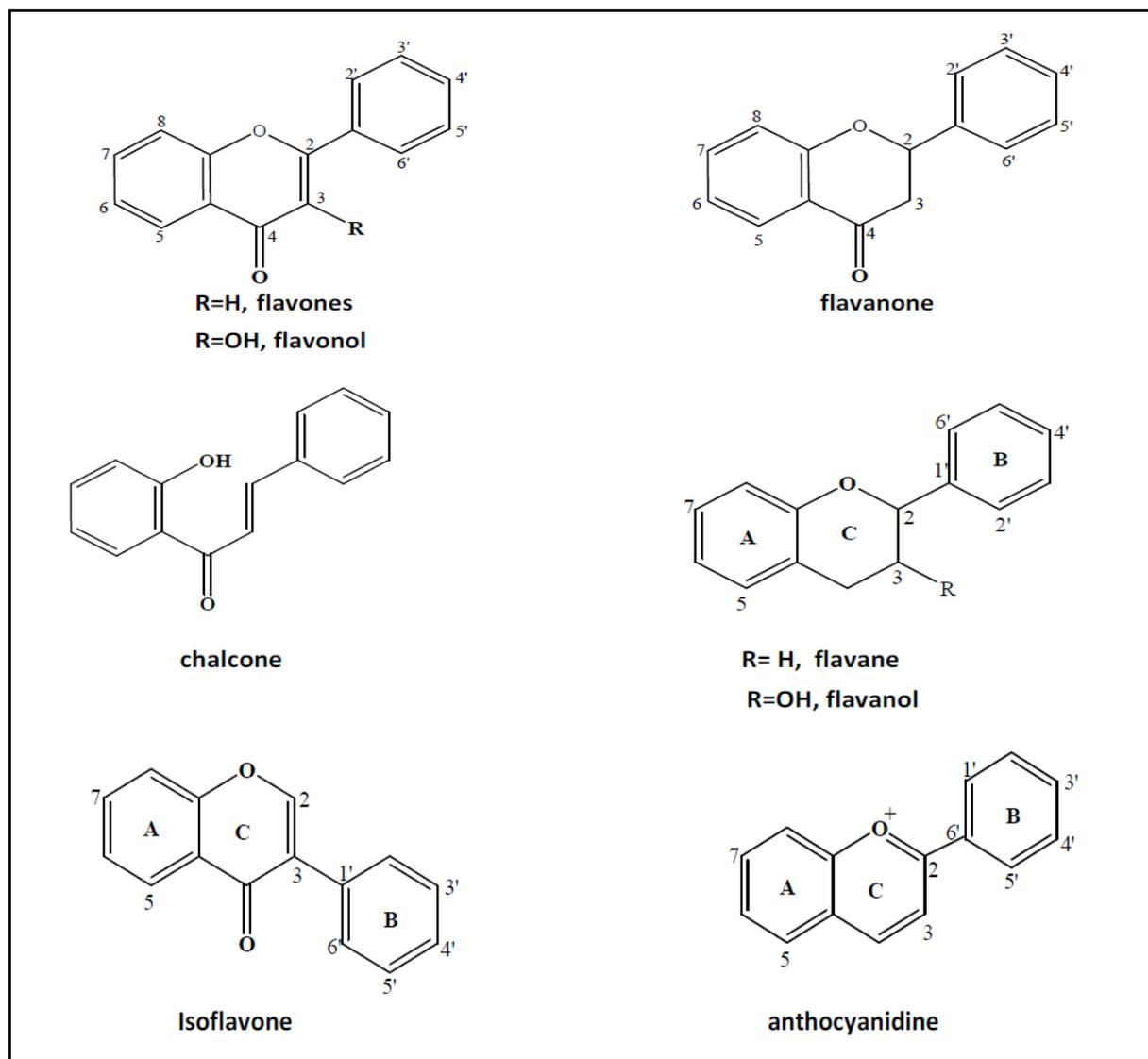


Figure 20. Les différentes sous-classes des flavonoïdes (**Heim et al., 2002**).

B. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités présentant un intérêt en thérapeutique telles que : hépatoprotectrice, antioxydante, antiinflammatoire, antibactérienne, antiulcéreuse, antidiabétique, antiallergique (Mercader *et al.*, 2008 ; Cushnie et Lamb, 2011) et certains ont démontré des effets cardioprotecteurs importants (Hooper *et al.*, 2008).

a. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des flavonoïdes est liée à leurs capacités à piéger les radicaux libres : le radical hydroxyle OH^\bullet , l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, l'oxyde nitrique NO^\bullet (Heim *et al.*, 2002 ; Ghedira, 2005) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène.

Plusieurs travaux montrent la présence des relations structure-activité au sein des flavonoïdes (Rice-evans *et al.*, 1996; Ghedira, 2005; Ma *et al.*, 2007). Ces études permettent d'avoir une idée sur les activités antioxydante de ces composés en fonction de leurs caractéristiques structurales à partir du nombre et de la position de leurs groupements fonctionnels (Ghedira, 2005). Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale (Figure 21) ont pu être établis par plusieurs auteurs (Hendrich *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007; Mercader *et al.*, 2008). Il s'agit de la présence d'une fonction catéchol sur le cycle B (Van Acker *et al.*, 1996), la présence d'un motif *énone* dans le cycle C, la présence de groupement hydroxyle en position 3 pour les flavones et en position 5 pour les isoflavones (Heim *et al.*, 2002 ; Ghedira, 2005) et la présence d'une double liaison entre le carbone 2 et le carbone 3 (Pietta *et al.*, 2000).

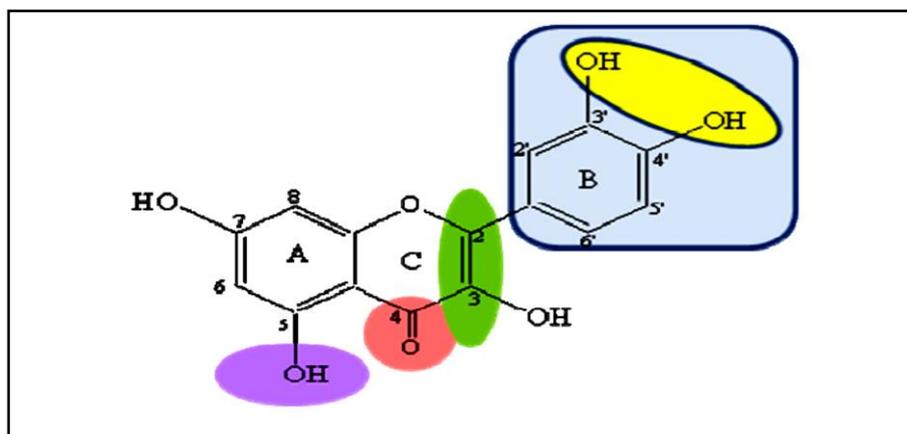


Figure 21. Les éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes

(Ma *et al.*, 2007)

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques, comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{+}) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène (**Dacosta, 2003**) selon la réaction suivante :



b. Activité anti-inflammatoire

De nombreux travaux indiquent que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (**Hadi, 2004; Kim et al., 2004**) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire, ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (**Marfak, 2003; Girotti-Chanu, 2006; Hoensch et Weigmann, 2018**). On peut citer par exemple la taxifoline qui est douée d'une activité anti-inflammatoire significative et similaire à l'hydrocortisone (**Hadi, 2004**).

D'autre part, on sait que l'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la lipooxygénase pour aboutir à la formation de leucotriènes et par la voie de la cyclooxygénase pour produire des thromboxanes et des prostaglandines. Plusieurs flavonoïdes (le crisiliol et la baicaléine) sont de puissants inhibiteurs de la 5- lipooxygénase et donc la production des leucotriènes (**Girotti-Chanu, 2006**). D'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chryisine agissent sur l'activité de la cyclooxygénase (**Hoensch et Weigmann, 2018**).

Il a montré que les flavonoïdes inhibent également l'inflammation chronique de l'intestin. Une étude récente montre que certains flavonoïdes présents dans la lumière intestinale se lient aux récepteurs toll like (TLR) de la membrane plasmique. Une fois le complexe TLR-Flavonoïde formé pénètre dans le cytoplasme où il se fixe sur des récepteurs nucléaires spécifiques : Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) qui va déclencher la translocation dans le noyau (Figure 22). Le couple Ahr- TLR-Flavonoïde internalisé dans le noyau se lie à des récepteurs nommés Arnt (Ahr nuclear translocator) qui vont agir sur la transcription des gènes spécifiques de l'inflammation (**Hoensch et Weigmann, 2018**).

c. Activité antibactérienne

Les flavonoïdes provoquent des dommages au niveau de la membrane cytoplasmique (causée par la perforation et/ou une réduction de la fluidité membranaire), l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (flavanols et les isoflavones) causée par l'inhibition de topoisomérase ou de la dihydrofolate réductase et l'inhibition du métabolisme énergétique provoquée par l'inhibition de NADH-cytochrome c réductase (**Cushnie et Lamb, 2011**).

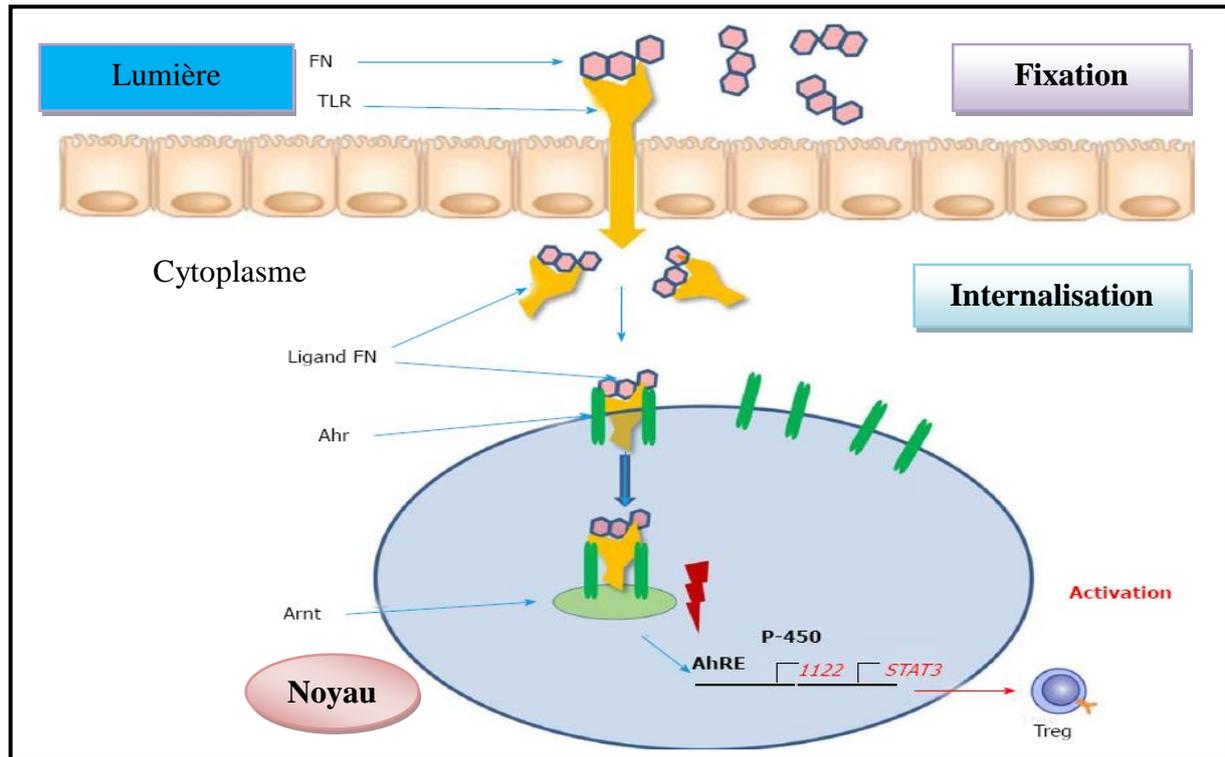


Figure 22. Mécanisme d'action des flavonoïdes lors d'une inflammation de l'intestin
(Hoensch et Weigmann, 2018)

Flavonoïde (FN), Toll like receptor (TLR), Aryl hydrocarbon receptor (Ahr), Ahr nuclear translocator (Arnt), Ah Response Element (AhRE), cytochrome P-450 (p-450).

En outre, les composés dont le flavonol, flavan-3-ol ont été capables d'inhiber le métabolisme énergétique par inhibition de l'ATP synthase. Des études ont suggéré deux nouveaux mécanismes. Il s'agit de l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire (causée par l'inhibition de ligase D-alanine-D-alanine) et l'inhibition de la synthèse de la membrane cellulaire par l'inhibition des sortases (Cushnie et Lamb, 2011). D'après Hadi (2004), les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont aussi de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase.

d. Effet antidiabétique

Selon les travaux d'Elberry *et al.* (2015) sur les rats diabétiques, le mécanisme d'action antidiabétique de la plante *M. vulgare* contre le diabète *mellitus* est due aux flavonoïdes qui ont un effet hypoglycémiant en entraînant une stimulation de dégagement d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans, ce qui entraîne une augmentation de contenu de glycogène de muscle squelettique et de foie dans les rats diabétiques.

e. Inhibition de cycle cellulaire

Les flavonoïdes sont considérés également comme de bons inhibiteurs de la prolifération bien que leurs cibles au niveau du cycle cellulaire ne soient pas bien connues. La progression des cellules eucaryotes au travers des différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par une famille de ser/thr Kinases, Les CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) associés à leurs partenaires cyclines. La formation et l'activation des complexes CDK-Cyclines s'effectuent selon un ordre précis permettant le bon déroulement du cycle (**Hadj-Salem, 2009**).

Les travaux de **Casagrande et al. (1998)** ont montré qu'un dérivé de la quercétine est inhibiteur de PI-3-Kinases, induit un arrêt de cycle cellulaire en G₁ par inhibition des activités CDK₂ et CDK₄. Afin d'établir des relations structure/fonction, cette équipe a étudié différents flavonoïdes et a montré que les molécules : quercétine, daidzéine et lutéoline, inhibent spécifiquement la CDK₂ et les composés : Kaempférol, apigénine et génistéine, qui conduisent à un arrêt de cycle cellulaire en G₂ inhibent la CDK₁ (**Casagrande et al., 1998**). **Xu et al. (2008)** ont montré que le Kaempférol-7-O-β-D-glucoside provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M et la diminution de la Cycline B₁ et de la CDK₁ de cellules cancéreuses du col utérin humain (*HeLa*) d'une manière p₅₃ indépendante. Le traitement de cellules d'adénocarcinomes œsophagiens humains OE33 avec des flavones et des flavonols entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M à travers la régulation de GADD 45β et 14-3-3σ et de la Cycline B₁ et induit l'apoptose par voie mitochondriale par régulation de la PIG₃ et le clivage de la caspase-9 et de la caspase-3 (**Zhang et al., 2008**).

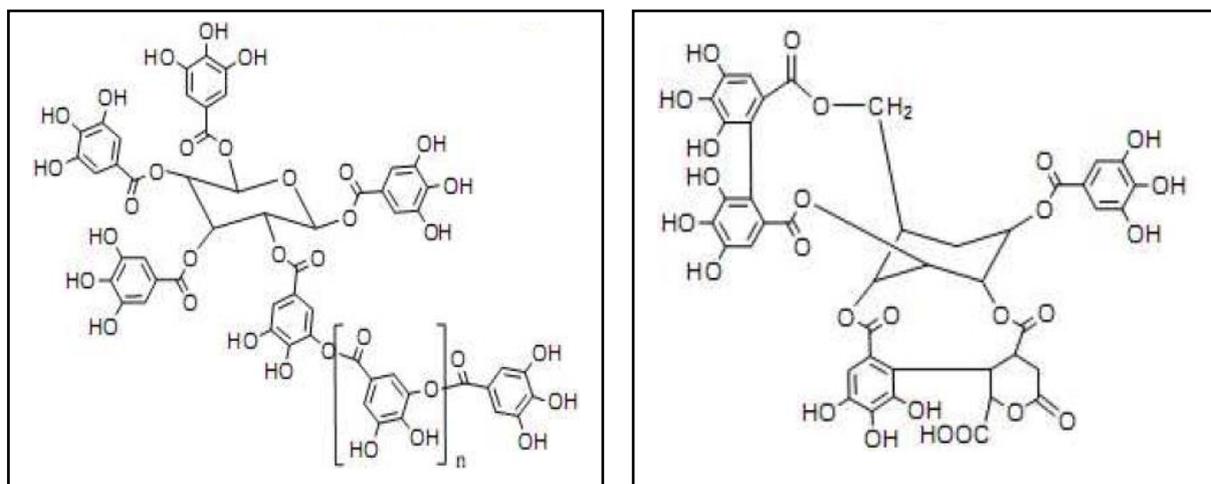
III. 1. 2. Les tanins

Les tanins sont des substances naturelles phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses (**Bruneton, 2009**). Ce sont des métabolites secondaires des plantes supérieures que l'on trouve dans toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, fruits, etc) où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites. Sur le plan chimique, ils sont constitués soit d'oses (glucose le plus souvent), ou de catéchine ou de triterpénoïde auquel sont attachés des unités galloyles (ou leurs dérivés) soit d'oligomères ou polymères de flavanols (**Bruneton, 2009**). Actuellement, l'utilisation des tanins couvre un vaste domaine, allant de la bactériologie, virologie, à l'hématologie..., traduisant ainsi leur importance dans la médecine humaine (**Mamadou, 2002**). Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique :

A. Tanins hydrolysables

Ce sont des polyesters d'oses et d'acides phénols. Les oses trouvés dans ces tanins sont surtout représentés par le glucose, ces tanins sont de deux types :

- * Les tanins galliques qui sont les esters d'oses (glucose) et d'acides galliques;
- * Les tanins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagiques (Figure 23) (**Bruneton, 1999; Atefeibu, 2002**). Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide ellagique (**Peronny, 2005**). Quelques auteurs définissent deux classes supplémentaires: les taragotanins (l'acide gallique et l'acide quinique comme noyau) et les caffétanins (intégrant l'acide caféique et l'acide quinique) (**Bruneton, 2009**).



Gallotannin (a)

Ellagitannin (b)

Figure 23. Structure des tanins hydrolysables (**Peronny, 2005**).

B. Tanins condensés (proanthocyanidines)

De structure plus complexe, ils ne renferment pas d'oses dans leur molécule, ils ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tannases mais en présence d'acide forts ou d'agents d'oxydation, ils se transforment en substances rouges : les phlobaphènes (**Peronny, 2005**).

Ce sont des polymères de flavan-3-ols, appelés aussi catéchines et de flavan-3,4-diols appelés leuco-anthocyanidines ou un mélange des deux (**Atefeibu, 2002; Mamadou, 2002; Peronny, 2005**). La Figure 24 représente la structure d'un tanin condensé polymérique.

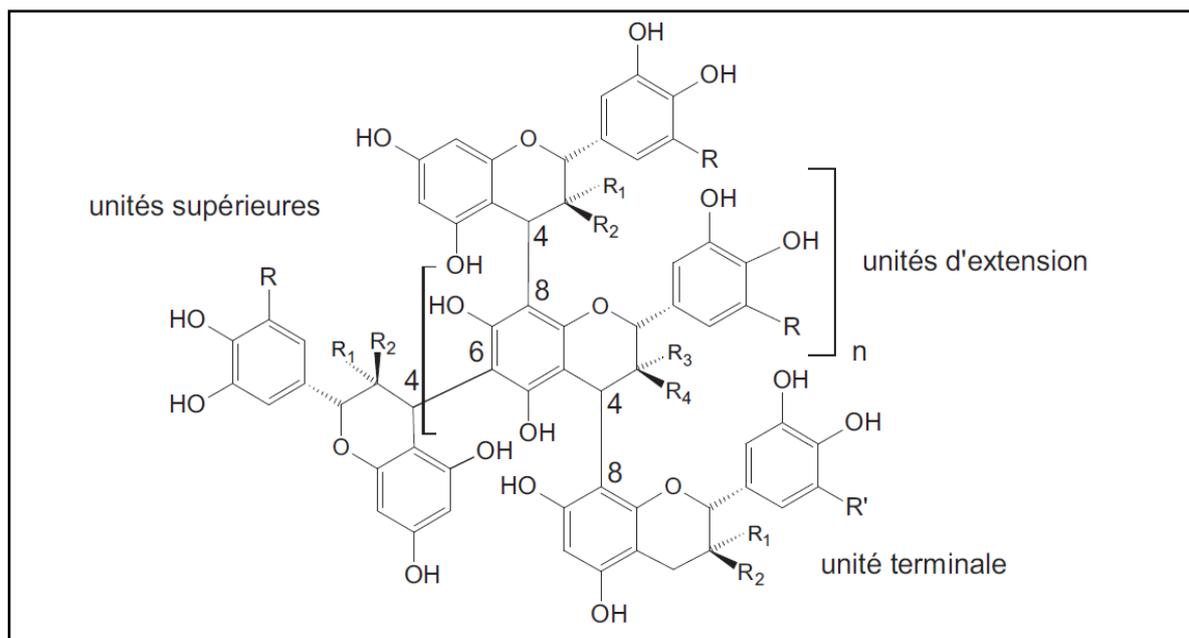


Figure 24. Structure des proanthocyanidines polymères.

(Peronny, 2005)

C. Propriétés biologiques des tanins

a. Activité antioxydante

Selon **Bruneton (1999)**, les tanins hydrolysables sont des piègeurs des RLs et de l'ion superoxyde. Les tanins hydrolysables procyanidines présentent des propriétés antioxydantes remarquables. Ils inhibent également l'auto-oxydation de l'acide ascorbique et de linoléate et la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes. Ces tanins sont de très bons capteurs des RLs, ils sont donneurs des protons aux radicaux lipidiques produits lors de la peroxydation d'où la formation des radicaux tanniques plus stables (**Aouissa, 2002**).

b. Activité antimicrobienne

Les tanins galloyllés ont montré un grand spectre d'activité antibactérienne (**Bruneton, 1999**). L'activité bactériostatique de ces molécules a été également rapportée sur différentes bactéries, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Clostridium bolulinum* (**De Bruyne et al., 1999; Bruneton, 1999**). De nombreuses études ont montré l'effet antimicrobien des tanins sur différentes bactéries, virus, champignons et levures (**Bruneton, 1999; Peronny, 2005**), dans les infections pulmonaires, ils agissent grâce à une action inhibitrice sur la croissance microbienne (**Atefeibu, 2002; Mamadou, 2002**).

III. 2. Diterpènes labdanes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2*E*, 6*E*, 10*E*-géranyl-géranyl-pyrophosphate. On dénombre plus de 1200 produits diterpéniques répartis en une centaine de squelette. On les rencontre dans certains insectes et divers organismes marins, ils sont surtout répandus chez les végétaux particulièrement dans les espèces des familles Lamiales (**Bruneton, 1999**).

A. Propriétés pharmacologiques des diterpènes

Les diterpènes possèdent un grand intérêt thérapeutique. Certains sont connus tels que le taxol qui constitué une nouvelle molécule très efficace contre le développement des tumeurs cancéreuses chez l'Homme (**Wani et al., 1971 ; Rowinsky et al., 1992**). Ils possèdent également diverses potentialités thérapeutiques telles que des propriétés anti-hypertensives (**El-Bardi et al., 2004**), antitumorales (**Chang et al., 2005**), antifongiques (**Aouadhi et al., 2013**), cytotoxiques (**Santos et al., 2009**), anti-inflammatoires et antimicrobiennes (**Stulzer et al., 2006; Zarai et al., 2011**).

L'investigation phytochimique de *Salvia cinnabarina* (Lamiacées) à permis d'isoler un diterpène de type pimarane, l'acide 3, 4-secoisopimara-4(18), 7, 15-trien-3-oïque qui possède des propriétés antispasmodiques, hypotensives et antibactériennes (**Bisio et al., 2007**). Les analyses *in vitro* de 5 nouveaux seco-abietanes sur des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) a prouvé que ces composés exercent une activité antituberculeuse (**Chen et al., 2009**). L'évaluation biologique de la marrubiine a montré la présence d'une activité antinociceptive, vasorelaxante (**De Jesus et al., 1999; El Bardai et al., 2004**). **Meyre-Silva et al. (2005)** ont établie une étude sur l'effet analgésique de la marrubiine et ses dérivés synthétiques (le marrubénol, l'acide marrubiinique) a permis de démontrer l'effet analgésique de la marrubiine et de ses dérivés notamment, l'acide marrubiinique.

Ils ont également mis en valeur la possibilité d'utiliser ces composés comme modèle pour obtenir de nouveaux agents analgésiques plus puissants (**Meyre-silva et al., 2005**). Une autre étude basée sur la recherche des propriétés antiœdematogéniques de la marrubiine a été établie par **Stulzer et al. (2006)** et a montrée un effet significatif. L'oridonine et la poncidine sont deux constituants majeurs de l'*Isodon rubescens* (Lamiacées). Des chercheurs ont montré l'activité anti-angiogénique de ces deux molécules et ils ont suggéré que ces composés peuvent fortement contribuer à l'efficacité de l'effet clinique démontré pour traiter le cancer de la prostate (**Meade-Tollin et al., 2004**).

III. 3. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences aromatiques ou encore huiles volatiles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites, soit par entraînement à la vapeur, soit par des solvants volatils (**Smallfield, 2001**; cité par **Mohammedi, 2006**). Ce sont des mélanges complexes, contenant de très nombreuses espèces chimiques, identifiables par chromatographie gazeuse. Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes constituent les composants actifs les plus importants des huiles essentielles, dont les mono et sesquiterpénoïdes qui forment la majeure partie (**Calsamiglia et al., 2007**).

A. Composition biochimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles est assez complexe et dont les molécules appartiennent à trois grandes classes : les terpènes, les phénylpropanes et les molécules diversement fonctionnalisées. Les terpènes sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$. Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. Ces composés sont de structure chimique variée, ils peuvent être acycliques, monocycliques (limonène) ou même bi-cycliques (pinène). Plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes ont été estimés.

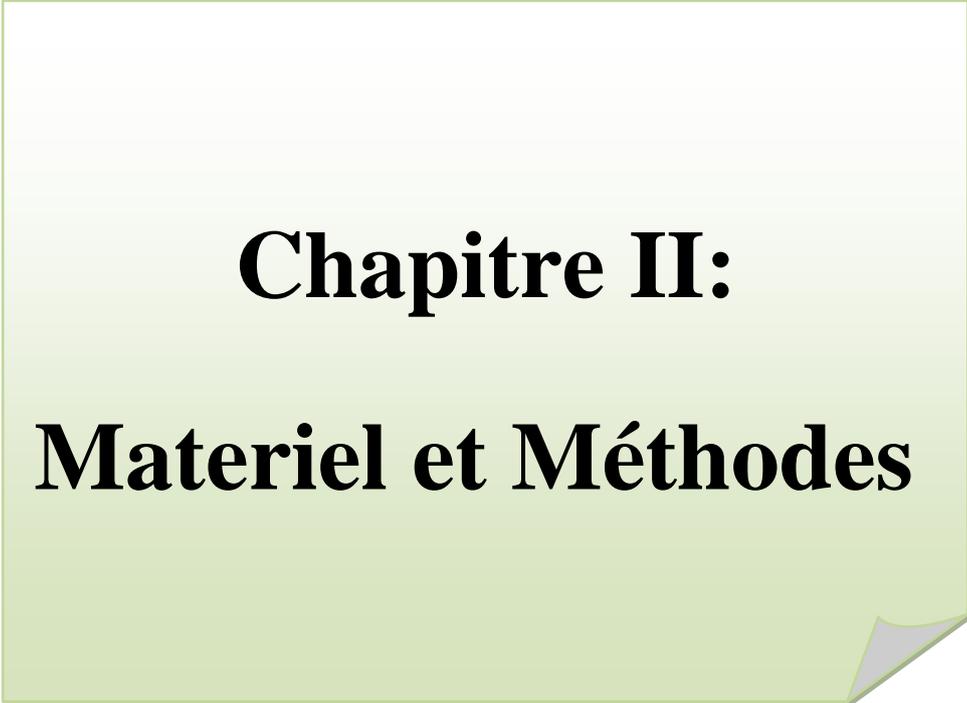
Il est important de signaler que la classe des terpénoïdes est issue d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique, alors que pour la classe des phénylpropanes leur formation suit une voie biosynthétique dite de l'acide shikimique (**Mohammedi, 2006**).

B. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries ont été observée comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, la fuite d'électrons et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (**Mohammedi, 2006**).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Entérobactér aërogènes* a aussi été rapportée (**Mohammedi, 2006**). Les huiles essentielles peuvent inhiber la synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides (**Zani et al., 1991**).



Chapitre II:
Materiel et Méthodes

1. Matériel

1. 1. Matériel biologique

1. 1. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des sommités fleuries et des feuilles de *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti* (en période de floraison). *Marrubium vulgare* a été récoltée de la région de Touffana (Wilaya de Batna) à la fin du mois d'Avril 2012. Pour *Marrubium deserti*, la récolte a été effectuée au Sahara Algérien dans la région de Daya-Mogheul (Wilaya de Bechar) à la fin du mois de Mars 2012. *M. deserti* a été identifiée par le Professeur Hocine Laouer (département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ferhat-Abbas, Sétif, Algérie). Le matériel végétal collecté a été lavé puis séché à l'ombre (à température ambiante) dans un endroit sec et aéré pendant 25 jours.

Après séchage, la partie à utiliser est récupérée dans un sac propre, avant d'être envoyé au laboratoire de Zootechnie (Institut des Sciences Vétérinaires et Sciences Agronomiques), au niveau duquel les plantes sont broyées en poudre (Figure 25), de manière à ce que la surface de contact avec le solvant soit la plus grande possible et que les rendements d'extraction soient les meilleures possibles, sans que le temps d'extraction soit trop long.

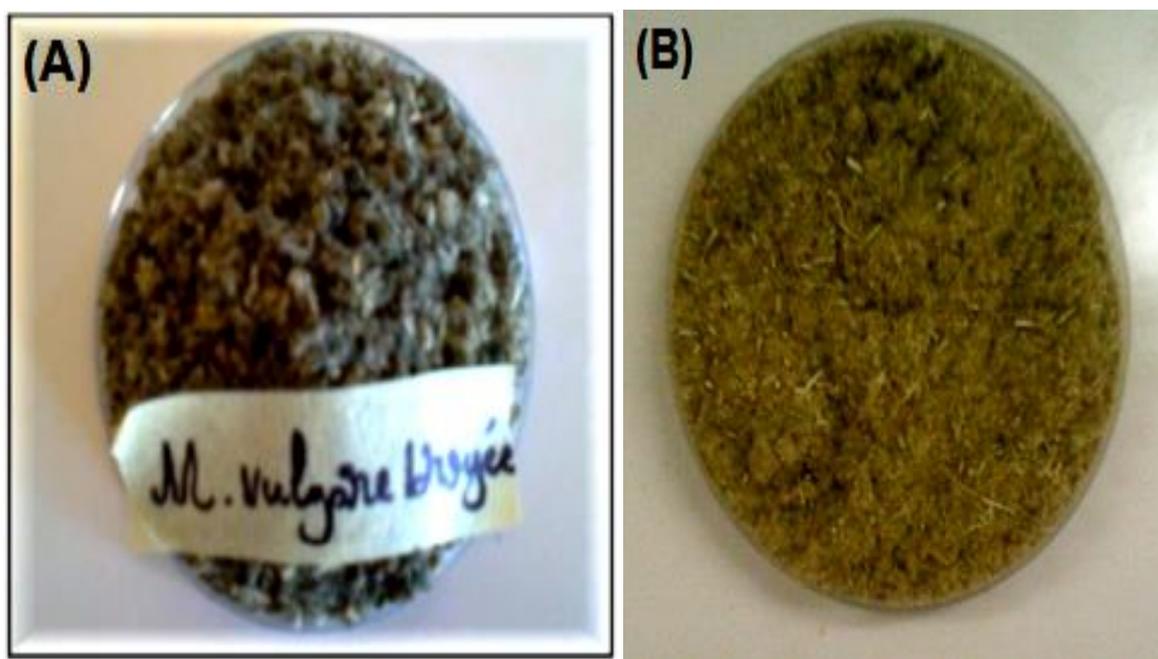


Figure 25. Matériel végétal broyé de *Marrubium vulgare* (A) et *Marrubium deserti* (B).

1. 1. 2. Les animaux

La présente étude a été réalisée sur des rats mâles et femelles *Wistar albinos* âgés de 3 à 4 mois et dont le poids varie de 150 à 200 g. Ces animaux ont été élevés au sein de l'animalerie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Sciences Agronomiques à l'université El-Hadj-Lakhdar de Batna. Les rats sont logés dans des cages métalliques avec accès libre à la nourriture, à l'eau et dans une température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité.

1. 1. 3. Souches bactériennes

Huit souches bactériennes ont été utilisées dans la présente étude. Il s'agit de trois souches de références (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), une souche SARM (*Staphylococcus aureus*) connue pour sa résistance à un antibiotique, la méthicilline dit MRSA : methicillin resistant *S. aureus*. Ces souches ont été procurées du laboratoire de Microbiologie de Centre Hospitalier Universitaire de Batna (CHU). D'autres souches ont été obtenues à partir des prélèvements de malades (pus, urines), il s'agit de *Salmonella thyphémyrium*, *Shigella flexneri*, *Serratia marcescens* et *Klebsiella pneumoniae* « pneumobacille de Friedlander ».

1. 1. 4. Souches fongiques

Les souches fongiques (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) sont issues des prélèvements de malades au niveau de laboratoire de parasitologie du (CHU) de Batna. L'isolement de *Penicillium digitatum* est effectué à partir des fruits d'agrumes infectés présentant les pourritures. Des morceaux d'écorce infectés sont détachés à l'aide d'une aiguille stérilisée par flambage et après trempage dans l'alcool. Chaque morceau est placé au centre d'une boîte de pétri contenant le milieu de culture Sabouraud. Les boîtes préparées sont incubées à 25°C pendant sept jours, puis conservé à 4°C sur le même milieu de culture.

1. 2. Solvants et réactifs

Les solvants suivants employés pour l'extraction (éther de pétrole, dichlorométhane, *n*-butanol, méthanol) et les solvants utilisés pour la chromatographie sur couche mince et l'activité antioxydante (chloroforme, acétate d'éthyle, *n*-butanol) sont achetés de « *PROLAB, MERK EUROLAB* ». Les standards utilisés pour le dosage des polyphénols (acide gallique), des flavonoïdes (quercétine), des tanins (catéchine) et ceux utilisés pour la CCM (acide *trans*-

cinnamique, acide 4-hydroxybenzoïque, 4-méthyl-catéchol, rutine (sophorine) et kaempférol sont obtenus de « *Sigma Alderich CO., ST Lowis, Mo* ». Le réactif de Folin-Ciocalteu et le chlorure d'aluminium (AlCl_3) sont procurés de « *Fluka Chemie* ».

Les réactifs employés dans les expériences d'activité antioxydante (Tween 40, acide linoléique (pureté CA 99%), β -carotène, l' α -tocophérol, 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide ascorbique, l'acide trichloracétique (TCA), FeCl_3 (1%) et le potassium hexacyanoferrate [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] proviennent de « *Sigma-Aldrich Chemie* ».

La stréptozotocine (STZ) et la carraghénine utilisées pour l'évaluation de l'activité antidiabétique et anti-inflammatoire respectivement sont procurés de « *Sigma Alderich CO., ST Lowis, Mo* ». Les standards utilisés (le glibenclamide, le diclofénac (Dic), l'aspirine : acide acétyl-salicylique et le paracétamol) sont achetés de la pharmacie.

2. Méthodes

2. 1. Préparation des extraits de *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti*

2. 1. 1. Préparation des extraits organiques

La préparation des extraits à partir des sommités fleuries et des feuilles de *M. vulgare* et *M. deserti* selon la méthode décrite par Stanković (2011) est illustrée dans la Figure 26. Une quantité de 500 g du matériel végétal broyé est ajoutée à 3 L d'éther de pétrole. Après une agitation de 24 heures, le tout est filtré à l'aide d'un tissu filtrant et papier filtre. Le filtrat est concentré par évaporation rotative dans un rotavapor (HEIDOLPH) à 35°C. L'extrait obtenu (EEP) est conservé à 4° C jusqu'à utilisation. Le résidu végétal récupéré après macération dans l'éther de pétrole (retentât) est par la suite macéré dans 3 L de dichlorométhane pendant 24 heures sous agitation manuelle et mécanique. Après filtration (sur tissu et papier filtre), le filtrat est concentré dans un rotavapor (HEIDOLPH) à 35°C. L'extrait obtenu (EDcM) est conservé à 4° C jusqu'à utilisation. Le retentât récupéré de l'extraction précédente par le dichlorométhane est macéré dans 3 L de butanol (grade HPLC) sous une agitation de 24 heures. Après filtration et évaporation rotative à 40° C, l'extrait obtenu (EBuOH) est conservé à 4° C jusqu'à utilisation. Le retentât récupéré de cette dernière extraction est enfin soumis à une macération dans 3 L de méthanol pendant 24 heures avec agitation. Le mélange est filtré puis évaporé à 45°C dans un évaporateur rotatif. L'extrait obtenu (EMeOH) est conservé à 4° C jusqu'à utilisation.

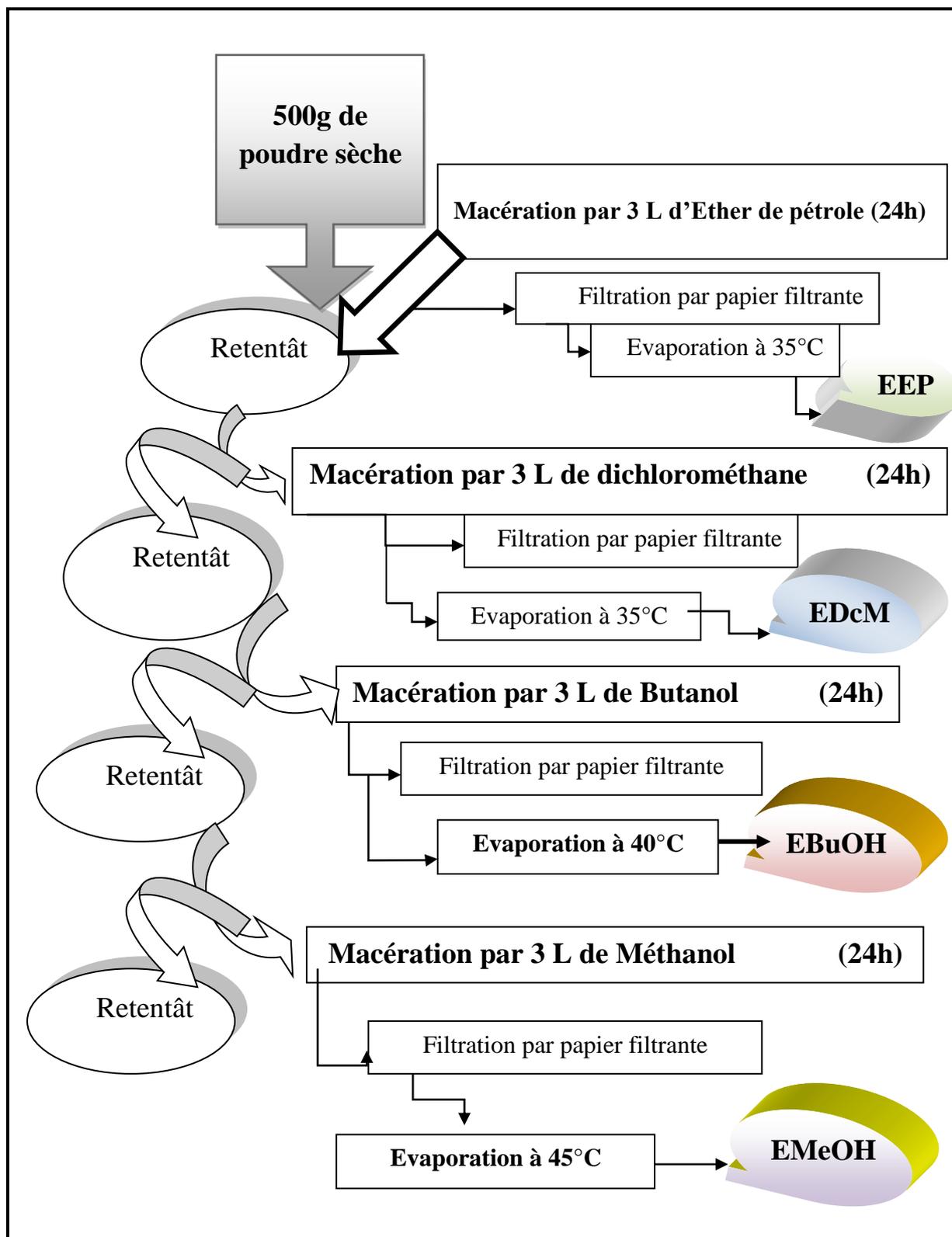


Figure 26. Extraction par polarité croissante de la poudre des sommités fleuries ainsi que les feuilles de *M. vulgare* et *M. deserti*.

2. 1. 2. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux est obtenu par macération de 500 g de la poudre de *M. vulgare* et de *M. deserti* dans un volume de 3L d'eau distillée, durant 72 heures avec agitation de temps en temps, en suivant le protocole décrit par **Stanković (2011)**. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour se débarrasser des débris de plantes. La phase aqueuse du macérât est filtrée sur un papier filtre, et le filtrat obtenu est ensuite, congelé à -20° C puis lyophilisé à l'aide d'un lyophilisateur de type « CHRISA BETA 1, *Laboratory Freeze Dryers*, Germany» (Figure 27).

2. 2. Analyse des extraits de *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti*

2. 2. 1. Tests qualitatifs des extraits de *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti*

A. Screening chimique des extraits (Tests préliminaires)

a. Caractérisation des polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols. Une goutte de solution méthanolique de FeCl_3 à 2% a été ajoutée à 2 ml de chaque extrait (EEP, EDcM, EBUOH, EMeOH et EAQ). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée est le signe de la présence de polyphénols (**N'Guessan et al., 2009**).

b. Caractérisation des Flavonoïdes

La présence des flavonoïdes dans les différents extraits a été mise en évidence par la réaction à la cyanidine (**Ciulel, 1982**). En effet, les flavonoïdes sont responsables d'un dégagement d'hydrogène et de l'apparition d'une coloration allant de l'orangé au rouge pourpre, en présence d'acide chlorhydrique concentré et de magnésium (**Hadj-Salem, 2009**).

Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été dissoute dans 1,5 ml du méthanol (50%) et chauffée dans un bain d'eau bouillante. Un volume de 5 ml d'HCl et quelques fragments de magnésium ont été ensuite ajoutés. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, une coloration rouge est obtenue (**Aliyu et al., 2011**).

c. Caractérisation des Tanins (*Test au FeCl_3*)

Une quantité de 2 à 3 gouttes de FeCl_3 (1%) a été ajoutée à 1 ml de chaque extrait. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (**Dohou et al., 2003**).

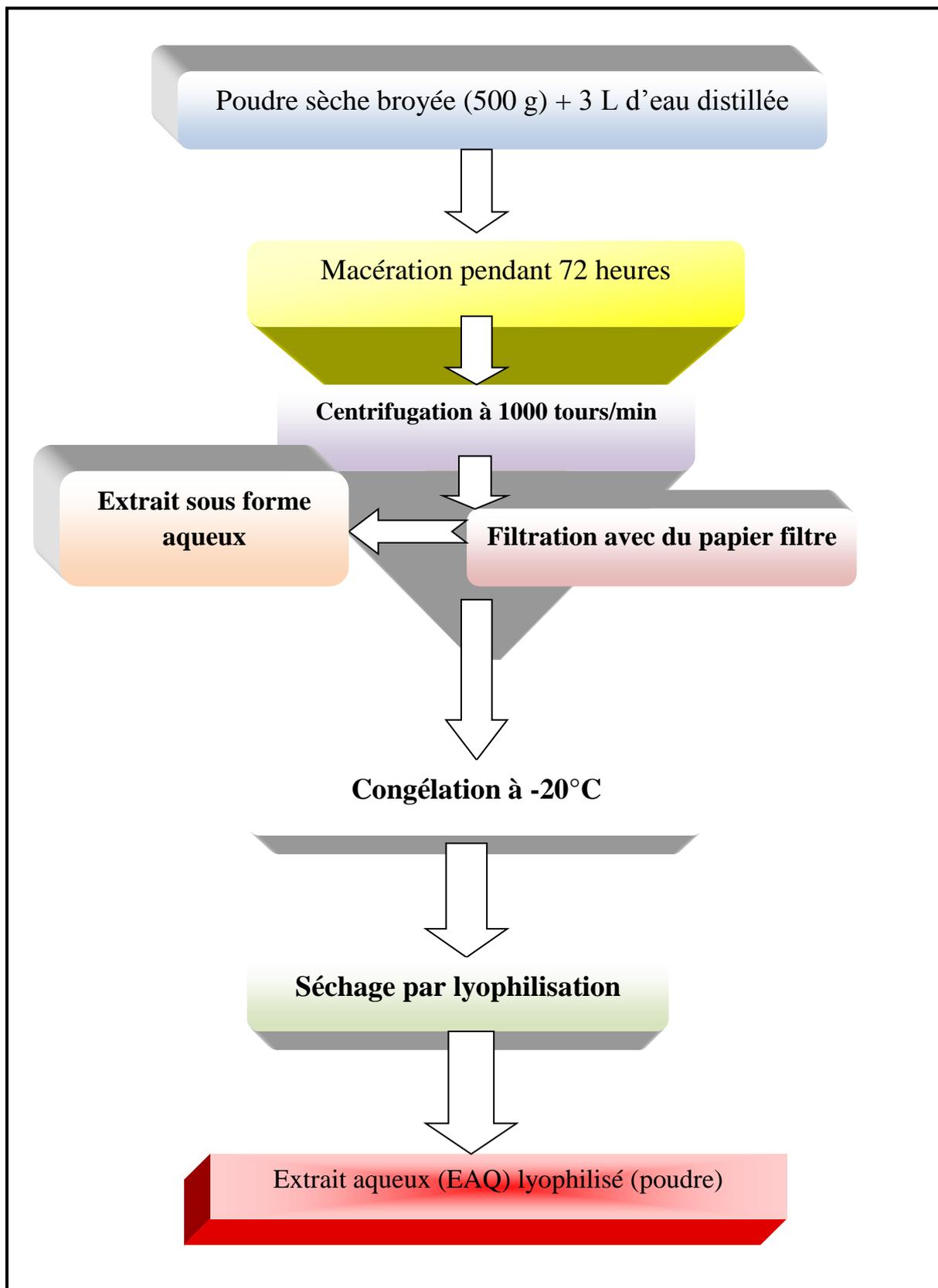


Figure 27. Préparation de l'extrait aqueux lyophilisé de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Le réactif de Stiansy a été utilisé afin de différencier convenablement entre les tanins galliques et catéchiques. Pour cela, un volume de 15 ml du réactif de Stiansy (10 ml de formaldéhyde + 5 ml d'HCl concentré) a été ajouté à 5 ml de chaque extrait. Le mélange est incubé au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons reflète la présence des tanins catéchiques. Pour les tanins galliques, la solution précédente a été filtrée, le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl₃ provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence de tanins galliques (N'Guessan *et al.*, 2009).

d. Caractérisation des Saponosides (*Frothing test*)

La présence des saponosides a été déterminée qualitativement par l'apparition, après agitation, de mousse persistante pour plus de 15 min à 30 min. Une quantité de 1 g de chaque extrait a été solubilisée dans 10 ml d'eau distillée et la solution a été agitée vigoureusement dans le sens vertical pendant 15 à 30 secondes. Après un temps de 15 minutes, la hauteur de la mousse est mesurée. Le tube dans lequel la hauteur de la mousse est de plus d'1cm indique la présence de saponosides (Aliyu *et al.*, 2011).

e. Caractérisation des Stérols et Polyterpènes (*Lieberman-Burchard's test*)

Les stérols et les polyterpènes ont été recherchés par la réaction de Liebermann (N'Guessan *et al.*, 2009). Les extraits des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* (0,5 g) sont additionnés chacun de 1 ml d'anhydride acétique puis de 0,5 ml de chloroforme, après dissolution, les solutions sont transférées dans des tubes à essai auxquels sont ajoutés 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert indique une réaction positive (N'Guessan *et al.*, 2009).

f. Mucilages

Un volume de 5 ml d'éthanol absolu a été ajouté à 1 g de chaque extrait. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par agitation indique la présence de mucilages (Amadou, 2006).

g. Test des quinones libres

Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été additionnées à 10 ml d'éther de pétrole. Après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés. La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 10 % (10 gouttes), lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet (Dohou *et al.*, 2003).

h. Test des anthra-quinones

Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été additionnée à 10 ml de chloroforme. Après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés. Une quantité de KOH (10 % ; M/v) a été ensuite ajoutée à chaque extrait.

Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge (Dohou *et al.*, 2003).

i. Test des alcaloïdes

Un volume de 10 ml de méthanol a été ajouté à 0,2 g de chaque extrait. Après une agitation manuelle d'une minute et un repos de 24 h, les extraits sont filtrés. Un volume de 2 ml d'une solution aqueuse d'HCl à 1% a été ajouté à 2 ml de filtrat. L'ensemble est chauffé puis filtré, avant d'ajouter quelques gouttes du réactif de Mayer (10 gouttes). L'observation d'une turbidité ou la formation d'un précipité jaune témoignent la présence d'alcaloïdes (Aliyu *et al.*, 2011).

j. Test des coumarines

Une quantité de 0,2 g de chaque extrait a été ajoutée à 10 ml de méthanol et quelques gouttes de KOH à 10 % (10 gouttes). L'apparition de couleur jaune qui disparaît avec l'ajout de quelques gouttes d'HCl concentré (10 gouttes) montre la présence de coumarines (Hindumathy, 2011).

B. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Des plaques du gel de silice 60 GF₂₅₄ (Merck) de dimensions 20 x 20 cm prêtes à l'emploi à support en aluminium sont utilisées pour analyser les dix extraits : aqueux, méthanolique, butanolique, extrait éther de pétrole et l'extrait dichlorométhanique de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Trois systèmes de solvants de migration ont été utilisés :

***Deux systèmes de migration pour les extraits polaires :** le premier est constitué du *n*-butanol/acide acétique/eau (Baw) (60 : 15 : 25; v/v/v), alors que le deuxième système est constitué de chloroforme/méthanol/eau (65 : 35 :5; v/v/v).

***Un système de migration pour les extraits apolaires:** constitué de l'éther de pétrole/acétate d'éthyle (80 : 20; v/v). Huit témoins ont été utilisés : la quercétine, la rutine, le kaempférol, l'acide gallique, l'acide tannique, l'acide 4-hydroxy-benzoïque, l'acide *trans*-cinnamique et le 4-méthyl-catéchol.

Un volume de 3 µl de chaque extrait (10 mg/ml) et de standard (2 mg/ml), ont été déposés à l'état liquide par appositions successives d'une micropipette et les plaques sont ensuite introduites en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre (la chambre de migration), elles reposent contre l'une des parois d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. Après migration, les plaques sont éventuellement séchées au sèche-cheveux.

Les plaques sont analysées en lumière visible et sous UV à 254 et 365 nm, avant et après révélation par des réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes. Les principaux réactifs utilisés sont :

* Réactif à la vanilline sulfurique qui est composé de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et 100 ml d'éthanol. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à l'étuve quelques minutes à 110°C. Deux autres systèmes de révélation ont été utilisés :

a- Révélation par une solution aqueuse de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), spécifique des flavonoïdes et qui donne des tâches jaunes.

b- La détection des composés ayant une activité de capteurs de radicaux libres est réalisée par pulvérisation d'une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml. Ainsi en CCM, les composés actifs sont visualisables sous la forme de taches jaunes.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son Rf (*rate factor* ou rapport frontal) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile. Les Rf des spots issus de la séparation sont calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des différents métabolites présents dans les extraits.

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

2. 2. 2. Analyse quantitative des extraits de *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti*

A. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des feuilles et les sommités fleuries de *M. vulgare* et *M. deserti* a été effectué selon la méthode de Folin Ciocalteu (Wong *et al.*, 2006). Un volume de 200 µl des extraits organiques (EEp, EDcM, EBUOH, EMeOH, dissouts dans le méthanol), des extraits aqueux (EAQ, dissouts dans de l'eau distillée) ou de l'acide gallique, à différentes concentrations, ont été additionnés à 1 ml du réactif FCR dilué dix fois.

Après 4 min, un volume de 0,8 ml de la solution de bicarbonate de sodium à 7,5 % a été ajouté dans chaque tube à essai. Le tout est agité avec le vortex puis incubé à l'obscurité pendant 2 h. L'absorbance est par la suite mesurée à 765 nm (Figure 28). La solution du blanc a été préparée dans les mêmes conditions par l'ajout de 1 ml du FCR et 0,8 ml de bicarbonate de sodium à 7,5 % à un volume de 200 μ l d'eau distillée pour l'EAQ. Pour les extraits organiques l'eau distillée est remplacé par le méthanol absolu.

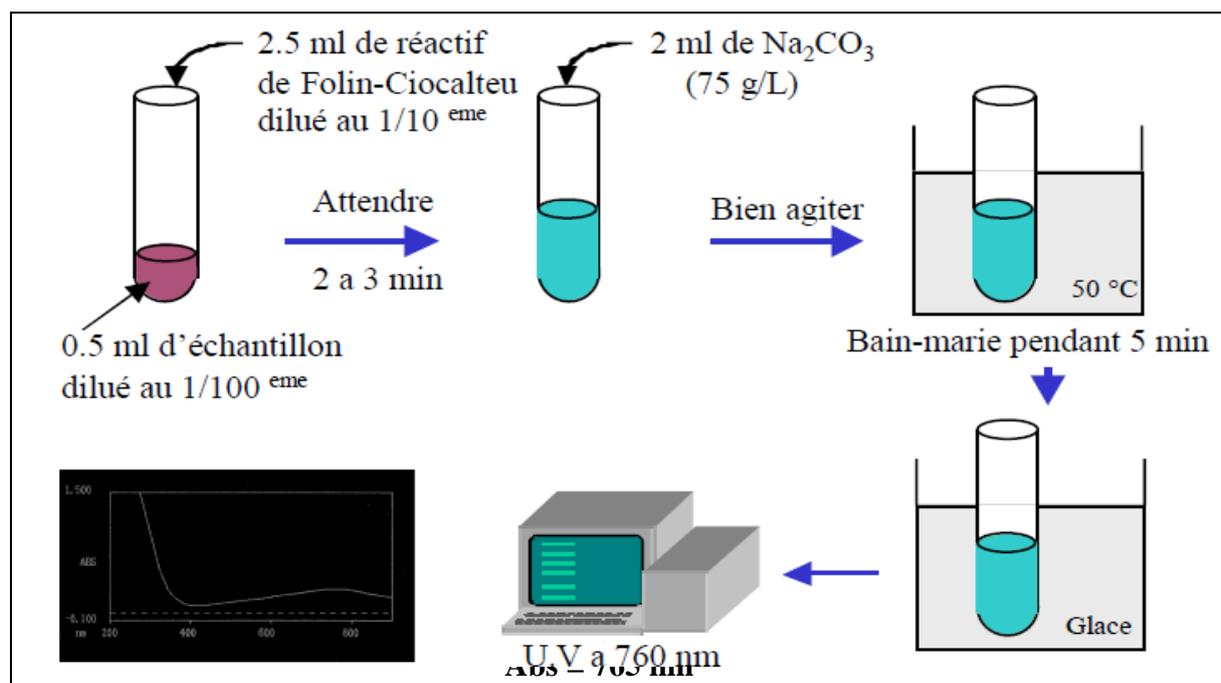


Figure 28. Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu.

La concentration des polyphénols totaux dans les différents extraits est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage préparée à partir de neuf concentrations d'acide gallique allant de 0 à 200 μ g/ml (solution mère de 200 μ g/ml de concentration) et exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

B. Dosage des Flavonoïdes (Méthode d'AlCl₃)

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (Bahorun *et al.*, 1996) a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*. Un volume de 1 ml des extraits organiques (EEp, EDcM, EBUOH, EMeOH, dissouts dans le méthanol), des extraits aqueux (EAQ, dissouts dans de l'eau distillée) ou de la quercétine (préparée dans le méthanol), à différentes concentrations, ont été additionnés à 1 ml d'AlCl₃ (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les différents extraits est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage préparée à partir de huit concentrations de quercétine allant de 0 à 35 µg/ml (solution mère de 35 µg/ml de concentration). Elle est exprimée en milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

C. Dosage des flavonols

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl₃ (**Benmeddour et al., 2012**) avec quelques modifications a été utilisée pour quantifier les flavonols dans les différents extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*. La procédure consiste à introduire dans un tube à essai un volume de 2,8 ml d'eau distillée ; 0,1 ml d'AlCl₃ ; 0,1 ml d'acide acétique (1 M) et 0,5 ml d'extrait. Le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'ombre à température ambiante pendant 30 minutes. L'absorbance est lue à 415 nm. La quantification des flavonols se fait à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine. La teneur en flavonols est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

D. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline décrite par **Julkunen-Titto (1985)**. Des aliquotes de 0,1 à 1 ml de la solution mère (0,5 mg/ml) de catéchine et des extraits ont été introduits dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 1 ml par addition de méthanol absolu. Puis, un volume de 1,5 ml de la vanilline à 4% solubilisé dans le méthanol et 750 µl de l'HCl (12M) à 37% ont été ajoutés et à une minute d'intervalle à chaque tube de la série et mis par la suite au bain marie réglé à 30°C pendant 20 minutes. Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine par g d'extrait (mg EC/g d'extrait).

2. 3. Evaluation des activités biologiques des extraits *in vitro*

2. 3. 1. Activité antimicrobienne

A. Test de l'activité antibactérienne

Les souches isolées et identifiées au niveau du laboratoire de Microbiologie du CHU de Batna ont été conservées au réfrigérateur à 4 C° dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive). Les souches microbiennes à tester ont été cultivées par la suite dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive. Après 18 h d'incubation à 37°C, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 0.5 McFarland ont été préparées pour chaque microorganisme dans 5 ml d'eau distillée stérile.

Des disques de papier filtres stériles Whatmann (type 1) de 6 millimètres de diamètre ont été imprégnés de différentes solutions (1 g/ml) (solution mère) des extraits préalablement dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les extraits organiques et dans l'eau distillée stérile pour les extraits aqueux. Une dilution en série de cette solution mère, permet d'obtenir diverses solutions filles (réalisation d'une gamme de concentrations de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) correspondants à des concentrations de l'ordre de 500, 250, 125 et 62,5mg/ml respectivement. À l'aide d'une pince stérile les disques ont été déposés à la surface d'une gélose Mueller Hinton étalé par une suspension microbienne d'une densité optique de 0.5 McFarland. Après diffusion, les boîtes ont été incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C(Choi *et al.*, 2006) .Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible. Les tests ont été répétés deux fois, des disques imprégnés de DMSO et de méthanol ont été aussi utilisés en parallèle (témoins négatifs).

B. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Pour cela des disques de papier filtres stériles Whatmann de 6 millimètres de diamètre ont été imprégnés de différentes solutions (1 g/ml) (solution mère) des extraits préalablement dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les extraits organiques et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux.

Une dilution en série de cette solution mère, permet d'obtenir diverses solutions filles (réalisation d'une gamme de concentrations de 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) correspondants à des concentrations de l'ordre de 500, 250, 125 et 62,5 mg/ml respectivement. Les disques stériles imprégnés de différentes concentrations d'extraits à raison de 20 µl par disque ont été déposés stérilement sur la gélose Sabouraud, ensemencé au préalable par la suspension microbienne (10^6 spores/ml). Après diffusion, les boîtes ont été incubées pendant 48 h à 37 °C pour la levure *Candida albicans*, tandis que les champignons ont été incubés 10 jours à 27 °C en atmosphère normale. Comme l'incubation des champignons s'est étendue il y aura un risque d'une contamination bactérienne, alors pour inhiber la croissance des éléments de la flore bactérienne contaminants et d'atteindre la phase stationnaire de la croissance, la culture a été développée sur une gélose convenable (Sabouraud avec chloramphénicol et l'actidione). Les tests ont été répétés deux fois, des disques imprégnés de DMSO ont été utilisés en parallèle (témoins négatifs). L'activité antifongique a été déterminée en mesurant le diamètre en mm de la zone d'inhibition, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits.

2. 3. 2. Tests de l'activité antioxydante *in vitro*

A. Test de blanchiment du β - Carotène

L'activité antioxydante des dix extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* a été mesurée selon la méthode de **Koleva et al. (2002)** Cité par **Kadri et al. (2011)** avec quelques modifications. Une quantité de 0,5 mg de β -carotène a été dissoute dans 1 ml du chloroforme et mélangé par la suite avec 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Le chloroforme a été évaporé sous vide à 40°C au Rotavapor avant d'ajouter 100 ml d'eau oxygénée. L'émulsion résultante a été vigoureusement remuée. Environ 2,5 ml de l'émulsion obtenue ont été transférés dans des tubes contenant 500 μ l de chaque extrait (solubilisé dans le méthanol absolu sauf l'extrait aqueux dans l'eau distillée) et de standard (α tocophérol à 10 mg/ml solubilisé dans le méthanol). Un contrôle négatif contenant 0,5 ml de méthanol a été préparé en parallèle. L' α tocophérol a été employé comme contrôle positif. Les tubes ont été immédiatement incubés pendant 48 heures et la cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydants est mesurée à 490 nm à des intervalles de temps réguliers. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR (\%)} = \text{Abs}_{\text{t : 48h (échantillon)}} / \text{Abs}_{\text{t : 48h (\alpha\ toc)}} \times 100$$

Où :

AAR : Activité antioxydante relative ;

Abs_{t = 48h (échantillon)} : Absorbance de l'échantillon après 48 heures ;

Abs_{t = 48h (α toco)} : Absorbance du α tocophérol après 48 heures.

B. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par **Mansouri et al. (2005)**. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 μ l des solutions d'extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* (les extraits organiques sont solubilisés dans le méthanol, alors que l'EAQ dans de l'eau distillée) et standard (la quercétine, l'acide gallique et la rutine solubilisés dans le méthanol) sont ajoutés à 1,95 ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire (AA) a été calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ (APR)} = \frac{[\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon}]}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}} \times 100$$

Où :

% (APR) : Pouvoir antiradicalaire ;

Abs₅₁₇ (échantillon) : Absorbance de l'échantillon ;

Abs₅₁₇ (Contrôle) : Absorbance du contrôle négatif.

Les concentrations des extraits et des antioxydants standards (quercétine, acide gallique, rutine) dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 1 mg/ml.

C. Méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant power)

La capacité réductrice a été déterminée suivant la méthode préconisée par **Oyaizu (1986)**. Un volume de 0,5 ml de différentes quantités de chaque extrait (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 1,25 ml de la solution tampon phosphate (0,2M ; pH 6,6) et 1,25 ml de ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) à 1%. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 30 minutes avant d'ajouter 1,25 ml de l'acide trichloracétique (10%). Le tout est centrifugé à 3000 tpm pendant 10 min. Dix aliquotes de 0,625 ml sont effectués dans dix tubes eppendorf auxquels sont ajoutés 0,625 ml d'eau distillée et 0,125 ml de $FeCl_3$ 1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à $\lambda_{max} = 600$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre visible type Biotech Engineering Management CO. LTD. (UK). L'acide ascorbique et l' α -tocophérol ont été utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience dans les mêmes conditions opératoires.

2. 3. 3. Test de l'activité hémostatique

Ce test a été effectué *in vitro* sur le plasma sanguin provenant d'une personne saine adulte mâle (25 ans) avec les extraits aqueux de la partie aérienne du *Marrubium vulgare et Marrubium deserti*. Le principe de ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma décalcifié après recalcification (**Aouissa, 2002**). Pour cela, le sang est recueilli sur citrate de sodium chez un sujet sain. Le plasma est obtenu à partir du sang centrifugé à 3600 tours par minute, pendant 10 minutes.

Ensuite, des quantités de 50, 100, 200 et 500 mg/ml d'extraits aqueux (100 µl) ont été distribuées dans des tubes à essai pour chaque dose. Un autre tube à essai vide a été utilisé comme un témoin n'a reçu aucune dose des extraits. Les tubes sont maintenus au bain marie à 37° C. Ensuite, un volume de 200 µl de plasma et 200 µl de chlorure de calcium (CaCl₂) à 0,025 M sont ajoutés dans chaque tube. Le chronomètre est déclenché dès l'ajout du plasma dans chaque tube. Les observations ont été enregistrées toutes les 30 secondes, jusqu'à la formation d'un caillot, en notant le temps de coagulation pour les 8 tubes de chaque dose. L'évaluation de la coagulation est faite en inclinant le tube sous un angle de 45° afin de constater la présence ou non d'un coagula chaque 30 secondes. Le test est positif si le temps de coagulation d'un plasma contenant un extrait est inférieur à celui du plasma témoin.

2. 4. Evaluation des activités biologiques des extraits *in vivo*

2. 4. 1. Etude de la toxicité aigüe

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques *in vivo*, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Pour cela, deux doses des extraits méthanoliques de chaque plante ont été testées sur des lots de cinq rats mâles albinos de poids homogène compris entre 150 et 180 g âgés de 2 mois préalablement mises à jeun pendant 18 h. Les doses de 2000 et 5000 mg/kg ont été administrées *per os* à l'aide d'une sonde intra-gastrique deux fois : le premier jour et le troisième jour du traitement (72 heures).

Le lot témoin a reçu une solution aqueuse de l'eau physiologique (NaCl 9‰) par voie orale. Les rats de chaque lot ont été observés pendant 14 jours en notant régulièrement les différentes perturbations, c'est-à-dire le changement des comportements : les observations ont été portées sur la mobilité, la sensibilité au bruit, le mode d'alimentation, la respiration, l'aspect des fèces (**Lienou *et al.*, 2007**) et les décès dès le premier jour du traitement.

Les animaux sont maintenus à température ambiante à raison de cinq rats par cage avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Le nombre de morts a été comptabilisé dans chaque lot 48 heures après l'injection afin de déterminer la DL₅₀ dans chaque cas par la méthode graphique de **Miller et Tainter (1944)**.

Le comportement des rats a été observé chaque jour et leur poids mesuré chaque semaine. A la fin du traitement, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Le sang de chaque animal a été prélevé à la fois dans un tube contenant un anticoagulant (EDTA, l'héparine), afin de doser respectivement les paramètres hématologiques et biochimiques. Ensuite, des

organes (reins, foie, cœur) ont été prélevés et pesés, puis conservés dans du formol 10% pour des études histologiques (Bello *et al.*, 2005; Lienou *et al.*, 2007; Rhiouani *et al.*, 2008; Gome *et al.*, 2011). L'analyse des paramètres biochimiques et hématologiques a été effectuée au niveau de la « clinique des Cèdres » Batna.

A. Analyse hématologique

Les échantillons de sang prélevés dans les tubes contenant l'EDTA ont été utilisés pour déterminer les taux de globules blancs, de globules rouges, de plaquettes et l'hématocrite selon des méthodes standards (Baker *et al.*, 1985; Gome *et al.*, 2011).

B. Paramètres biochimiques

Les échantillons de sang dans les tubes contenant l'héparine ont été centrifugés à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes. Les sérums recueillis, conservés à -20 °C, ont servi à doser l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) par la méthode colorimétrique de Reitman et Frankel (1957). La bilirubine totale et conjuguée a été déterminée par la méthode colorimétrique de Tietz (1990), le cholestérol total par le test enzymatique d'Allain *et al.* (1974), les triglycérides par la méthode enzymatique de Buccolo et David (1973) et la créatinine a été mesurée grâce à la méthode de la réaction au picrate en milieu alcalin (Cheesbrough, 1991).

C. Chimie des urines

Afin de déterminer exactement si les EMeOH des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* ont des effets toxiques chez les animaux l'analyse des urines a été effectuée. Pour cela, les animaux ont été introduits dans des cages métaboliques (cinq cages spéciales aux chimies des urines) avec accès libre à l'eau et à la nourriture, les urines ont été récupérées dans une période de 24 heures. Immédiatement, des bandelettes spécifiques ont été imprégnés dans l'urine de chaque rat afin de noter certains paramètres tels que le pH, le glucose, la bilirubine, les protéines, leucocytes, l'acide ascorbique,...

2. 4. 2. Tests de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des EMeOH des deux plantes a été évaluée par trois tests différents : la méthode de l'œdème de la patte induit par la carraghénine, la méthode de l'œdème de l'oreille causé par le xylène et la pleurésie induite par la carraghénine chez le rat.

A. Méthode de l'œdème plantaire induit par la carraghénine

L'injection de carraghénine sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure des rats entraîne l'apparition d'un œdème de la région métatarsienne. L'intensité de cet œdème, qui atteint son maximum de développement en cinq heures, est évaluée grâce à l'augmentation du volume de la patte (par rapport au volume initial). L'administration préventive par voie orale d'un ou des composés anti-inflammatoires réduit de façon significative le développement de l'œdème (Amezouar *et al.*, 2013).

La recherche de propriétés anti-inflammatoires a été réalisée sur le modèle de l'œdème plantaire induit chez le rat (Wistar mâles, 150-200 g) par l'injection d'une suspension à 1 % (100 µl) de carraghénine dans la patte droite ; technique inspirée de celles décrites par Winter *et al.* (1962) Cité par Amezouar *et al.* (2013). Les produits testés ont été administrés par voie orale 1 heure avant l'injection de la carraghénine. Les rats ont été mis à jeun 18 heures avant le traitement et divisés en cinq groupes de cinq rats chacun. Le groupe A, témoin a reçu du NaCl 0,9 % (10 ml/kg PC) seulement, le groupe B et C ont été traités avec 200 mg/kg par poids corporelle (PC) d'extraits méthanolique de *M. vulgare* et *M. deserti* respectivement, et les rats des groupes D et E ont été gavés avec le diclofénac (Dic) et l'aspirine respectivement, anti-inflammatoires non stéroïdiens de références, à la dose de 100 mg/kg PC. L'évaluation de l'œdème a été suivie par l'enregistrement du diamètre de la patte enflammée 0, 1, 2, 3, 4 et 5 heures (Amezouar *et al.*, 2013) après l'injection de l'agent phlogogène. Pour chaque groupe traité, les diamètres moyens obtenus à ces différents relevés (Dt) ont été comparés à ceux obtenus avant tout traitement (D0), permettant ainsi de calculer les pourcentages d'œdème (pourcentage d'inflammation), à partir de la formule : $(Dt - D0)/D0 * 100$. Tandis que, le pourcentage d'inhibition de l'œdème (% I œdème) a été calculé à partir de la formule :

$$\% \text{ I œdème} = [(Dt - D0)_{\text{témoin}} - (Dt - D0)_{\text{traité}}] / (Dt - D0)_{\text{témoin}} * 100$$

Afin de déterminer exactement si les extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti* possèdent un effet anti-inflammatoire, les rats ont été anesthésiés immédiatement après la dernière mesure du diamètre en utilisant le chloroforme, ensuite le sang a été récupéré à partir de l'œil dans des tubes contenant l'EDTA, puis centrifugé à 3000 tours/minutes pendant 10 minutes pour déterminer le taux de la protéine C réactive (CRP). La vitesse de sédimentation a été également mesurée en utilisant des pipettes à VS.

B. Œdème de l'oreille induit par le xylène

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques par la méthode de l'œdème de l'oreille induit par le xylène a été réalisée selon le protocole décrit par **Li et al. (2008)** avec quelques modifications. Des groupes de cinq rats Wister albinos ont été formés. Les groupes tests ont reçu l'extrait méthanolique de *M. vulgare* et *M. deserti* en raison de 10, 20 et 40 mg/oreille, dissous dans l'eau physiologique, utilisé comme une pommade sur la surface antérieure de l'oreille droite. L'inflammation locale instantanée a été incitée sur la surface postérieure de la même oreille par l'application du xylène (100 µl/oreille) qui provoque immédiatement un signe de l'inflammation (la rougeur).

Le groupe témoin (le contrôle négatif) a seulement reçu le véhicule (l'eau physiologique), tandis que le groupe témoin positif a reçu le diclofénac comme un agent anti-inflammatoire de référence à raison de 10 mg/oreille. Deux heures après l'induction de l'inflammation, les rats ont été sacrifiés et les deux oreilles ont été enlevées. Les sections circulaires (7 millimètres de diamètre) des deux oreilles, la droite (traitée) et la gauche (non traitée) ont été poinçonnées en utilisant un foreur de liège puis elles ont été pesées. L'œdème a été mesuré en tant que différence de poids entre les deux oreilles. Les coupes ont été conservées dans du formol à 10% pour des études histopathologique. L'activité inflammatoire a été évaluée par la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{poids de l'œdème (Témoin)} - \text{poids de l'œdème (Tests)}}{\text{Poids le l'œdème (Témoin)}}$$

B. 1. Etude histopathologique

L'étude histopathologique a été effectuée dans la clinique « d'Ibn-Sina » selon la méthode décrite par **Lamb (1981)**. Les oreilles préalablement conservées dans du formol à 10% pendant 15 jours ont subi des coupes d'une épaisseur de 4 µm à l'aide d'un microtome après leur inclusion à la paraffine. Les oreilles ont été ensuite colorées à l'hématoxyline-éosine fixés entre lame et lamelle avant d'être observées à l'aide d'un microscope muni d'appareil photo à différents grossissements.

C. Induction de la pleurésie chez le rat

La pleurésie induite par la carraghénine chez les rats a été estimée par la méthode de **Cuzzocrea *et al.* (2000)** avec quelques modifications. Dans la présente étude, cinq groupes de six rats ont été formés.

Les rats du groupe contrôle négatif (saine contrôle) ont reçu par injection dans leur cavité pleurale un volume de 0,2 ml de NaCl 0.9% stérile au lieu de la solution de carraghénine et ne sont traités par aucune autres substances. Les rats du groupe enflammé non traité (contrôle positif) ont reçu par voie orale 10 ml/kg de l'eau physiologique une heure avant l'injection intra-pleurale de 0,2 ml de la carraghénine à 1%. Les rats constituant les trois groupes tests enflammés ont été traités par voie orale avec 200 mg/10 ml/kg d'extrait méthanolique de *M. vulgare* ou *M. deserti* ou par le médicament « Diclofénac » à une dose de 100 mg/kg une heure avant l'injection intra-pleurale de 0,2 ml de la carraghénine à 1%. Ensuite, des quantités de 0,2 ml de la carraghénine à 1% ont été injectées dans la cavité pleurale au niveau du sixième espace intercostal droit de chaque rat des groupes enflammés. Quatre heures après l'injection de l'agent phlogogène, les rats ont été sacrifiés par décapitation. Immédiatement, leur cage thoracique est soigneusement ouverte. La cavité pleurale est ensuite rincée par 2 ml de NaCl 0,9 % afin de récupérer l'exsudat qui s'est formé. Le volume de l'exsudat produit par chaque rat est déduit en appliquant la formule suivante :

$$V_{ex} = V_t - V_s$$

V_{ex}: volume de l'exsudat.

V_t : volume total récupéré.

V_s : volume de la solution de lavage (2 ml).

Afin de récupérer les polymorphes nucléaires (PMNs) recrutés dans la cavité pleurale de chaque rat, l'exsudat avec la solution de lavage récupérés dans l'eau physiologique ont subit à une centrifugation à 1000 tpm/10 min à 4°C. Les PMNs ont été alors récupérés dans le culot. Les hématies ont été éliminées par une hémolyse rapide en ajoutant un volume de 1 ml d'eau distillée fraîche. Après 30 secondes, 5 ml de l'eau physiologique ont été ajoutés. La suspension cellulaire a été en suite centrifugée à 1000 tpm/10 min à 4°C par une centrifugeuse « *Sigma* ». Cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'un culot blanc. Après la dernière centrifugation, les PMNs récupérés dans le culot ont été conservés dans la glace. Le nombre de PMNs se trouvant dans l'exsudat a été déterminé par comptage sur une cellule Mallassez (Figure 29).

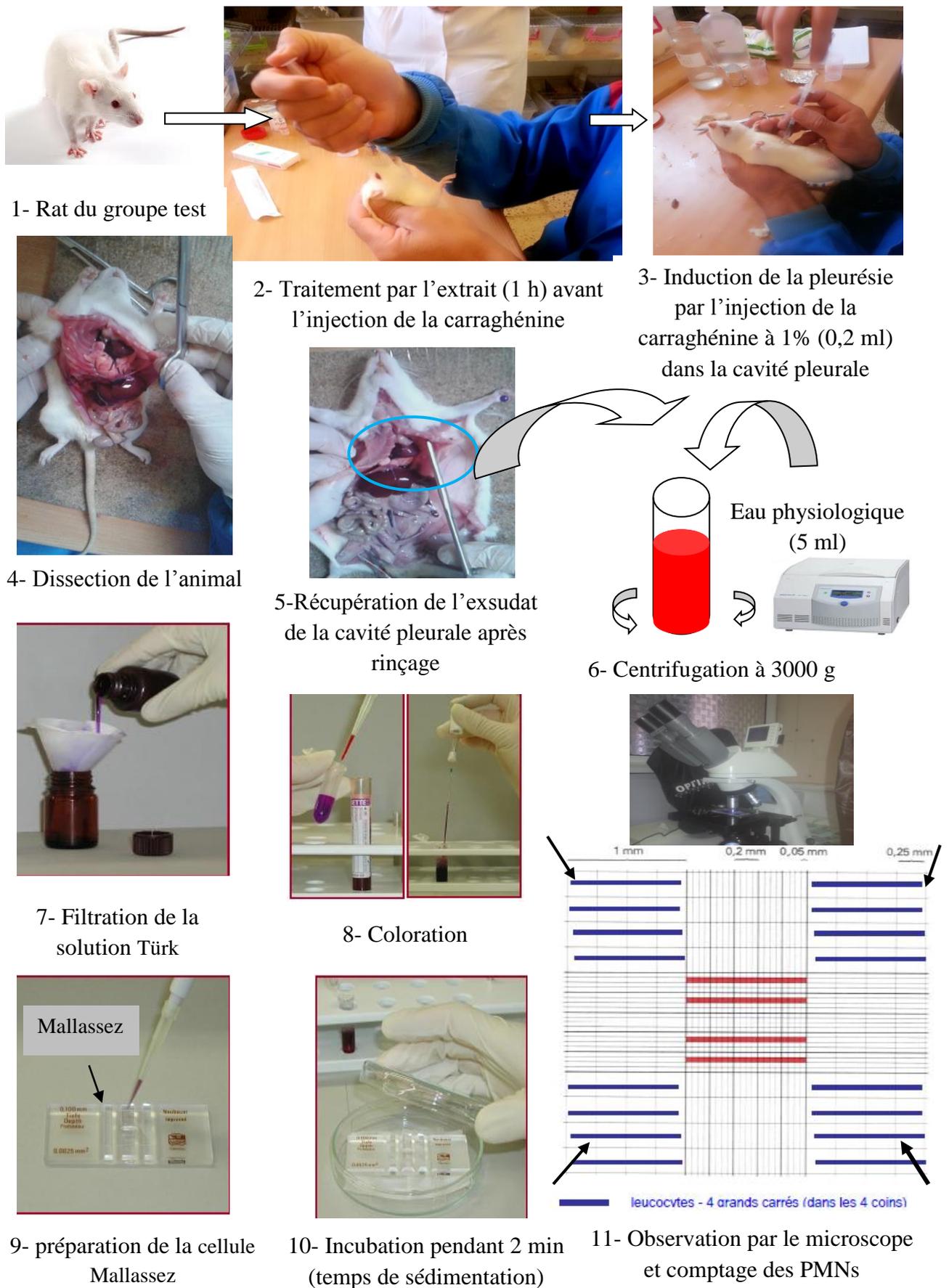


Figure 29. Protocole expérimental de la pleurésie induite chez les rats.

Pour cela, 20 µl de la suspension cellulaire ont été mélangés à 180 µl de la solution Türk (dilution 1/10 ; à 1 µl de sang on ajoute 9 µl de la solution). La solution Türk a été préparée en utilisant 3 ml d'acide acétique glacial (CH₃COOH) dilué avec 97 ml d'eau puis une goutte de colorant « *Gentain violet* » a été ajoutée à cette solution. Les érythrocytes sont hémolysés par l'acide acétique présent dans la solution de Türk et les leucocytes sont colorés par le colorant présent dans cette solution. Le type de cellules souhaité (les leucocytes) a été compté dans un volume défini et le nombre de cellules a été calculé dans un microlitre de sang.

Une goutte de la suspension cellulaire colorée (20 µl) a été enfin déposée à l'aide d'une micropipette (capillaires verre), contre une lamelle montée sur la cellule Mallassez. Les PMNs sont comptés dans les 4 grands carrés de côté de la cellule d'une longueur de 1 mm pour chaque côté à l'aide de l'objectif X10 d'un microscope (*Optika*, Italy). La concentration cellulaire est en suite déduite par la formule suivante :

$$\text{Nombre de leucocytes} = \frac{X \cdot 10 \cdot 10}{4} \left(\text{dilution } \frac{1}{10} \right) = X \cdot 25 \text{ (cellules/}\mu\text{l)}$$

X = somme des cellules comptées dans les 4 grands carrés extérieurs ;

La moyenne des deux doubles dosages donne le résultat.

Les pourcentages d'inhibitions de la migration des PMNs dans la cavité pleurale des rats des groupes tests sont déterminés par rapport au résultat du groupe contrôle enflammé non traité ayant été considéré comme le 100 % de migration en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\text{NC} - \text{NT} / \text{NC}) * 100 \text{ où :}$$

Nc: Nombre de PMNs récupérés dans la cavité pleurale des rats contrôles.

Nt : Nombre de PMNs récupérés dans la cavité pleurale des rats tests.

2. 4. 3. Étude de l'activité analgésique (*Writhing test*)

L'effet antalgique des extraits méthanoliques des deux plantes a été évalué suivant le nombre de contorsions abdominales induites par l'injection intra-péritonéale d'une solution de l'acide acétique (à 1%) selon la méthode décrite par **Sanogo et al. (2006)**. Quatre lots de cinq rats ont été constitués. Le lot témoin négatif a reçu l'eau physiologique, par contre les autres lots tests ont reçu l'extrait méthanolique des deux plantes (400 mg/kg) et le groupe témoin positif a reçu le paracétamol (100 mg/kg). Une heure après administration des extraits,

les animaux ont reçu par voie intra-péritonéale l'acide acétique 1% à raison de 10 ml/kg. Cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre des contorsions a été déterminé pour chaque rat durant 15 minutes. L'effet analgésique a été évalué selon la formule suivante:

$$\% \textit{inhibition} = \left(1 - \frac{W_t}{W_b}\right) * 100$$

W_b : représente la moyenne de nombre des contorsions des rats du lot témoin ;

W_t : est la moyenne de nombre de contorsion des rats des lots traités (Sanogo *et al.*, 2006).

2. 4. 4. Test de l'activité antidiabétique

Avant l'induction du diabète sucré par l'injection de la streptozotocine, il est mieux de tester la tolérance des rats au glucose afin de vérifier l'effet, l'efficacité et le potentiel hypoglycémiant des extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti* d'une part, d'autre part d'arriver à choisir la dose convenable pour réaliser cette activité.

A. Test de tolérance au glucose

L'activité hypoglycémiante a été mesurée afin d'établir précisément la dose la plus puissante des extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti*. Les deux extraits ont été mis en suspension dans une solution de sérum physiologique (NaCl 0.9%) puis administrés à des rats par voie orale (600 mg/10ml/kg) une heure avant le gavage gastrique d'une solution de glucose à la dose de 4 g/kg. Les rats témoins ont été répartis en groupe témoin recevant une solution physiologique, un groupe hyperglycémique recevant une solution de glucose (4 g/kg) et un troisième groupe standard recevant la glibenclamide (médicament hypoglycémiant) à la dose de 5 mg/kg (Elberry *et al.*, 2015) une heure avant l'administration du glucose par voie orale. L'évolution de la glycémie a été faite avant et chaque demi heure sur une période de 2 heures de traitement. La glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre en utilisant des bandelettes de glucose de type « ACCU-CHEK® Active », (Roche ; Merck).

B. Induction du diabète sucré chez les rats

Les rats ont été maintenus à jeun pendant une nuit (privation de la nourriture pendant 16 heures mais pas de l'eau) puis injectés par voie intra-péritonéale avec une solution

fraichement préparée de streptozotocine à une dose de 50 mg/kg de poids corporel. Selon **Elberry et al. (2015)** cette drogue chimique détruit sélectivement les cellules β -pancréatiques des îlots de langerhans. La streptozotocine a été solubilisée dans une solution d'eau physiologique saline stérile.

Après 3 jours, l'hyperglycémie a été confirmée en utilisant un glucomètre « ACCU-CHEK[®] Active ». Seuls les rats avec des taux de glucose sanguin supérieur à 200-300 mg/dl ont été choisis et utilisés dans cette expérience (**Ghlissi et al., 2015**).

Le streptozotocine est capable d'induire une hypoglycémie fatale résulte d'une sécrétion pancréatique massive de l'insuline (**Ghlissi et al., 2015**). Alors, après l'administration de streptozotocine et pour prévenir son effet fatal, les rats ont reçu une solution glucosée à 5 % pendant 48 heures. Généralement, le diabète se stabilise chez les rats après trois jours de l'injection. Après 72 heures de l'administration de streptozotocine, la glycémie a été mesurée à jeun à l'aide d'un glucomètre de type « ACCU-CHEK[®] Active ».

C. Protocole du traitement des animaux

Dans la présente étude, 25 rats femelles *Wistar albinos* (130-180 g) ont été utilisés. Cinq groupes à cinq rats chacun ont été formés. Les rats du groupe normal contrôle (NC : le placebo) ont reçu 10 ml/kg d'eau physiologique 0,9% *per os*, et une fois par jour pendant deux semaines et ne sont traités par aucune autre substance. Les rats du groupe diabétique control (DC) ayant été injectés par la STZ ont reçu 10 ml/kg d'eau physiologique 0,9% *per os* quotidiennement et une fois par jour pendant deux semaines. Les rats constituant les trois groupes tests diabétiques ont été traités quotidiennement par voie orale avec 600 mg/10 ml/kg d'extrait méthanolique des feuilles et des sommités fleuries de *M. vulgare* ou *M. deserti* ou par le médicament « le glibenclamide » à une dose de 5 mg /10ml/kg et une fois par jour pendant deux semaines.

Les rats ont été maintenus à température ambiante à raison de 3 à 4 rats par cage avec accès libre à l'eau et à la nourriture. L'évolution de la glycémie à jeun, ainsi le poids des rats des différents groupes a été contrôlée dès le premier jour du traitement et hebdomadairement jusqu'à la fin du traitement. Il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots chaque semaine selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par kg du poids corporel. Le sang a été prélevé de l'extrémité de la queue du rat avant l'administration d'extraits pour la détermination de la glycémie en utilisant un glucomètre « ACCU-CHEK[®] Active ». Les résultats sont exprimés en termes de milligramme par décilitre de sang. Le pourcentage de diminution de la glycémie a été calculé de la manière suivante :

% de diminution de la glycémie = [(glycémie finale – glycémie initiale) / glycémie initiale] × 100.

- ✓ (+) : indique une augmentation de la glycémie.
- ✓ (-) : indique une diminution de la glycémie.

D. Dosages biochimiques sanguins après sacrifice

A la fin des 16 jours du traitement, les rats ont été sacrifiés le matin à jeun. Le sang a été immédiatement recueilli dans des tubes et mise a une centrifugation à 6000 tours / minute pendant 15 minutes, le sérum a été séparé puis stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour le dosage des différents paramètres biochimiques. Les concentrations de glucose, cholestérol, triglycérides, HDL, LDL, protéines totales, TGO, TGP, urée et créatinine ont été mesurées. Tous les paramètres ont été dosés selon la fiche technique « *Spinreact* ». Les dosages enzymatiques ont été effectués au niveau d'un laboratoire privé de « GOUAREF » en utilisant un auto-analyseur (automate) de type « *COBAS* » INTEGRA 400 plus.

2. 5. Analyse statistique

L'étude statistique est réalisée à l'aide du logiciel « Graph Pad Prism 5 » en utilisant le test ANOVA one-way suivie du test de Tuckey/Dunnett. Pour l'étude *in vitro*, les résultats son exprimés en moyenne ± SD (déviation standard; n = 3). Pour les tests *in vivo*, les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (n = 5). Les différences sont considérées significatives à * $P \leq 0,05$ (seuil de signification), hautement significatives à ** $P \leq 0.01$ et très hautement significative à *** $P \leq 0.001$.

Chapitre III:
Résultats et Discussion

1. Rendement des extraits de *Marrubium vulgare* et *Marrubium deserti* de Noé

L'extraction par la macération à permet d'obtenir des différents extraits selon le solvant utilisé. La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport à la poudre sèche sont représentés dans les Tableaux 6 et 7.

Tableau 6. Couleurs, aspects et rendements des extraits des feuilles sèches et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* par différents solvants de polarité croissante.

<i>Extraits</i>	<i>Couleur</i>	<i>Aspect</i>	<i>Rendement %</i>
EEp	Vert olive	Huileux	2,1
EDCM	Noir	Huileux	5,28
EBuOH	Vert foncé	Visqueux	8,7
EMeOH	Vert foncé	Pâteux	10,9
EAQ	Couleur de miel	Poudre	12,98

Tableau 7. Couleurs, aspects et rendements des extraits des feuilles sèches et des sommités fleuries de *Marrubium deserti* par différents solvants de polarité croissante.

<i>Extraits</i>	<i>Couleur</i>	<i>Aspect</i>	<i>Rendement %</i>
EEp	Vert olive	Huileux	4,65
EDCM	Noir	Huileux	15,53
EBuOH	Vert foncé	Visqueux	8,35
EMeOH	Vert foncé	Pâteux	9,10
EAQ	Couleur de miel	Poudre	12,04

Les résultats présentés dans les Tableaux 6 et 7 montrent que l'extrait aqueux (EAQ) lyophilisé donne le rendement le plus élevé (12,98 %) pour la plante *M.*

vulgare, alors que pour la plante *M. deserti*, c'est l'extrait dichlorométhanique (EDCM) qui présente le rendement le plus important (15,53 %). Ce résultat est probablement dû au fait que la plante *M. deserti* de Noé est riche en huiles essentielles ayant été solubilisés dans les solvants non polaires. De nombreux chercheurs ont révélé que la plante *M. deserti* de Noé contient des teneurs plus élevées en huiles volatiles que la plante *M. vulgare* qui peuvent maintenir probablement la plante contre la sécheresse du Sahara (Laouar *et al.*, 2009).

Les deux solvants utilisés pour extraire les composés phénoliques, le méthanol et le *n*-butanol, sont de polarités très proches. Les résultats montrent que le rendement d'extraction avec le méthanol est légèrement élevé : (9,10 % ; 10,9 %) par rapport à (8,35 % ; 8,70 %) pour le *n*-butanol. Tandis que, l'extraction à l'éther de pétrole, qui a pour but de délipider la matière végétale, a conduit à un rendement faible de l'ordre de 2,1 % à 4,65 % pour les deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* respectivement.

Les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites, tandis que les solvants apolaires n'ont pas cette capacité à cause de la présence de l'eau probablement, contenu dans le tissu végétal, de part sa non miscibilité dans les solvants apolaires, constitué un obstacle au cheminement du solvant au sein du solide et freine donc la diffusion.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres chercheurs, en effet, Stanković (2011) a préparé cinq extraits, un à l'acétone, un à l'acétate d'éthyle, un à l'éther de pétrole et deux extraits polaires (aqueux et méthanolique) à partir de la plante *Marrubium peregrinum* et a montré que les solvants polaires, le méthanol et l'eau permettait d'atteindre un meilleur rendement de l'ordre de $1,98 \pm 0,082$ g pour le méthanol et $1,54 \pm 0,094$ g pour l'eau, alors que l'extraction à l'éther de pétrole conduisait à un rendement limité de $0,15 \pm 0,014$ g.

Anandharajan *et al.* (2006) ont effectué l'extraction progressive de poudres sèches d'*Aegles marmelos* et *syzygium cumini* avec des solvants de polarité croissante: hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol. Ces auteurs ont obtenus des rendements de l'ordre de 0,1 à 0,15 % pour les extractions à l'hexane et au dichlorométhane et de 2 % pour les extractions au méthanol et à l'acétate d'éthyle. Ces

mêmes chercheurs ont montré que le taux de l'extraction s'augmente si ces solvants sont mixés avec l'eau. Ce comportement peut être expliqué par le fait que la présence de l'eau (ayant un moment dipolaire plus fort que celui des alcools) déstabilise les parois cellulaires. En conséquence, en pénétrant plus profondément dans la matrice végétale, le solvant peut entrer au contact avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi l'extraction (**Anandharajan et al., 2006**).

Le rendement d'extraction varie ainsi en fonction de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés, notamment leur polarité. La solubilité des substances contenues dans la matière végétale dans un solvant donné dépend de ces propriétés. Les rendements d'extraction varient également en fonction de la plante étudiée, comme le montrent les résultats obtenus par **Kansole (2009)**, qui a comparé les différents rendements d'extraction (obtenus par le méthanol) à partir de trois plantes (en utilisant la même quantité 25 g) : *Leucas martinicensis* (Jacquin), *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth et *Hoslundia opposita* Vahl qui donnent respectivement 15,12 %, 13,49 % et 11,78 % malgré que ces trois espèces appartiennent à la même famille (*Lamiaceae*).

Il s'ensuit, que le rendement d'extraction et la composition des extraits varient d'un solvant à l'autre et d'un végétal à l'autre, la période et lieu de la récolte, la durée de séchage, le climat, la composition biochimique de la plante à savoir leurs teneurs en métabolites secondaires, l'organe ciblé influencent aussi (**Hadj-Salem, 2009**).

La méthode d'extraction peut influencer elle-même sur le rendement d'extraction. On peut citer par exemple les travaux d'**Erdogan-Orhan et ses collaborateurs (2010)** qui ont réalisé deux extractions : une par lixiviation à chaud (percolation type Soxhlet 8 à 12 h) et l'autre par macération (48 h) de *M. vulgare* en utilisant comme solvant « l'acétone », ces chercheurs ont obtenu un rendement de 6,6 % dans le cas de Soxhlet et 3,2 % dans le cas de la macération. Cela est expliqué probablement par l'effet que l'efficacité de l'extraction au Soxhlet est liée au fait que le solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage, alors que dans le cas de la macération, le solvant utilisé pour l'extraction de la matière végétale peut arriver à un certain degré de saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé, pour cette raison l'extraction au Soxhlet est plus rentable que l'extraction à la macération.

Une autre étude établie par **Herzi (2013)** qui a comparé les performances des procédés traditionnels (macération, extraction au Soxhlet) et l'extraction par solvant organique aux nouvelles technologies d'extraction (extraction au CO₂ supercritique et à l'eau sub-critique), a révélé les avantages des nouvelles technologies d'extraction par rapport aux traditionnelles sur le plan temps et rendement. C'est dans ce contexte que **Mittal et Manda (2017)**, ont montré que le rendement de l'extraction de la marrubiine obtenu par la méthode assistée par micro-ondes est presque doublé par rapport à la méthode traditionnelle de Soxhlet ($0,69 \pm 0,08$ à $1,35 \pm 0,04\%$).

Il convient de signaler que la macération par différents solvants à polarité croissante réalisée dans la présente étude permet de séparer les constituants selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. L'avantage de cette méthode c'est qu'elle permet l'extraction des métabolites à une température ambiante, ce qui arrive à extraire des molécules bioactives intactes et leurs structures ne subissent aucune modification ou dénaturation probable.

2. Analyse des extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*

2. 1. Test qualitatif des extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*

2. 1. 1. Criblage phytochimique des extraits (Tests préliminaires)

Les tests phytochimiques réalisés dans ce travail sur les extraits des deux plantes révèlent la présence de plusieurs métabolites secondaires surtout dans l'extrait méthanolique, les résultats sont résumés dans le Tableau 8.

Nos résultats montrent ainsi que les extraits méthanoliques, butanoliques, dichlorométhaniques et aqueux des deux plantes contiennent les flavonoïdes et les polyphénols. Les tanins galliques et catéchiques, les saponosides, les terpénoïdes et les stérols, les alcaloïdes et les anthraquinones sont aussi détectés dans nos extraits. **Bouterfas et al. (2016)** ont révélé également la présence de ces métabolites dans les extraits de *M. vulgare*, mais pas de coumarines. **Fayyad et al. (2014)** ont révélé la présence des flavonoïdes aglycones et des stéroïdes dans tous les extraits de *M. vulgare* sauf l'extrait hexanique. Les mêmes auteurs suggèrent la présence des carbohydrates, des saponines dans l'extrait d'acétate d'éthyle, des tanins dans l'extrait butanolique alors que les terpénoïdes et les anthraquinones ont été détectés dans l'extrait hexanique de *M. vulgare*.

Tableau 8. Les molécules bioactives révélées dans les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* par les tests de criblage phytochimique.

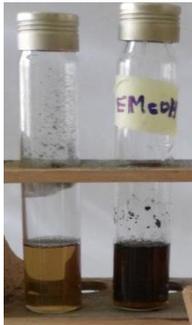
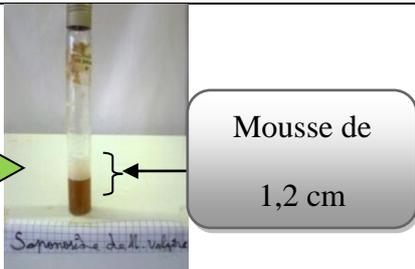
Molécules bioactives	Résultats obtenus									
	<i>M. vulgare</i>					<i>M. deserti</i>				
	EEp	EDcM	EBuOH	EMeOH	EAQ	EEp	EDcM	EBuOH	EMeOH	EAQ
Alcaloïdes	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Flavonoïdes	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Mucilage	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Saponosides	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Anthra-quinones	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Tanins galliques	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Tanins catéchiques	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Terpénoïdes	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
Coumarines	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quinones libres	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
polyphénols	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : Résultat positif

(-) : Résultat négatif

Les tests de criblage chimique ont été effectués pour mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines molécules qui peuvent être responsables des activités biologiques étudiées. Le Tableau 9 représente les principaux métabolites détectés dans les extraits des deux plantes.

Tableau 9. Les principaux métabolites secondaires détectés dans les extraits des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti*.

Métabolites secondaires et test de criblage	Résultats		Extrait(s)
	Durant le traitement	Après le traitement	
<p>Flavonoïdes (flavonols)</p> <p>« <i>Shibata test</i> »</p>			<ul style="list-style-type: none"> - EMeOH - EAQ - EBUOH
<p>Tannins gallique et catéchique</p> <p>« <i>FeCl₃ test</i> »</p>			<ul style="list-style-type: none"> - EMeOH - EAQ
<p>Stéroïdes et terpénoïdes</p> <p>« <i>Lieberman-Burchard's test</i> »</p>			<p>EDcM de <i>M. deserti</i></p>
<p>Saponosides</p> <p>« <i>Indice de mousse</i> »</p>		 <p>Mousse de 1,2 cm</p>	<ul style="list-style-type: none"> - EAQ de <i>M. vulgare</i> et <i>M. deserti</i>

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés au paravent par (Akther *et al.*, 2013; Fayyad *et al.*, 2014 ; Bouterfas *et al.*, 2016). Bien qu'on n'a pas fait une caractérisation pour tous les métabolites présents dans les plantes, pour cela on a fait une comparaison entre les résultats obtenus dans ce travail avec ceux dotés dans la littérature (Tableau 10).

Tableau 10. Caractérisation d'après une comparaison de tous les métabolites possibles de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Molécules bioactives	Travaux personnels	(Akther <i>et al.</i> , 2013)	(Moussaid <i>et al.</i> , 2012)
Flavonoïdes	+	+	+
Polyphénols	+	+	/
Tanins	+	+	+
Saponines	+	+	+
Coumarines	-	/	/
Alcaloïdes	+	+	+
Terpènes et stérols	+	+	+
Quinones libres	+	/	+
Anthra-quinones	+	/	/
Mucilages	+	/	/
Carbohydrates	/	/	+

+ : présent ;

- : Absent

/ : Non déterminé.

2. 1. 2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM par son emploi simple et son coût modeste est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. Dans le présent travail, il s'agit d'identifier et de séparer les différents constituants des extraits de sommités fleuries ainsi que les feuilles de *M. vulgare* et *M. deserti* de Noé. L'utilisation de divers solvants à polarités différentes a permis de séparer les différents composés des deux plantes selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction.

Les résultats des chromatogrammes de la chromatographie sur couche mince des extraits apolaires de *M. vulgare* et *M. deserti* sont illustrés dans les Figure 30, 31 respectivement. Les rapports frontaux des extraits utilisés (EEp, EDCM) de *M. vulgare* et *M. deserti* sont représentés dans les Tableaux 11, 12 respectivement. Dans le cas des solvants apolaires les standards sont éliminés car il s'agit de substances polaires qui ne migrent pas dans le système de migration apolaire utilisé.

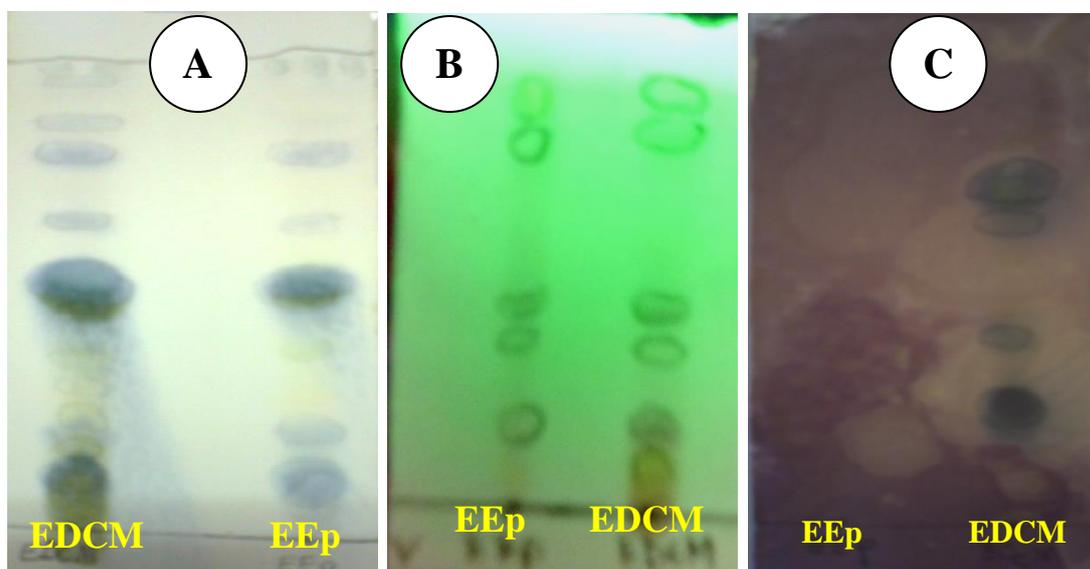


Figure 30. Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires (EEp, EDCM) des feuilles et des sommités fleuries de *M. vulgare* dans le système éther de pétrole/ acétate d'éthyle (80/20; v/v).

- A) révélation par la vanilline sulfurique; B) observations sous UV₂₅₄
C) révélation par une solution méthanolique de DPPH (2 mg/ml).

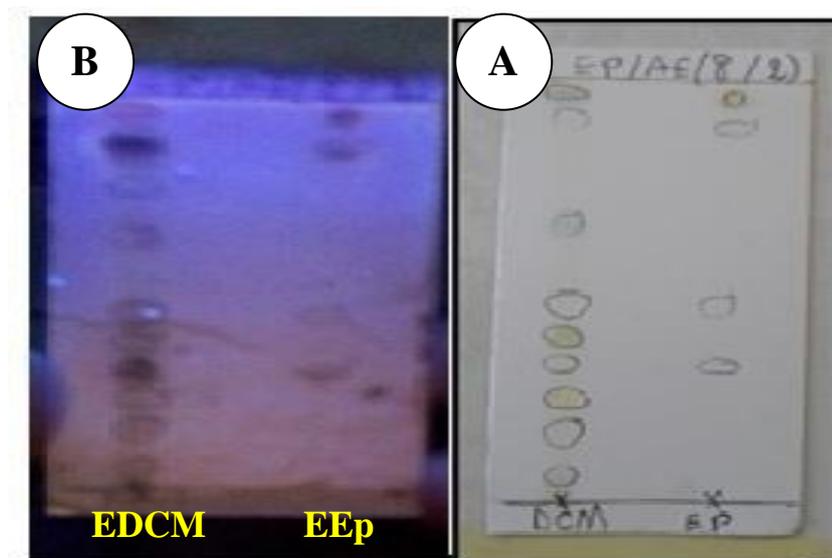


Figure 31. Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires (EEp, EDCM) des feuilles et des sommités fleuries de *M. deserti* dans le système éther de pétrole/ acétate d'éthyle (80/20; v/v).

(A) : après une révélation par la vanilline sulfurique ;

(B) : observations sous fluorescences en UV₃₆₆.

Tableau 11. Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits apolaires des feuilles et des sommités fleuries de *M. vulgare*.

<i>Extraits</i>	<i>Révélation par la vanilline sulfurique</i>	<i>Révélation par DPPH (2mg/ml)</i>
EEp	0,10 / 0,14 / 0,22 / 0,48 / 0,60 / 0,78	/
EDCM	0,97 / 0,91 / 0,87 / 0,77 / 0,62 / 0,48 / 0,18 / 0,06	0,18 / 0,48 / 0,62 / 0,77
Couleur	Toutes les taches ont une couleur Violette	Violet (absence de couleur jaune : (réaction -)

Tableau 12. Rapports frontaux des spots issus de la séparation des extraits apolaires des feuilles et des sommités fleuries de *M. deserti*.

Les extraits apolaires	Vanilline sulfurique	UV 254 nm	UV 366 nm
EEp	Rf ₁ = 0,30	visible	violet
	Rf ₂ = 0,45	visible	-
	Rf₃ = 0,87	visible	violet
	Rf ₄ = 0,95	visible	violet
EDCM	Rf ₁ = 0,15		Noir
	Rf ₂ = 0,24	visible	Violet
	Rf ₃ = 0,31	visible	Bleu sombre
	Rf ₄ = 0,37	visible	-
	Rf ₅ = 0,45	visible	-
	Rf ₆ = 0,65	visible	Noir
	Rf ₇ = 0,78		-
	Rf ₈ = 0,90	visible	-
	Rf ₉ = 0,96	visible	-

L'examen par CCM des extraits apolaires, après révélation par la vanilline sulfurique montre une série de taches dont l'une présente dans l'EDCM (Rf : 0,87) qui pourrait correspondre à la marrubiine, comme le montre le résultat d'analyse par CCM d'après **Knöss et ses collaborateurs (1997)** qui ont utilisé comme système de migration : chloroforme/méthanol (95 : 5 ; V/V). Ces auteurs ont suggéré après la pulvérisation de la plaque CCM par la vanilline sulfurique que ce composé a un Rf de 0,87. **Zaabat et al. (2011)** ont détecté également la présence de la marrubiine dans l'extrait dichlorométhanique de *Marrubium deserti*. En outre, **Hannebelle (2006)** a révélé la présence du même composé dans l'EDCM de *Marrubium peregrinum*.

La révélation de la plaque CCM par la solution méthanolique de DPPH est une méthode de criblage qui permet l'obtention de renseignements préliminaires sur l'activité antioxydante des différents composants des extraits testés.

Les composés actifs sont visualisables comme des taches jaunes sur un fond violet. Dans notre cas, les deux extraits (EDCM, EEp) présentent une réaction négative, autrement dit les taches qui ont été obtenues dans l'EDCM et l'EEp sont incapables de réduire le radical DPPH• ayant une couleur violet en DPPH-H de couleur jaune. Cela peut être expliqué par deux effets : soit que ces substances n'ont pas tout à fait cette activité antiradicalaire, soit que la concentration de ces substances est très faible pour que l'on puisse détecter leurs activités sur la plaque de CCM. Toutefois, ce résultat négatif obtenu ne doit pas exclure la présence de molécule(s) active(s) dans nos extraits.

Les extraits apolaires (EEp et DCM) de la partie aérienne de *Marrubium deserti* ont montré après l'observation à l'UV (254 - 366 nm) et la révélation par la vanilline sulfurique leur richesse en constituants chimiques. A 254 nm, la majorité des spots sont visibles. A 366 nm, les spots apparaissent en rouge et en violet. Après révélation par la vanilline sulfurique, quelques spots comme dans l'EDCM $R_{f1} = 0,15$ et $R_{f3} = 0,31$ apparaissent en rouge et en bleu sombre, signalent probablement la présence de la chlorophylle.

Selon **Bruneton (1993)**, la fluorescence à 366 nm pourrait indiquer la présence des coumarines, des stéroïdes ou des terpénoïdes. **Sanogo et al. (2006)** ont signalé la présence de tâches fluorescentes à l'UV 366 nm dans l'extrait éther de pétrole de *Maytenus senegalensis* avec le système de solvants (Hexane : Acétate d'éthyle). D'autres spots de couleurs variées (violet foncé, rose et vert-bleu) sont également observés à 366 nm. Ces couleurs constituent une indication sur la présence de plusieurs types de substances chimiques.

Quelques spots ont donnés après la révélation par la vanilline sulfurique des tâches de couleur jaune comme le spot à $R_{f1} = 0,30$ de l'EEp et le spot à $R_{f7} = 0,78$ indique probablement la présence des flavonoïdes.

Afin d'analyser les extraits polaires de *M. vulgare* et *M. deserti* par CCM en utilisant le système solvant CMW, nous avons employé les standards suivants dont les R_f sont présentés dans le tableau 13 : l'acide gallique (AG), l'acide tannique, l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB), l'acide trans-cinnamique (TC), la quercétine (Que), sophorine (la rutine : Rut) et le kaempférol (K).

Tableau 13. Rapports frontaux des standards dans le système CMW (60:35:5 ; v/v/v).

Standards	Vanilline sulfurique	UV 254	UV 366
Quercétine	Rf _{Que} = 0,69	Visible	Jaune
Acide gallique	Rf _{AG} = 0,86	Visible	Rouge
Rutine	Rf _{Rut} = 0,62	Visible	Jaune
Kaempférol	Rf _K = 0,66	Visible	Rouge
4-hydroxybenzoïque	Rf _{4-HB} = 0,92	Visible	Bleu
trans-cinnamique	Rf _{TC} = 0,89	Visible	-
Acide tannique	Rf _T = 0	Invisible	-

Les résultats de l'analyse par CCM des extraits polaires de *M. vulgare* sont présentés dans la Figure 32. Les Rfs correspondant aux spots détectés sont calculés et les valeurs ont été exprimées dans le Tableau 14.

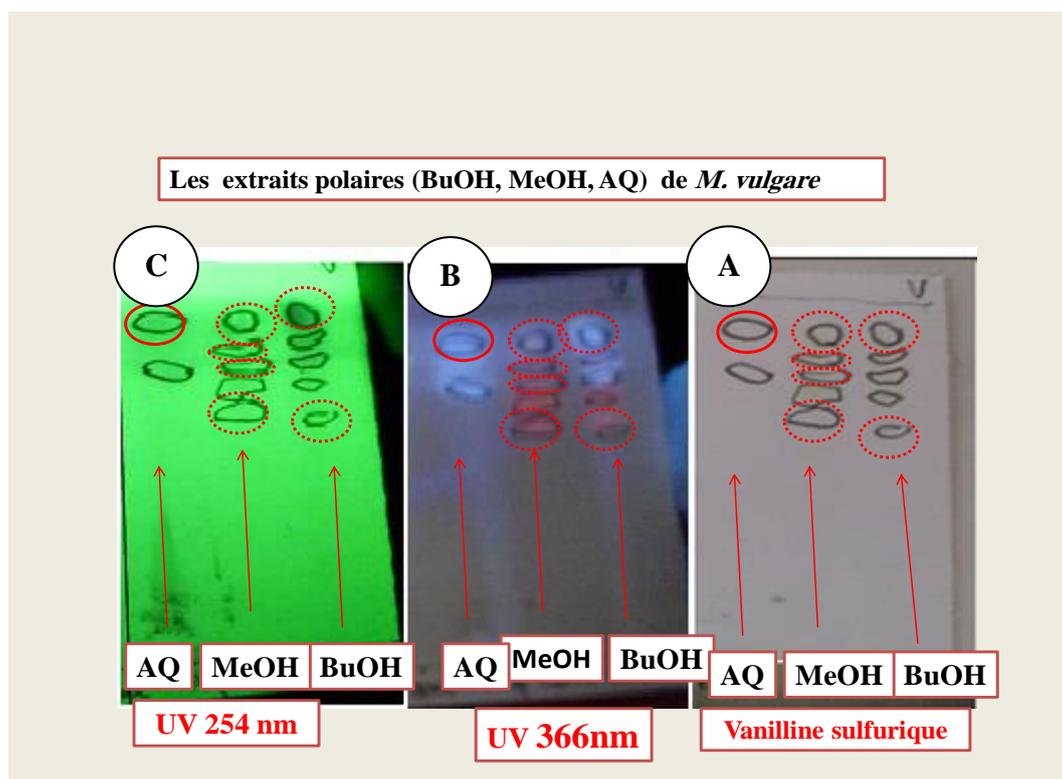
Tableau 14. Résultats de la CCM des extraits polaires des feuilles de *M. vulgare* dans le système chloroforme/méthanol/eau (60:35:5; v/v/v).

Les extraits	Vanilline sulfurique	UV 254 nm	UV 366 nm
EBuOH	Rf ₁ = 0,89*	visible	Blanche
	Rf ₂ = 0,80	visible	Rose
	Rf ₃ = 0,77	visible	Blanche
	Rf ₄ = 0,72	visible	Rouge
	Rf ₅ = 0,66*	visible	Jaune
	Rf ₁ = 0,92*	visible	Blanche
	Rf ₂ = 0,89*	visible	Rose

EMeOH	$Rf_3 = 0,86^*$	visible	Rose
	$Rf_4 = 0,69$	visible	Rouge
	$Rf_5 = 0,62^*$	visible	Jaune
EAQ	$Rf_1 = 0,89^*$	visible	Blanche
	$Rf_2 = 0,77$	visible	Blanche

Après la comparaison entre les Rfs des différents standards et ceux des spots issus de la séparation des extraits, nous avons constaté la présence probable de la quercétine ($Rf = 0,69$), la rutine ($Rf = 0,62$), l'acide gallique ($Rf = 0,86$), l'acide trans-cinnamique ($Rf = 0,89$) et l'acide 4-hydroxybenzoïque ($Rf = 0,92$) dans l'extrait méthanolique. Deux tâches apparaissent dans l'extrait butanolique avec des Rfs de 0,66 et $Rf = 0,89$ correspondent probablement au kaempférol et l'acide trans-cinnamique respectivement.

Dans un travail antérieur, nous avons rapporté la présence de l'acide gallique et de la quercétine (Rf de 0,80 et 0,64 respectivement) dans l'extrait méthanolique de *M. vulgare* après analyse par CCM en utilisant le système solvant BAW (Ghedadba *et al.*, 2014). L'acide gallique ($Rf : 0,86$) serait présent dans le même extrait élué par le système chloroforme/méthanol/eau (65/35/5; v/v/v).



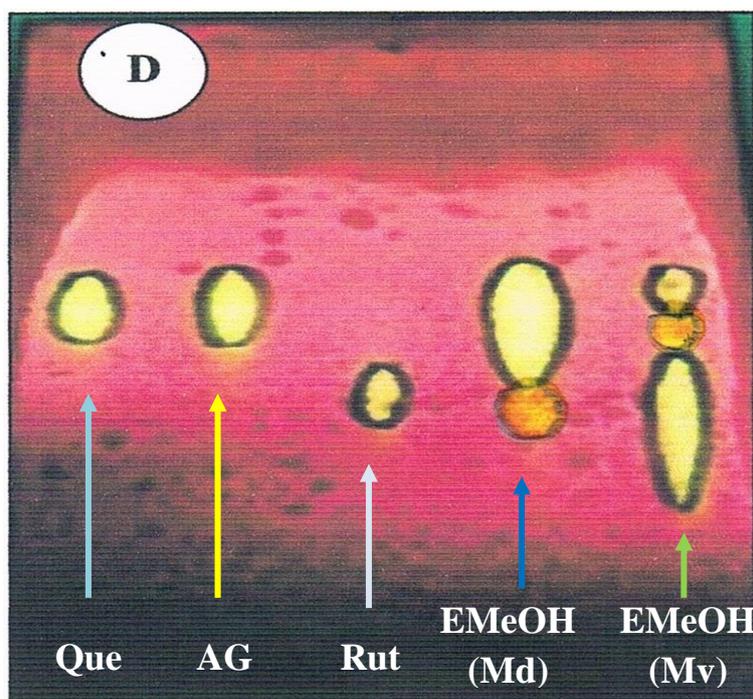


Figure 32. Chromatographie sur couche mince des extraits polaires (EMeOH, EBUOH, EAQ) issus des feuilles et des sommités fleuries de *M. vulgare* développée par deux systèmes: *n*-butanol/acide acétique/eau (60/15/25; v/v/v) et chloroforme/méthanol/eau (65:35:5; v/v/v).

(A) : après une révélation par vanilline sulfurique. (B) observations sous fluorescences en UV₃₆₆ des extraits polaires de *M. vulgare*; (C) : révélation sous UV 254 nm; (D) : révélation par une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Après la révélation par la vanilline sulfurique, la comparaison des Rf des spots issus de la séparation des extraits avec ceux des standards utilisés permet d'avoir une idée sur les composés présents dans les feuilles et les sommités fleuries de *M. vulgare* et *M. deserti*. L'acide gallique, la quercétine et rutine (Rf : 0,86 ; 0,69 ; 0,62 respectivement) seraient présents dans l'EMeOH élué par le système Baw. L'acide gallique (Rf : 0,86) serait présent dans le même extrait élué par le système chloroforme/méthanol/eau (65/35/5; v/v/v).

La révélation de la plaque par la solution méthanolique de DPPH (2 mg/ml) de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* a permis de visualiser trois spots actifs de couleur jaune intense (réaction +) (Rf : 0,8 ; 0,7 et 0,62) dans le système CMW. Ces spots correspondraient à l'acide gallique, la quercétine et la rutine respectivement.

Cela signifie que les deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* possèdent une activité antioxydante par leur capacité de réduire le radical DPPH. En effet, l'apparition des tâches jaunes est expliquée par la présence des antioxydants qui interagissent avec le radical libre DPPH• par donation d'un électron ou d'un atome d'hydrogène ce qui entraîne leur transformation en composé jaune qui est l' α -diphényl- β -picryl hydrazine (DPPH-H) (Kadri *et al.*, 2011). L'activité antioxydante de nos extraits serait due soit aux flavonoïdes comme la quercétine et rutine, soit que l'activité antioxydante est probablement le résultat de la présence des acides phénoliques comme l'acide gallique. Peu de données bibliographiques concernant les flavonoïdes des feuilles de *M. vulgare* et *M. deserti* sont disponibles.

Nawwar *et al.* (1989) indiquent que les feuilles de *M. vulgare* sont très riches en lactoyl (2-hydroxypropionyl) flavone, 7-lactoyl-lutéoline et leur 2''-O-glucuronide et 2''-O-glucoside, apigénine 7-(6''-p-coumaroyl) glucoside, vicénine II, vitexine et chrysoeriol, 5,7,3',4'-tétrahydroxy-7-O-lactoylflavone : (lutéoline-7-lactate), 5,7,4'-trihydroxy-7-O-lactoylflavone : (apigénine-7-lactate) et lutéoline 7-[2- glucuronosyl lactate]. Alkhatib *et al.* (2010) et Pukalskas *et al.* (2012) ont pu isoler un nouveau flavonoïde à partir de *M. vulgare* : "ladanéine", sa structure a été identifiée comme : (5,6-dihydroxy-7-4'-diméthoxyflavone).

D'autre part, toutes les plantes du genre *Marrubium* sont riches en polyphénols, Wojdylo *et al.* (2007) ont sélectionné 32 plantes médicinales et ont cherché sur le contenu de ces plantes en acides phénoliques en utilisant l'HPLC-RP (chromatographie liquide à haut performance en phase inverse) avec comme phase mobile un système gradient. Parmi les 32 plantes analysées, Wojdylo *et al.* (2007) ont démontré la richesse de *Marrubium vulgare* en acides phénoliques, surtout en acide caféique, l'acide p-comarique et l'acide ferulique.

Djeridane *et al.* (2010) ont étudié 18 plantes médicinales en Algérie, parmi lesquelles la plante *Marrubium deserti* et ont cherché la composition de ces plantes en acides phénoliques et en flavonoïdes en utilisant l'HPLC-RP toujours avec comme phase mobile un système gradient. Ces auteurs ont montré que la plante *M. deserti* est très riche en dérivés de l'acide hydroxy-cinnamique, en dérivés de l'acide hydroxy-benzoïques ainsi qu'en flavonoïdes.

Notre présent travail a révélé la probabilité de la présence de l'acide gallique (Rf = 0,85), de la quercétine (Rf = 0,68), de la rutine (Rf = 0,61), de kaempférol 3-O-glucoside (Rf = 0,48) dans l'EMeOH de *M. deserti* de Noé après analyse par CCM et

révélation par l'UV à 254-366 nm et le réactif de Godin en utilisant le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:5 ; v/v/v) comme une phase mobile (Figure 33).

Ces composés phénoliques ont été mis en évidence et purifiés à partir de différentes variétés. En effet, **Rigano et al. (2009)** ont identifié et purifié 11 flavonoïdes à partir de l'extrait au méthanol de la plante *Marrubium globosum* dont le kaempférol-3-*O*-glucoside et la quercétine.

L'analyse chromatographique offre une idée, d'une part sur quelques constituants pourraient être rencontrés dans les plantes (comme l'acide gallique, quercétine, rutine) et d'autre part sur l'activité qui pourrait être exercée par ces métabolites comme l'activité antioxydante (détectée dans l'EMeOH). Cependant, ce type d'analyse présenterait des contraintes lorsque deux molécules isomères possèdent le même R_f comme pour l'isorhamnétine-3-*O*-robinobioside qui est un isomère de l'isorhamnétine-3-*O*-rutoside (**Hadj-Salem, 2009**). Ces deux molécules seront donc difficilement séparables par la méthode chromatographique. En outre, cette technique est qualitative ne donne aucune idée sur la quantité de la substance représentée par la tâche obtenue après la séparation.

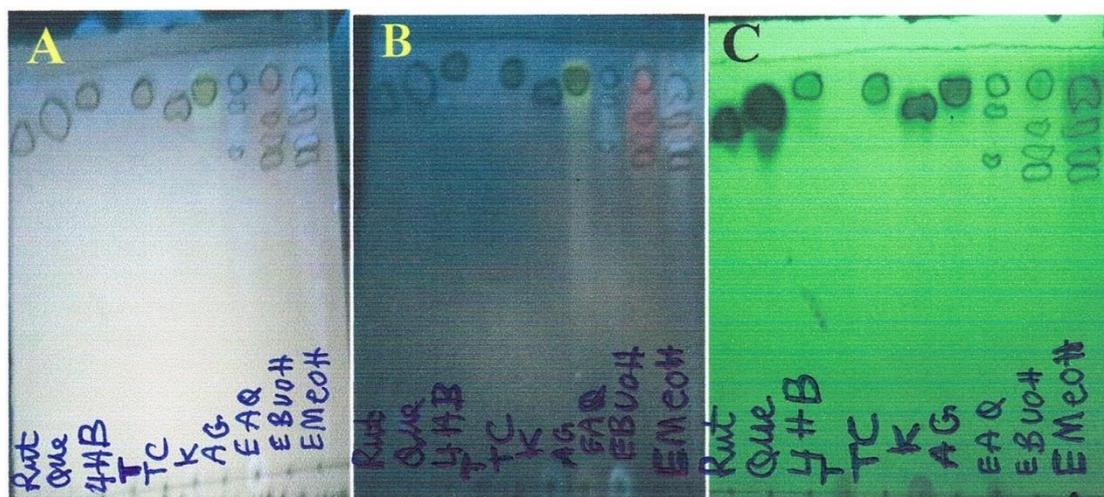


Figure 33. Chromatographie sur couche mince des extraits polaires issus des feuilles et des sommités fleuries de *M. deserti* développée par le système chloroforme/méthanol/eau (65:35:5; v/v/v).

- A. Révélation par la vanilline sulfurique, B. Révélation sous UV 365 nm ;
C. Révélation sous UV 254 nm.

2. 2. Analyse quantitative des extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*

Afin d'obtenir des renseignements sur la concentration exacte de quelques principes actifs présents dans les extraits, un dosage quantitatif a été établi, les molécules bioactives dosées sont les flavonoïdes, les polyphénols, les flavonols et les tannins, car ce sont des molécules largement répandues dans le règne végétal et sont responsables de la plupart des activités biologiques étudiées.

2. 2. 1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode de Folin Ciocalteu en suivant le protocole décrit par **Wong *et al.* (2006)**, l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales (**Abdel-Hameed, 2009**), en utilisant comme standard l'acide gallique dont la concentration a été établie en ($\mu\text{g/ml}$). L'absorbance x de chaque extrait a été déterminée par spectrophotométrie visible à une longueur d'onde de 765 nm. La teneur en polyphénols totaux des différents extraits préparés à partir de *M. vulgare* et *M. deserti* est déduite à partir de la droite d'étalonnage établie par l'acide gallique (Figure 34), la valeur de concentration obtenue est exprimée en mg EAG/g d'extrait.

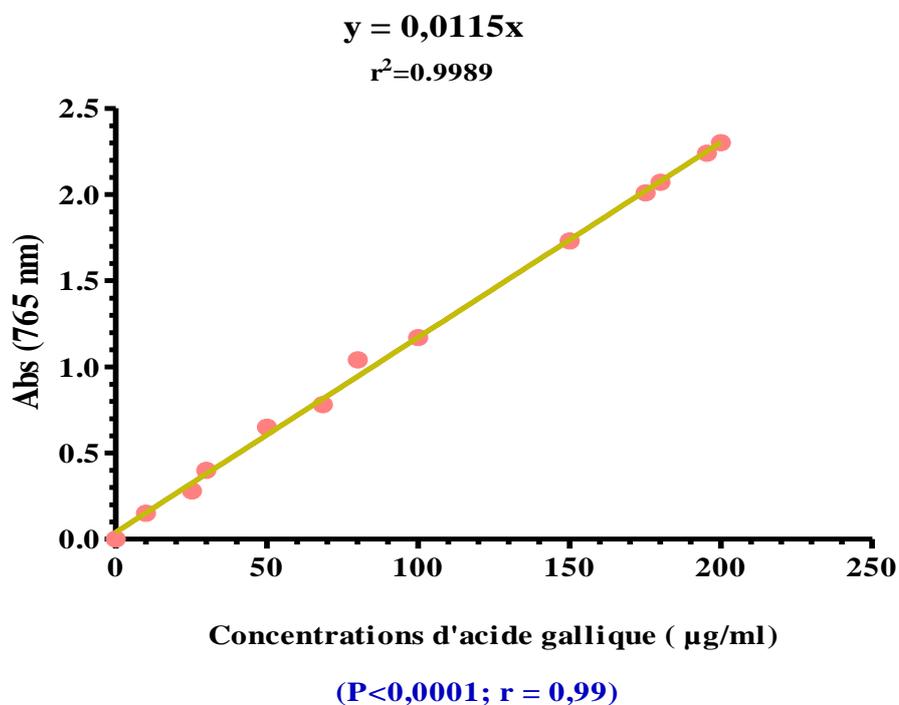


Figure 34. Droite d'étalonnage de l'acide gallique

(Les valeurs sont une moyenne \pm SD de trois essais).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux dans les extraits des plantes *M. vulgare* et *M. deserti* sont présentés dans les tableaux 15 et 16 respectivement.

Tableau 15. Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de *M. vulgare*.

<i>Extraits</i>	<i>Polyphénols totaux</i> (*)
EEp	15 ± 0,2 ^(a)
EDCM	68 ± 0,45 ^(b)
EBuOH	149 ± 0,94 ^(c)
EMeOH	195 ± 0,36 ^(d)
EAQ	175 ± 0,80 ^(e)

Tableau 16. Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de *M. deserti*.

<i>Extraits</i>	<i>Polyphénols totaux</i> (*)
EEp	17 ± 0,82 ^(a)
EDCM	34 ± 0,43 ^(b)
EBuOH	133 ± 0,91 ^(c)
EMeOH	184 ± 0,78 ^(d)
EAQ	171 ± 0,30 ^(e)

(*): milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait);

- Les lettres (a, b, c, d, e) indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,0001$);

- Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD.

Selon **Matkowski et al. (2008)** toutes les plantes de la famille de Lamiaceae sont connues pour leurs composés phénoliques, conformément avec nos résultats qui révèlent la richesse des extraits de *Marrubium* en ces métabolites secondaires.

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de *M. vulgare* montre que l'extrait méthanolique (EMeOH) contient une teneur élevée avec 195 ± 0,36 mg EAG/g d'extrait, suivi par l'extrait aqueux (EAQ) avec 175 ± 0,80 mg EAG/g d'extrait. L'extrait dichlorométhanique (EDCM) présente une teneur

relativement faible de $68 \pm 0,45$ mg EAG/g d'extrait, alors que l'extrait d'éther de pétrole représente une teneur très faible de l'ordre de $15 \pm 0,2$ mg EAG/g d'extrait. De même, le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de *M. deserti* montre que les extraits polaires (l'extrait méthanolique, butanolique et l'extrait aqueux lyophilisé) contiennent une teneur plus élevée par rapport les extraits apolaires dans les mêmes conditions. Les résultats de dosage montrent qu'il ya une petite différence dans la teneur de ces métabolites entre les deux plantes, toutefois notons que les extraits de *M. vulgare* sont riche en polyphénols que les extraits de *M. deserti*.

Nos résultats obtenus pour l'EMeOH sont supérieur à ceux de **Matkowski et al. (2008)** qui ont révélé que le même extrait de *M. vulgare* contient une teneur de $63,4 \pm 1,7$ mg EAG/g d'extrait. De même, des résultats divergeant sont rapportés par **Wojdylo et al. (2007)**, qui ont révélé une teneur de $3,86 \pm 0,05$ mg EAG/g d'extrait pour l'EMeOH de *M. vulgare*.

En outre, la teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique de l'espèce *M. peregrinum* rapportée par **Stanković (2011)**, est de $49,27 \pm 0,815$ mg EAG/g, ce qui est plus faible que la valeur correspondante obtenue dans le présent travail avec l'extrait méthanolique de l'espèce *M. vulgare*.

D'autre part, les travaux de **Djeridane et al. (2010)** sur l'espèce *M. deserti* déclarent que l'extrait hydro-alcoolique (MeOH-eau) donne une teneur de $3,67$ mg EAG/g d'extrait, ce qui est inférieur a celle de nos résultats ($184 \pm 0,78$ mg EAG/g d'extrait).

Les différences entre les résultats seraient dues aux différences géographiques mais aussi environnementales notamment le climat, endroit, température, fertilité et exposition au parasite dans l'espèce, le choix des plantes a examiner et la période de récolte des échantillons (**Kim et lie, 2004; Shan et al., 2005**; cité par **Wojdylo et al., 2007**). La distribution des métabolites secondaires peut varier aussi pendant le développement de la plante suivant certaines conditions telles que : la salinité, sécheresse et exposition solaire qui agissent sur la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

Wojdylo et al. (2007) ont testé six espèces de Lamiaceae, ils ont constaté que les teneurs en polyphénols totaux dans ces six espèces se présentent dans l'ordre suivant : baume > sauge > **marrube** > romarin > thymus > origan. Selon **Wojdylo et al. (2007)**, la teneur en composés phénoliques varie également en fonction du solvant et de la méthode d'extraction.

C'est dans ce contexte que **Bourgou et ses collaborateurs (2016)** ont étudié l'effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques de la partie aérienne d'*Euphorbia helioscopia* originaire de Sidi Thabet. Les résultats de cette étude ont montré que les extraits aqueux et ceux mixtes possèdent des teneurs élevées en composés phénoliques. En effet, le méthanol (70 %), l'éthanol (70 %) et l'acétone (70 %) présentent les plus forts rendements suivi par les extraits purs et ceux aqueux.

Selon **Mohammedi et Atik (2011)** l'utilisation de solvants mixtes aboutit à un fort enrichissement des extraits en polyphénols.

De plus, les résultats de **Bourgou et al. (2016)** ont révélé que la sonication est la méthode la plus convenable pour l'extraction des composés phénoliques avec des teneurs en polyphénols et des activités antioxydantes très élevées par rapport au soxhlet et à la macération. La macération et le soxhlet sont considérés comme étant des méthodes conventionnelles d'extraction des composés phénoliques approuvées par divers auteurs pour leurs efficacités (**Liu et al., 2013**).

Les ultrasons se montrent toutefois plus efficaces ; ils perturbent la structure de la paroi cellulaire induisant ainsi la lyse des cellules et accélérant la diffusion des molécules à travers les membranes et en brisant les membranes cellulaires. Les ultrasons ont l'avantage de réduire considérablement le temps d'extraction et d'augmenter le rendement d'extraction (**Bourgou et al., 2016**).

La teneur en composés phénoliques correspond en premier lieu aux flavonoïdes, car selon certains auteurs le Marrube contient des taux significatifs en flavones et en flavonols (**Nawwar et al., 1989; Pukalskas et al., 2012**). La teneur en composés phénoliques des extraits organiques et aqueux peut correspondre secondairement aux tanins sous forme condensée, aux acides phénoliques, la présence de ces composés dans le Marrube a été confirmée par certains chercheurs (**Wojdylo et al., 2007; Matkowski et al., 2008**). Ainsi, **Wojdylo et al. (2007)** ont indiqué la présence de l'acide caféïque, l'acide *p*-comarique et l'acide ferulique.

Le contenu en composés phénoliques totaux peut correspondre à un moindre degré aux stérols présumés être dans le Marrube (**Zlatanov et Antova, 2004; Dendougui et al., 2011**).

2. 2. 2. Dosage des Flavonoïdes

La teneur en flavonoïde, déterminée à partir de la gamme étalonnage établie par la quercétine à 430 nm (Figure 35), est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

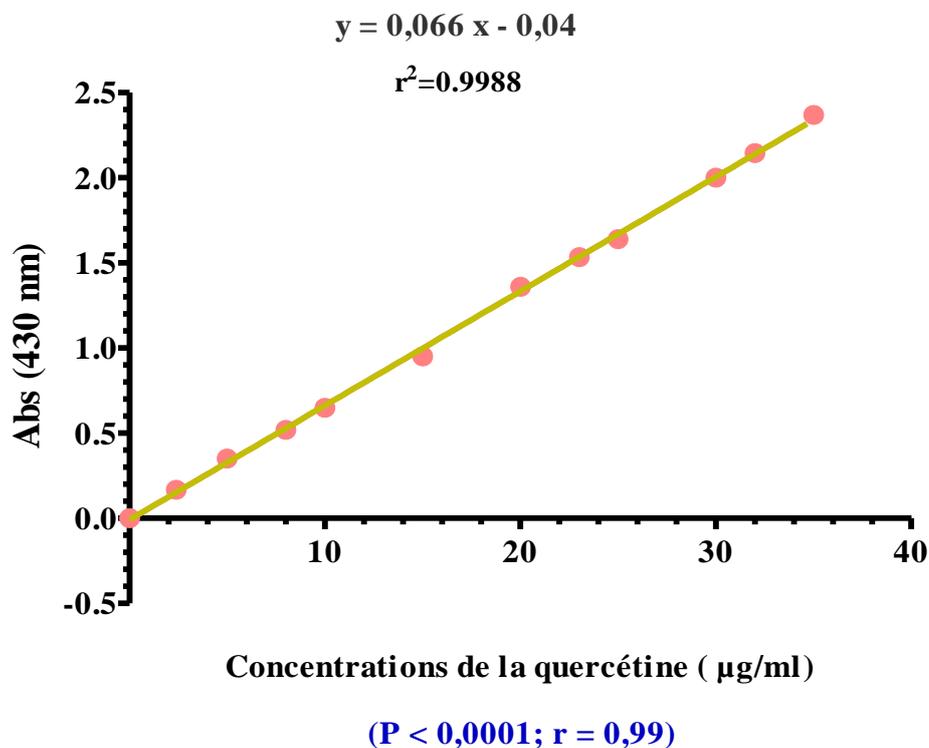


Figure 35. Courbe d'étalonnage de la quercétine

(Les valeurs sont une moyenne \pm SD de trois essais).

Les résultats du dosage sont présentés dans le Tableau 17. La détermination du taux des flavonoïdes dans les feuilles et les sommités fleuries de *M. vulgare* montre que l'EMeOH contient $33,10 \pm 0,60$ mg EQ/g d'extrait, suivi par l'EAQ avec $23,86 \pm 0,36$ mg EQ/g d'extrait et l'EBuOH avec $20,90 \pm 0,78$ mg EQ/g d'extrait.

De même, la détermination du taux des flavonoïdes dans les feuilles et les sommités fleuries de *M. deserti* révèle que l'EMeOH contient $28,48 \pm 0,40$ mg EQ/g d'extrait, suivi par l'EAQ avec $26,13 \pm 0,63$ mg EQ/g d'extrait et l'EBuOH avec $16,17 \pm 0,42$ mg EQ/g d'extrait, tandis que l'EDCM et l'EEp donnent des valeurs très faibles de l'ordre de $5,81 \pm 0,14$ mg EQ/g d'extrait et $2,42 \pm 0,12$ mg EQ/g d'extrait respectivement.

Tableau 17. Teneur des flavonoïdes dans les extraits des feuilles et les sommités fleuries de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Extraits de la plante <i>M. vulgare</i> L	
<i>Extraits</i>	<i>Flavonoïdes totaux</i> (*)
EEp	3,15 ± 0,17 ^a
EDCM	8,48 ± 0,94 ^b
EBuOH	20,90 ± 0,78 ^c
EMeOH	33,10 ± 0,60 ^d
EAQ	23,86 ± 0,36 ^c
Extraits de la plante <i>M. deserti</i> de Noé	
<i>Extraits</i>	<i>Flavonoïdes totaux</i> (*)
EEp	2,42 ± 0,12 ^a
EDCM	5,81 ± 0,14 ^b
EBuOH	16,17 ± 0,42 ^c
EMeOH	28,48 ± 0,40 ^d
EAQ	26,13 ± 0,63 ^d

Les valeurs obtenues représentent la moyenne de trois essais ± SD ;

(*) mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/ g d'extrait);

- Les lettres (a, b, c, d) indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,0001$).

La teneur en flavonoïde varie en fonction du solvant utilisé, c'est pourquoi, **Bruneton (2009)** et **Min et Chun-Zhao (2005)** Cité par **Stanković (2011)** ont signalé que les hétérosides de flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires comme les mélanges méthanol-eau ou acétonitrile-eau, alors que les génines (partie aglycone des flavonoïdes) sont solubles dans les solvants apolaires. Dans ce dosage, il

paraît que la plupart des flavonoïdes de *M. vulgare* sont des flavonoïdes glycosylés car ont le pouvoir d'être mieux solubilisé dans les solvants polaires que les solvants apolaires. La plupart des flavonoïdes cités par **Nawwar et al. (1989)** sont des flavonoïdes glycosylés ce qui est en accordance avec nos résultats.

Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par **Sarikurkcu et al. (2008)** qui ont réalisé leurs études sur l'espèce *Marrubium globosum*. Ces auteurs ont montré que la teneur en flavonoïdes est de l'ordre de $8,24 \pm 0,16$ µg EQ/mg d'extrait. Une autre étude établie par **Elberry et al. (2015)** ont montré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *M. vulgare* renferme une quantité de 15,53 mg EQ/g de la matière sèche. La différence entre les résultats obtenus pourrait être expliquée par les conditions opératoires réalisées au cours du dosage, ainsi **Elberry et al. (2015)** établie leur mesure à une longueur d'onde égale à 510 nm.

Djeridane et al. (2010) ont constaté que l'EMeOH de *M. deserti* donne une quantité équivalente à 2,2 mg E Rutine/g d'extrait, qui est inférieur à celle qu'on a obtenue avec le même extrait ($28,48 \pm 0,4$ mg EQ/g d'extrait) de la plante *M. deserti*. La différence obtenue entre les résultats d'analyse pourrait être expliquée par le type du standard utilisé dans le dosage, ainsi **Djeridane et al. (2010)** ont utilisé la rutine comme standard, dans ce travail c'est la quercétine qui a été utilisé.

Selon **Djeridane et al. (2010)** et **Amessis-Ouchemoukh et al. (2014)**, les feuilles de *M. vulgare* contiennent une quantité plus élevée en flavonoïdes et en composés phénoliques que la plante *M. deserti* ce qui en accord avec nos résultats.

Bouterfas et al. (2016 in press) ont montré que la teneur en flavonoïdes dépend de la localisation géographique de la plante. Ces auteurs ont constaté que les extraits de *M. vulgare* appartenant au nord-ouest Algérien : Tessala (montagne) donnent des teneurs élevées, suivis par ceux de Aïn Skhouna (Saida) et de la forêt de M'sila respectivement. En effet, **Bouterfas et al. (2016 in press)** ont révélé que les phénols et flavonoïdes totaux varient respectivement entre 40,7 - 160 équivalents d'acide gallique/g d'extrait et 27,4 - 66,3 mg équivalents de catéchine/g d'extrait. Ces changements peuvent être expliqués par les différences climatiques et édaphiques caractérisant chaque région géographique. En outre, les solvants utilisés affectent le rendement d'extraction des flavonoïdes. Selon **Bouterfas et al. (2016)**, l'EMeOH brute de *M. vulgare* a montré le rendement le plus élevé, suivi par l'acétate d'éthyle et les extraits de chloroforme respectivement. **Amessis-Ouchemoukh et al. (2014)** ont montré que l'acétone extrait faiblement les flavonoïdes de *M. vulgare* par rapport le

méthanol, ainsi les résultats rapportés par ces auteurs sont de l'ordre de $26,30 \pm 0,31$ mg ER/g de la matière sèche, $81,21 \pm 0,69$ mg ER/g de la matière sèche pour l'acétone et le méthanol respectivement.

2. 2. 3. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins, déterminée à partir de la gamme étalonnage établie par la catéchine à 500 nm (Figure 36), est exprimée en milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'extrait (mg EC/g d'extrait).

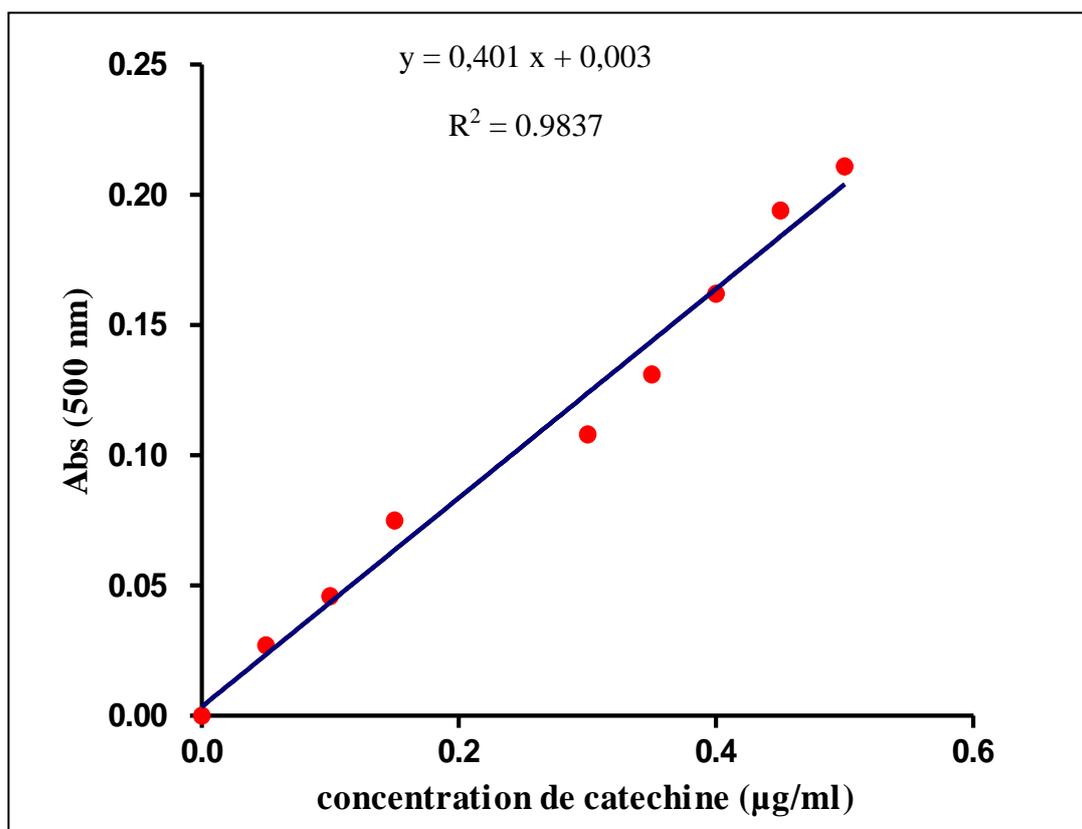


Figure 36. Courbe d'étalonnage de la catéchine.

(Les valeurs sont une moyenne \pm SD de trois essais).

Les résultats obtenus du dosage des tannins condensés sont reportés dans le Tableau 18.

D'après le tableau 18, l'EAQ de *M. vulgare* contient la teneur en tanins la plus élevée ($16,55 \pm 0,03$ mg EC/g d'extrait), de même, l'EAQ de *M. deserti* a donné la teneur la plus élevée de $15,68 \pm 0,08$ mg EC/g d'extrait.

Tableau 18. Contenu total de tanins condensés dans les extraits de feuilles de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Extraits de la plante <i>M. vulgare</i> L	
<i>Extraits</i>	<i>Tannins</i> (*)
Ether de pétrole	Ne contient pas des tannins
Dichlorométhane	Ne contient pas des tannins
<i>n</i> -Butanol	0,92 ± 0,16 (a)
Méthanol	5,75 ± 0,42 (b)
Eau (EAQ)	16,55 ± 0,03 (c)
Extraits de la plante <i>M. deserti</i> de Noé	
<i>Extraits</i>	<i>Tannins</i> (*)
Ether de pétrole	Ne contient pas des tannins
Dichlorométhane	Ne contient pas des tannins
<i>n</i> -Butanol	0,97 ± 0,23 (a)
Méthanol	6,56 ± 0,44 (b)
Eau (EAQ)	15,68 ± 0,08 (c)

(*) mg équivalent catéchine (EC) par g d'extrait ;

- Les lettres (a, b, c) indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,0001$).

Nos résultats sont en accord avec ceux de nombreux chercheurs qui ont indiqués que l'extraction par l'eau donne les teneurs les plus élevées en tanins condensés suivie par l'éthanol et l'acétone, tandis que le méthanol extrait faiblement les tanins quel que soit le mode d'extraction. Selon **Djahra et al. (2013)**, *M. vulgare* renferme en plus des flavonoïdes, des quantités assez importantes de tanins de l'ordre de 11,44 mg EC/g d'extrait.

L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, des solvants utilisés et des conditions opératoires. De plus, les teneurs en tanins condensés peuvent être influencées par le changement de plusieurs facteurs tels que : le climat, le stade de maturité des fruits, les conditions culturales, la méthode d'extraction, les facteurs génétiques... (**Julkumen-Titto et al., 1985**).

2. 2. 4. Dosage des flavonols

Le dosage des flavonols est réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Les concentrations calculées à partir de l'équation de régression de la droite d'étalonnage établie par la quercétine (Figure 37) sont présentées dans le tableau 19.

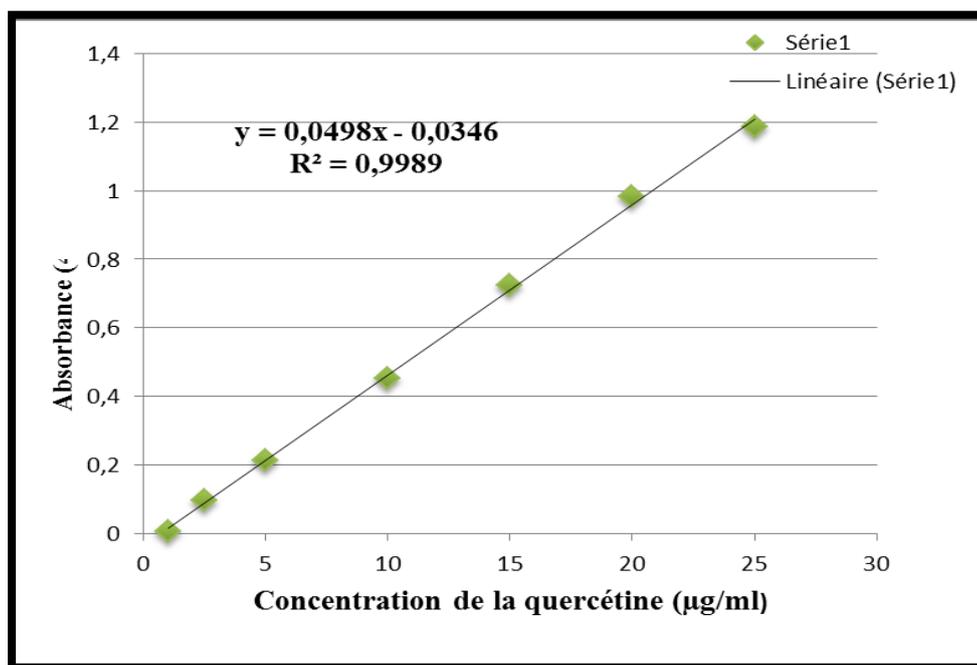


Figure 37. Droite d'étalonnage des flavonols

(Les valeurs sont une moyenne \pm SD de trois essais).

Tableau 19. Contenu total des flavonols dans les extraits de feuilles de

M. vulgare et *M. deserti*.

Extraits de la plante <i>M. vulgare</i> L	
<i>Extraits</i>	<i>Flavonols</i> (*)
Ether de pétrole	1,08 \pm 0,26 (a)
Dichlorométhane	2,06 \pm 0,55 (a)
<i>n</i> -Butanol	12,547 \pm 0,7 (b)
Méthanol	43,36 \pm 0,07 (c)
Eau (EAQ)	18,94 \pm 0,15 (d)

Extraits de la plante <i>M. deserti</i> de Noé	
<i>Extraits</i>	<i>Flavonols</i> (*)
Ether de pétrole	0,73 ± 0,52 (a)
Dichlorométhane	1,27 ± 0,04 (a)
<i>n</i> -Butanol	8,46 ± 0,61 (b)
Méthanol	19,25 ± 0,90 (c)
Eau (EAQ)	14,23 ± 0,01 (d)

(*) mg équivalent quercétine (EQ) par g d'extrait ;

- Les lettres (a, b, c, d) indiquent des valeurs significativement différentes ($P < 0,0001$).

- a-a : pas de différence significative entre l'EEp et l'EDCM : ($P > 0,05$)

Les flavonols totaux dans les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* de Noé varient respectivement de 1,08 à 43,36 mg EQ/g d'extrait et de 0,73 à 19,25 mg EQ/g d'extrait. D'après nos résultats, il apparait que la plante *M. vulgare* renferme une quantité plus importante en flavonols que la plante *M. deserti* ce qui est en accord avec les résultats de dosage des flavonoïdes. **Bouterfas et al. (2016 in press)** ont révélé la présence de quelques classes flavonoïques dans les extraits de *M. vulgare* qui sont principalement les flavones et les flavonols. Les mêmes auteurs signalent la présence des flavanes et des flavanols dans les extraits de *M. vulgare*.

3. Evaluation des activités biologiques des extraits *in vitro*

3. 1. Activité antimicrobienne

3. 1. 1. Test de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* sont présentés dans les Tableaux 20, 21, 22 et 23.

Tableau 20. Résultats de l'activité antibactérienne de l'EMeOH de *M. vulgare*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition * (mm)				Contrôle (Méthanol)
	Concentrations de l'EMeOH de <i>M. vulgare</i> (mg/ml)				
	500	250	125	62,5	
<i>S. aureus</i> ATCC	14,13 ±1,03	13,51 ±1,2	11,09 ±0,6	9,69±0,6	00 mm
MRSA	16,34±0,7	15,76±0,4	13,35±0,1	12,3±0,94	00 mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	7,24±0,37	-	-	-	00 mm
<i>E. coli</i> ATCC	12,94 ±0,5	11,3 ±1,71	10,46 ±0,9	9,78 ±0,3	7 mm
<i>K. pneumoniae</i>	7,84±0,56	6,42±0,98	-	-	00 mm
<i>S. thyphémérium</i>	7,56±0,75	-	-	-	00 mm
<i>Shigella flexneri</i>	9,47±1,67	8,07±0,4	-	-	5 mm
<i>S. marcescens</i>	10,74±0,24	9,39±0,13	7,46±0,37	-	5 mm

Tableau 21. Résultats de l'activité antibactérienne de l'EMeOH de *M. deserti*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition * (mm)				Contrôle (Méthanol)
	Concentrations de l'EMeOH de <i>M. deserti</i> (mg/ml)				
	500	250	125	62,5	
<i>S. aureus</i> ATCC	14,20 ±0,35	12,4 ±0,6	11,3 ±0,27	9,5±0,78	00 mm
MRSA	15,29±0,1	13,76±1,6	11,87±1,5	10,64±0,3	00 mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	6,50±0,5	-	-	-	00 mm
<i>E. coli</i> ATCC	12,08 ±0,6	10,9 ±0,12	9,3 ±0,10	7,82 ±0,4	7 mm
<i>K. pneumoniae</i>	7,26±0,9	-	-	-	00 mm
<i>S. thyphémérium</i>	6,87±0,79	-	-	-	00 mm
<i>Shigella flexneri</i>	8,30±0,7	7,14±0,62	-	-	5 mm
<i>S. marcescens</i>	9,51±0,43	8,53±0,81	6,93±0,2	-	5 mm

- Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

Tableau 22. Résultats de l'activité antibactérienne de l'EAQ de *M. vulgare*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition *(mm)				Contrôle (DMSO)
	Concentrations de l'EAQ de <i>M. vulgare</i> (mg/ml)				
	500	250	125	62,5	
<i>S. aureus</i> ATCC	11±0,31	10,56±0,7	9,08 ±3	8,63 ±1,4	
MRSA	-	-	-	-	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ATCC	-	-	-	-	
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>S. thyphémyrium</i>	-	-	-	-	
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	

Tableau 23. Résultats de l'activité antibactérienne de l'EDCM de *M. deserti*.

Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition *(mm)				Contrôle (DMSO)
	Concentrations de l'EDCM de <i>M. deserti</i> (mg/ml)				
	500	250	125	62,5	
<i>S. aureus</i> ATCC	9,91 ±0,08	8,00 ±1,29	7,45±1,3	-	
MRSA	-	-	-	-	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> ATCC	14,73 ±0,42	10,3 ±0,4	-	-	
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>S. thyphémyrium</i>	-	-	-	-	
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

Les résultats montrent que l'EEp, l'EDCM et l'EBuOH de *M. vulgare* sont inactifs contre l'ensemble des souches testées. L'EAQ est actif seulement contre *S. aureus* ATCC 25923 (Tableau 22), alors que, l'EMeOH présente des activités importantes envers la totalité des souches étudiées (Tableau 20).

L'activité la plus élevée est obtenue contre la souche SARM avec une zone d'inhibition de $16,34 \pm 0,7$ mm, suivie par *S. aureus* ATCC 25923 avec une zone d'inhibition de $14,13 \pm 1,03$ mm et enfin *E. coli* ATCC 25922 est révélée moins sensible avec une zone d'inhibition de $12,94 \pm 0,5$ mm. Quelques zones d'inhibition modérées avec l'EMeOH ont été enregistrées avec *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($7,24 \pm 0,37$ mm), *K. pneumoniae* ($7,84 \pm 0,56$ mm), *S. thyphémyrium* ($7,56 \pm 0,75$ mm) et les deux souches d'*Entérobacter* sp ($9,47 \pm 1,67$ mm; $10,74 \pm 0,24$ mm). L'EMeOH de *M. vulgare* a gardé son activité à la concentration 62,5 mg/ml contre les souches SARM, *S. aureus* ATCC 25923 et *E. coli* ATCC 25922.

Les résultats de l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de *M. deserti* montrent que les extraits dichlorométhanique et méthanolique produisent des zones d'inhibition considérables contre *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* (MRSA), les diamètres de la zone d'inhibition ont été variés entre $14,73 \pm 0,42$ mm et $15,29 \pm 0,1$ mm respectivement. En revanche, les autres souches *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae*, *S. thyphémyrium* et les deux souches d'*Entérobacter* sp sont révélés résistantes à l'effet de l'EDCM de *M. deserti*, de plus, elles sont moins sensibles à l'effet de l'EMeOH du même plante.

La sensibilité aux différents extraits est classifiée selon le diamètre des zones d'inhibition comme indique **Moreira et al. (2005)** : non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm; sensible (+) pour un diamètre entre 9-14 mm et très sensible (++) pour un diamètre entre 15-19 mm. Les Tableaux 24 et 25 représentent la sensibilité des souches testées vis-à-vis les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*.

La sensibilité des deux souches *S. aureus* et SARM notamment pour les extraits méthanoliques peut se discuter par la probabilité de sensibilité des bactéries Gram (+) aux modifications environnementaux externes, tels que : la température, le pH et les extraits naturels dus à l'absence de la membrane externe (**Balentine et al., 2006**).

Tableau 24. La sensibilité des souches bactériennes envers les extraits de *M. vulgare*.

Souches bactériennes	Sensibilité				
	Extraits				
	EEp	EDCM	EBuOH	EMeOH	EAQ
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+
SARM	-	-	-	++	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>S. thyphémyrium</i>	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	+	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	+	-

Tableau 25. La sensibilité des souches bactériennes envers les extraits de *M. deserti*.

Souches bactériennes	Sensibilité				
	Extraits				
	EEp	EDCM	EBuOH	EMeOH	EAQ
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+
SARM	-	-	+	++	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	+	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>S. thyphémyrium</i>	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	+	-

L'action de l'EMeOH sur la bactérie *Staphylococcus aureus* (MRSA) peut être due aux flavonoïdes qui sont des bons inhibiteurs des sortases qui sont des enzymes trouvés dans la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif (Cushnie et Lamb, 2011). De même, Cushnie et Lamb (2011) affirment que des quantités infimes de la rutine peuvent inhiber les sortases A et B. En outre, l'aptitude de *S.*

aureus de provoquer une maladie est largement liée à sa capacité à sécréter des enzymes et des toxines. Des études récentes ont montré que les flavonoïdes inhibent la libération de facteurs de virulence de cette bactérie. En effet, **Cushnie et Lamb (2011)** constatent que l'épigallocatechine empêche la sécrétion de la coagulase et l' α -toxine.

L'étude effectuée par **Zaabat et al. (2010)** sur l'effet de forsythoside B, un phénylpropanoïdes isolés chez *M. vulgare* et *M. deserti* a montrée des résultats similaires que ceux retrouvés dans notre étude, en effet, ce composé présente une activité antibactérienne significative vis-à-vis des bactéries à Gram + (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et SARM) avec une CMI de 130 μ g/ml. En revanche, ce composé est inactif pour l'ensemble des bactéries à Gram (-) testés : *P. aeruginosa* ATCC 15442 et *K. oxytoca* ATCC 700324 (**Zaabat et al., 2010**) ce qui en accord avec nos résultats.

De nombreux études ont montré que l'activité antibactérienne de certains extraits de plantes est attribuée à la présence des diterpénoïdes (**Alilou et al., 2007; Zaabat et al., 2010**). **Urzūa et al. (2006)**, au cours d'études des propriétés antibactériennes de 15 diterpènes bicycliques isolés de plantes du Chili, ont démontré que ces structures sont dotées d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram positif mais sont inactives sur les souches bactériennes à Gram négatif.

Zaabat et al. (2010) ont suggéré que l'activité antibactérienne des diterpènes est liée à leur capacité d'endommager les membranes cellulaires bactériennes. Les mêmes chercheurs ont montré que l'activité antibactérienne de composés de type labdanes lactonique est due au système décaline et au noyau oxygéné lié au carbone C-6 (le noyau lactonique). En effet, la présence du système décalinique facilite l'insertion de la molécule dans la région lipophile de la membrane, d'autre part la présence du noyau lactonique permet l'interaction entre la partie hydrophile qui est le groupement donneur de la molécule et le groupement accepteur de la membrane cellulaire de la bactérie via une liaison hydrogène (**Urzūa et al., 2006**).

Les extraits méthanoliques ont révélé des zones d'inhibition modérées avec les souches *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. thyphimurium* et les *Entérobacter*, en revanche les autres extraits (EEp, EDCM, EBUOH et l'EAQ) sont inactifs contre ces germes de Gram (-), ce qui montre la résistance de ces souches. On peut interpréter ces résultats par la différence de la structure de la paroi cellulaire entre les bactéries

Gram (+) et les bactéries Gram négatives (Cushnie et Lamb, 2011). En effet, les bactéries Gram (-), indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle : la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharides, cette membrane est imperméable à la plupart des molécules comme les terpènes hydrophobes (Ulukanli et Akkaya, 2011). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs chercheurs qui ont testé les mêmes germes (Al-Bakri et Afifi, 2007; Zarai *et al.*, 2011; Krimat *et al.*, 2014). En outre, la plupart de ces germes sont mobiles (Garcia et Le Bouguéneq, 1996; Sabin *et al.*, 2006) ce qui offre probablement la possibilité à ces bactéries d'être déplacées au profond du gélose et d'échapper par conséquent à l'action des métabolites contenus dans les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* (Ghedadba *et al.*, 2014).

Une étude a été établie dans la littérature sur l'espèce Saharienne *Marrubium deserti* de Noé ex Cox par Laouer *et al.* (2009) à Sétif, qui ont montré que les huiles essentielles de cette plante n'ont aucune activité contre cinq microorganismes : *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* et *Aspergillus flavus*.

L'EDCM de *M. deserti* exerce une forte activité inhibitrice contre *E. coli* qui pourrait être due à la présence des terpénoïdes dont le Marrulibacétal A qui est révélé dans les travaux de Zaabat *et al.* (2010) comme un puissant agent antibactérien.

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne tels que : le type des microorganismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la dose thérapeutique, le type de l'extrait (le solvant) et surtout la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives de métabolites secondaires (Ulukanli et Akkaya, 2011; Cushnie et Lamb, 2011).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne peut influencer les résultats. Natarajan *et al.* (2005) et Fazeli *et al.* (2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus convenable pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de *Euphorbia fusiformis* et hydro-éthanoliques de *Rhus coriaria* et *Zataria multiflora* par rapport à la méthode de diffusion en milieu gélosé. Le diamètre de la zone d'inhibition dépend aussi de l'organe de la plante à tester, ainsi une étude récente établie par Elbashiti *et al.* (2011) a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *M. vulgare* donne une inhibition de 13 mm seulement, tandis que le même extrait donne une inhibition de 15 mm avec les tiges de la plante

contre *S. aureus*. La purification de certaines molécules des feuilles de *M. vulgare* et *M. deserti*, a montré la richesse de ces deux plantes en acides phénols, en aglycones flavoniques et en polyphénols à grand intérêt médicinal et biologique. Ces métabolites ont des rôles très importants dans la coloration des fleurs, des fruits et la protection des plantes contre les ravageurs. De plus, ce sont des antiviraux et antifongiques (Alilou *et al.*, 2007; Edziri *et al.*, 2012).

Selon Bruneton (1999); Hannebelle *et al.* (2007); Falleh *et al.* (2008) et Warda *et al.* (2009), plusieurs molécules bioactives telles que les flavonoïdes, les tanins galliques et catéchiques, leucoanthocyanes, acides phénoliques, saponines, alcaloïdes et terpénoïdes jouent un rôle intéressant chez les plantes contre les microorganismes. D'autre part, ces composés peuvent agir en synergie, comme il a été suggéré par Alilou *et al.*, (2007). On peut dire, donc, que cette synergie peut être, aussi, responsable du pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti*.

L'activité antimicrobienne de *M. vulgare* L peut être également issue de quelques substances comme les huiles essentielles. Dans ce sens, une étude publiée par Zarai *et al.* (2011) a montré que les composés chimiques ayant une efficacité antibactérienne et antifongique à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques (Hussein *et al.*, 2015). Une autre étude présentée par Alilou *et al.* (2007) a montré l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Bubonium graveolens*.

L'étude établie par (Hussein *et al.*, 2015) a montré la présence d'un pourcentage élevé de monoterpènes chez la plante *M. vulgare*. En effet, les monoterpènes isolés de plusieurs *Lamiaceae* possèdent un large spectre d'activité biologique (Abadi et Hasani, 2013; Bokaeian *et al.*, 2014 ; Hussein *et al.*, 2015). L'étude réalisée par Alilou *et al.* (2007) a montré que la richesse de l'huile essentielle en α -pinène (monoterpène hydrocarbure) peut conférer un pouvoir antibactérien sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*.

Plusieurs études ont mis en évidence les activités antimicrobiennes des extraits de plantes appartenant à la famille des *Lamiacées* provenant de divers organes comme les feuilles, les graines et les fleurs (Falleh *et al.*, 2008). Les composés antimicrobiens des plantes peuvent inhiber la croissance bactérienne par différents mécanismes. En effet, Aouadhi *et al.* (2013) ont montré que l'action antimicrobienne des huiles essentielles et de leurs extraits se déroule en trois phases: par l'attaque de la paroi

bactérienne par les extraits, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires, puis l'acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure et enfin la destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne est le type et la structure moléculaire des principes actifs présents dans les plantes. Citant par exemple le cas des terpénoïdes, une activité antimicrobienne *in vitro* plus élevée avec les terpénoïdes oxygénés en se comparant avec les terpénoïdes hydrocarbures a été observée (**Zarai et al., 2011**). La D-catéchine a une activité antibactérienne vis-à-vis de la majorité des souches pathogènes, alors que son énantiomère : L-catéchine n'affiche aucune activité. **Cushnie et Lamb (2011)** ont constaté que le dérivé de 3-O-décyl-(D)-catéchine a été de 64 à 128 fois plus actif que sa structure parent, avec des concentrations minimale inhibitrice de 1,0 mg/ml et 2,0 µg/ml contre *S. aureus* et *Entérocoques faecalis* respectivement. De même, le L-gallate présente une activité antibactérienne faible, l'alkylation cependant augmente considérablement l'activité de ce composé contre les agents pathogènes à Gram positif.

Cushnie et Lamb (2011) dont le but d'améliorer l'activité antimicrobienne des flavones, ont constaté que la substitution de l'atome d'oxygène en position 4 de l'anneau C avec l'azote ou le soufre a été efficace. En outre, l'ajout d'un atome de brome ou de chlore aux positions 2', 3' et 4' de l'anneau B a amélioré l'activité des flavanones, ainsi que la présence d'un groupe lipophile (par exemple géranyl) en position 6 ou 8 de l'anneau a amélioré également l'activité des flavones et des flavanones.

3. 1. 2. Activité antifongique

L'augmentation de la résistance fongique aux médicaments classiques et le fait que la plupart des médicaments antifongiques n'ont qu'une activité fongistatique (**Aouadhi et al., 2013**), justifient la recherche de nouvelles stratégies de lutte contre les infections fongiques. A cet effet, les potentiels antifongiques de *M. vulgare* et *M. deserti* ont été évalués en utilisant le test de la diffusion de disque, à l'égard de deux souches fongiques et une levure. Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti* ont une activité antimicrobienne modérée vis-à-vis *Candida albicans*. Les zones d'inhibitions maximales sont aux alentours de

8,4 ± 0,2 - 10,23 ± 0,56 mm. En outre, l'extrait méthanolique de *M. vulgare* paraît actif que celui de *M. deserti* (Tableau 26; Figure 38), mais l'analyse statistique ne montre aucune différence significative ($P > 0,05$). Cependant, les extraits méthanoliques des deux plantes n'ont pas d'effet antimicrobien envers les deux souches fongiques *Aspargillus niger* et *Penicillium digitatum*. De même, les autres extraits sont révélés inactifs vis-à-vis les trois souches fongiques. La présente étude indique que les extraits méthanoliques des feuilles de *M. vulgare* et de *M. deserti* ont une activité antifongique modérée qui mérite une investigation plus approfondie pour des applications cliniques.

Tableau 26. Diamètres des zones d'inhibitions obtenus par l'effet des extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti* sur les souches fongiques.

Souches fongiques	EMeOH de <i>M. vulgare</i>	EMeOH de <i>M. deserti</i>	DMSO (contrôle négatif)
<i>Penicillium digitatum</i>	-	-	-
<i>Aspargillus niger</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	10,23 ± 0,56	8,4 ± 0,2	-

Les valeurs données sont les moyennes des trois expériences indépendantes
(Barres d'erreur représentent les écarts-types).

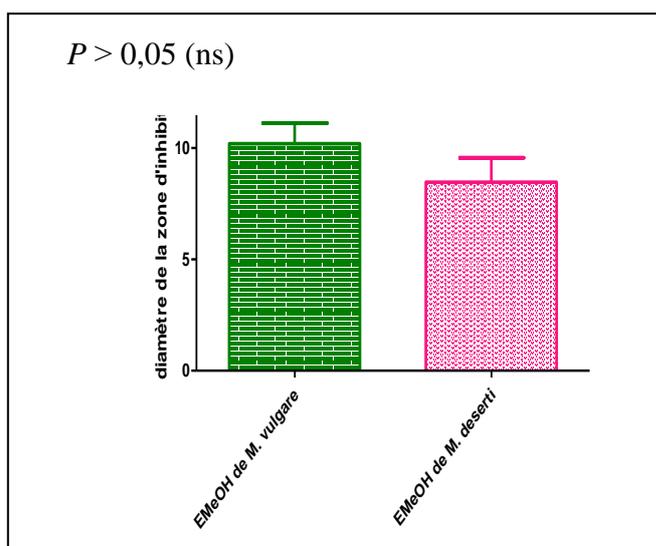


Figure 38. Histogrammes représentent les résultats de l'activité antifongique des extraits méthanoliques contre la croissance mycélienne de la levure.

Les infections provoquées par les champignons (*Aspergillus*) ou les levures (*Candida*) qui sont appelées aussi les mycoses sont devenues un réel problème de santé publique. Elles sont de plus en plus difficiles à inactiver et leurs fréquences sont en très forte progression (**Aouadhi et al., 2013**). Récemment, plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongique, antibactérien et antioxydant. Ainsi par ces propriétés, les huiles essentielles ont été utilisées dans le domaine de conservation alimentaire, d'industrie des parfums, des cosmétiques, de la pharmacie et de l'agroalimentaire.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont montré que les huiles essentielles de certaines plantes aromatiques ont une action inhibitrice sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires (**Amarti et al., 2010**). **Alilou et al. (2007)** a montré que le thymol et le carvacrol ont une importante activité antifongique *in vitro*. Ces derniers exercent une inhibition complète de la croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*, de *Phytophthora citrophthora*, de *Penicillium digitatum* et de *Geotrichum citri-aurantii* et ceci à 150 ppm (Parties par millions) après sept jours d'incubation.

L'efficacité de l'EMeOH des deux plantes vis-à-vis *C. albicans* serait due à leurs richesse en polyphénols. Dans la littérature, il a été indiqué que les activités antimicrobiennes des extraits de plantes dépendent de la nature et de la structure des composés phénoliques. Par leur groupe hydroxyle, les composés phénoliques ont une capacité de se lier aux protéines des membranes des champignons pour former des complexes (**Zongo et al. 2011**).

Comme nous l'avons vu avec l'activité antibactérienne, l'activité antifongique peut être aussi influencée par plusieurs facteurs comme le type de l'extrait, les champignons a testés, l'organe de la plante qui fait l'objet d'étude, la durée d'incubation et la dose de fongicide appliquée,... Une étude réalisée par **Alilou et al. (2007)** affirment que les doses 500, 1000 et 2000 ppm affichent un pourcentage d'inhibition de 100% envers *Botrytis cinerea* dès le premier jour, par contre les doses 200 et 250 ppm tout comme les doses 125 et 150 ppm ne présentent aucune effet vis-à-vis du même germe. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par (**Zarai et al., 2011**) qui ont montré que les huiles essentielles de *M. vulgare* ne présente aucun effet sur la croissance des trois souches fongiques *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum* et *Fusarium solani*. A l'inverse, **Kanyonga et al. (2011)** ont montré que

l'extrait méthanolique de *M. vulgare* possède un effet dose dépendant significatif contre la levure *C. albicans* avec une zone d'inhibition de 10 mm à la concentration de 100 mg/ml de l'extrait, et qui dépasse 20 mm à la dose de 600 mg/ml de l'extrait.

Enfin, il faut signaler que l'effet de l'EMeOH vis-à-vis *C. albicans* peut être fongicide ou fongistatique. Dans notre étude nous n'avons pas pu constater cet effet car nous n'avons pas réussi à déterminer la concentration qui cause l'inhibition totale de la levure. La détermination de cette concentration est requise afin de pouvoir transférer le disque de champignon, totalement inhibé, vers un autre milieu de culture. Ceci est nécessaire pour évaluer la viabilité de ce champignon. Si la croissance mycélienne réapparaît on peut déduire que l'effet représenté par l'extrait sur l'organisme cible est un effet fongistatique.

3. 2. Tests de l'activité antioxydante *in vitro*

3. 2. 1. Test de blanchiment du β -Carotène

Les cinétiques de blanchiment du β -carotène en présence et en absence des extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* et de l'antioxydant standard (α tocophérol) sont représentées dans les Figures 39 et 40.

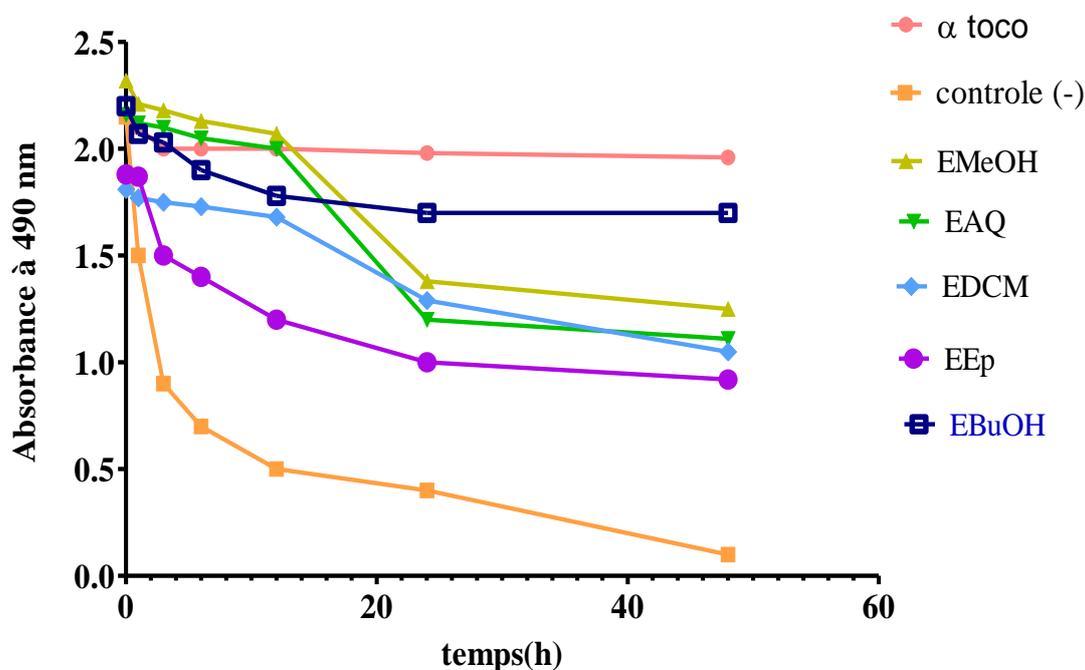


Figure 39. Cinétique de blanchiment du β -carotène à 490 nm en présence des extraits de *M. vulgare* et de l' α tocophérol.

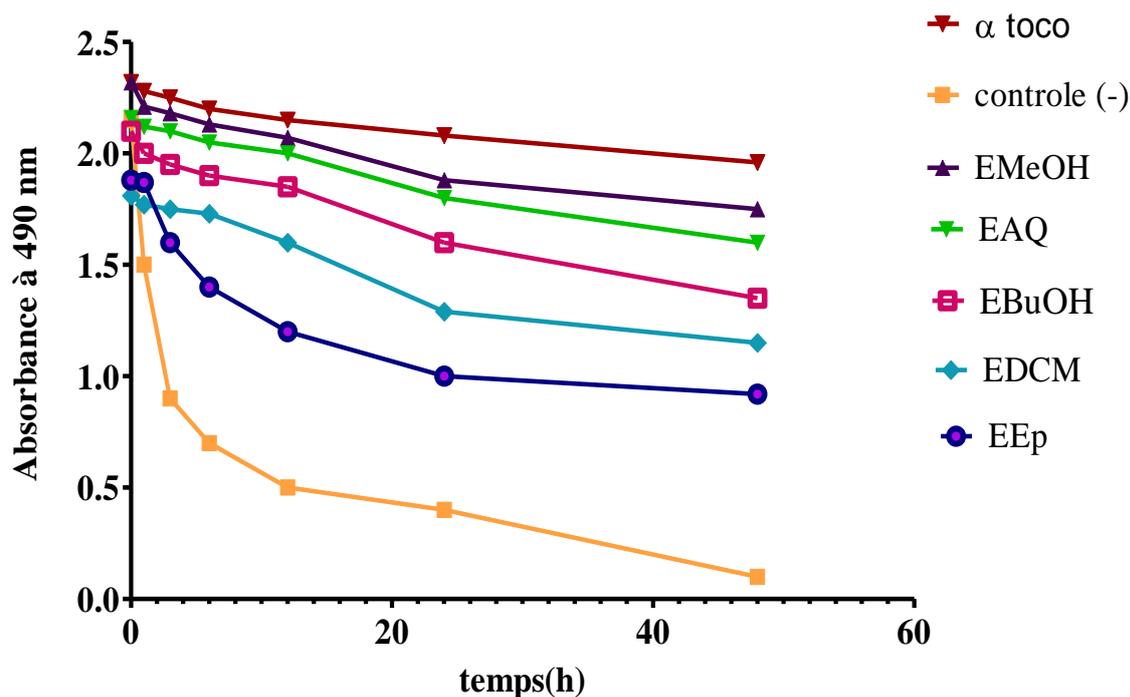


Figure 40. Cinétique de blanchiment du β -carotène à 490 nm des extraits de *M. deserti* et de l' α -tocophérol.

Chaque valeur est la moyenne de trois analyses.

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique ($C_{18} : 2\Delta^{9,12}$) génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique (Sarikurkcu *et al.*, 2008). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder la β -carotène hautement insaturée entraînant ainsi la disparition de sa couleur jaune, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène.

Les Figures (39 et 40) représentent la cinétique de blanchiment du β carotène à 490 nm en fonction du temps de traitement où on constate que les courbes ont la même allure qui implique la même interprétation (Ghedadba *et al.*, 2015) :

* **Au temps (t₀)** : la densité optique de tous les extraits, le standard et le contrôle (-) étant presque la même et présentent un seuil d'absorbance d'environ 2,3. Cela est expliqué par l'effet qu'à ce moment là il n'y a aucun RL qui a été formé dans le milieu réactionnel, par conséquent la β - Carotène reste hautement insaturée, la couleur jaune confère a leur une absorbance maximale, c'est la phase **d'initiation** ;

* **Au temps ($t : 2h$)** : l'absorbance commence à diminuer progressivement pour tous les extraits des deux plantes, le standard et le contrôle (-), ce qui indique le début de la formation des RLs dans le milieu réactionnel généré par l'acide linoléique suite à la rupture des doubles liaisons par le tween 40, c'est la phase de **propagation** ;

* **Après ce temps ($2h < t \leq 48h$)** : l'étude de cinétique de blanchiment du β -carotène montre que celui-ci diminue graduellement avec le temps, pour atteindre un état stationnaire au bout de 48 heures, étant donné que le nombre des RLs est de plus en plus important. Après ce temps là, il reste constant ce qui montre que toutes les doubles liaisons présentes dans la β -carotène sont dégradées, ce qui achève à l'épuisement irréversible de la coloration jaune et de donner une couleur blanche, c'est donc le blanchiment total du β -carotène, c'est la phase de **terminaison**.

Comme montré dans les Figures 39 et 40, que la cinétique de blanchiment du β -carotène dans le cas du contrôle (-) diminue d'une façon rapide, car il n'y a pas aucun antioxydant qui peut inhiber ou retarder au moins l'oxydation de β -carotène, ce qui facilite l'action des RLs.

La courbe correspondant à l'EAQ et l'EMeOH montre bien la présence de deux étapes : une première à vitesse constante durant les 12 premières heures, suivie d'une seconde à vitesse décroissante qui va jusqu'à la fin du processus. La première étape, correspondrait à une vitesse plus importante que celle de l' α tocophérol dont le pouvoir inhibiteur du standard est inférieur à celui des extraits aqueux et méthanolique, ceci est expliqué probablement par un effet pro-oxydant partiel du tocophérol. **Gülçin et al. (2004)** ont utilisé le même standard et ont obtenu des résultats semblables. Durant la deuxième étape, le pouvoir inhibiteur du standard devient supérieur à celui des deux extraits.

L'analyse statistique indique que tous les extraits testés de *M. vulgare* et de *M. deserti* inhibent d'une manière très hautement significative ($P < 0,0001$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100 % de la peroxydation. Pour les extraits du Marrube blanc, l'inhibition la plus élevée a été fournie par l'EMeOH ($81,35 \pm 1,26$ %), suivi par l'EAQ ($67,72 \pm 1,398$ %) et l'EBuOH ($64,78 \pm 1,003$ %), l'EDCM a montré une activité inhibitrice de l'ordre de ($62,49 \pm 2,120$ %) et en dernier c'est l'EEp qui représente la

valeur inhibitrice la plus faible ($51,32 \pm 3,585$ %). L'analyse statistique montre aussi que l'EMeOH inhibe l'oxydation du β - carotène d'une manière hautement significative par rapport aux autres extraits ($P < 0,001$) et que l'EAQ, l'EBuOH ainsi que l'EDCM ne représente aucune différence significative ($P > 0,05$) (Figure 41). L'ordre décroissant du pouvoir antioxydant des extraits testés en terme d'activité antioxydante relative peut donc être résumé comme suit : EMeOH > EAQ > EBuOH > EDCM > EEp.

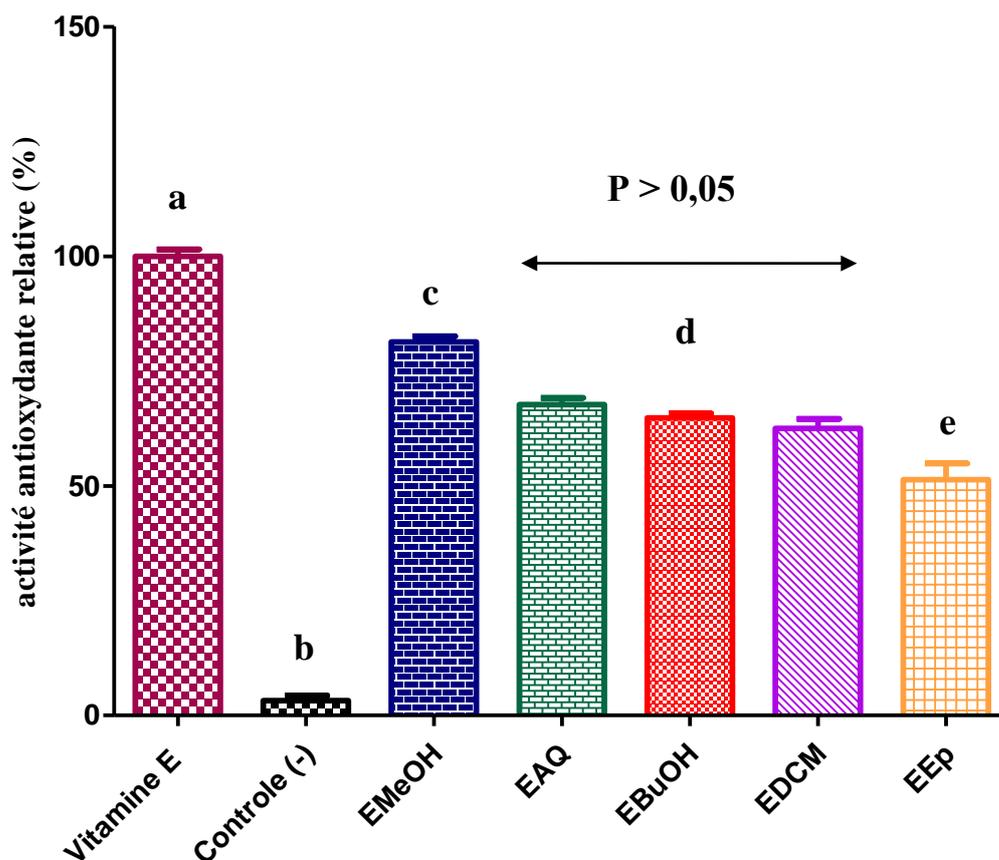


Figure 41. Activité antioxydante relative des extraits de *M. vulgare* et de l' α tocophérol dans le système acide linoléique / β -carotène.

Les valeurs sont la moyenne de trois essais, les barres avec les lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ($***P < 0,001$).

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Pukalskas *et al.* (2012)** qui ont révélé que le coefficient de l'activité antioxydante de *M. vulgare* la plus élevée dans le système de blanchissement de β - carotène - acide linoléique est attribué à l'extrait hydro-alcoolique (méthanol-eau) du marrube.

Les résultats de l'effet des extraits de *M. deserti* sur le blanchiment du β -carotène (présentés dans la Figure 42) indiquent que l'activité la plus élevée est exprimée par l'extrait au méthanol (AAR = $76,61 \pm 1,992$ %) suivi par l'EDCM (AAR = $72,34 \pm 1,528$ %) et l'EAQ (AAR = $65,68 \pm 1,016$ %). Les extraits butanolique et éther-pétrolique présentent également une activité importante ($59,32 \pm 1,014$ %; $56,71 \pm 1,065$ %).

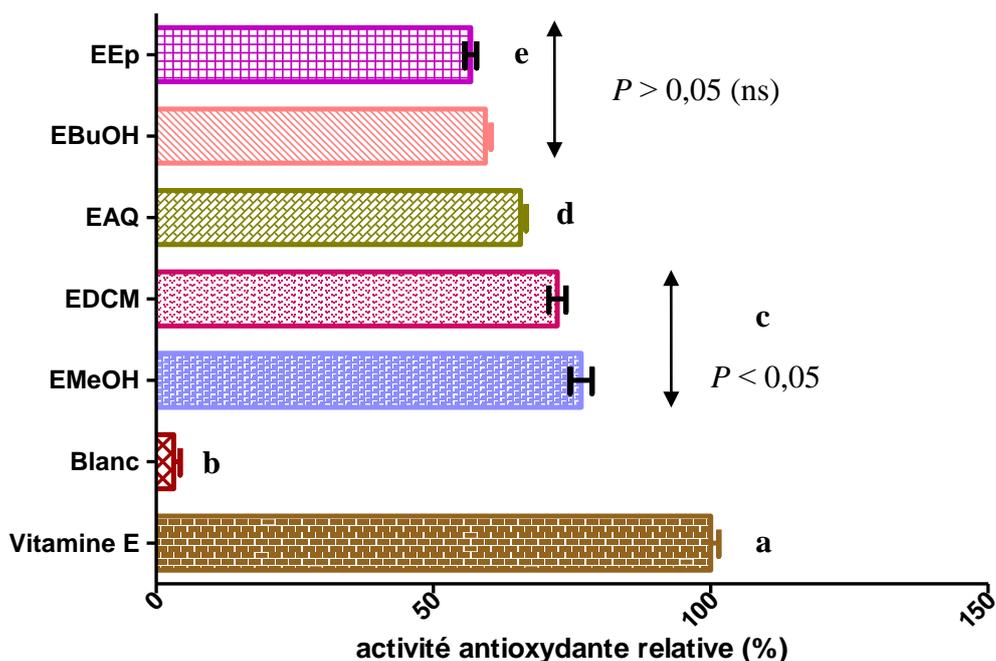


Figure 42. Activité antioxydante relative des extraits de *M. deserti* et de l' α tocophérol dans le système acide linoléique / β -carotène.

Les valeurs sont la moyenne de trois essais, les barres avec les lettres différentes indiquent des activités significativement différentes (***) ($P < 0,001$).

D'après nos résultats, il apparaît que l' α -tocophérol inhibe d'une manière très hautement significative ($P < 0,001$) l'oxydation du β -carotène couplé à l'acide linoléique par rapport aux extraits des deux plantes. Nos résultats montrent également que les extraits obtenus en utilisant des solvants de haute polarité sont considérablement plus efficaces que ceux obtenus en utilisant des solvants de polarité plus faible. Néanmoins, il paraît que l'EDCM de *M. deserti* n'obéit pas à cette règle. En effet, et malgré sa nature apolaire, l'activité de l'EDCM est comparable à celle de l'EMeOH ($P > 0,05$).

Pour expliquer ces résultats il faut mieux comprendre que ce qui se passe au niveau d'une émulsion contenant un mélange de l'acide linoléique, la β -carotène, le tween 40 et l'eau oxygéné. L' O_2 contenu dans le milieu aqueux avec le tween 40 joue un rôle dans la génération des RLs à partir de l'acide linoléique suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique (**Sarikurkcu et al., 2008**). Or, l'acide linoléique se trouve sous forme de micelles dans l'eau, ainsi les RLs formés sont emprisonnés à l'intérieur de ces micelles avant d'attaquer la β -carotène hautement insaturée, de ce fait leurs nombres (les RLs) va être amplifié avec le temps ce qui explique la disparition de la couleur jaune orangé du β -carotène ayant été utilisé comme un marqueur pour suivre la cinétique de la peroxydation lipidique *in vitro*.

Par conséquent, les antioxydants liposolubles sont devenus le chef d'orchestre dans l'inhibition de l'oxydation du β -carotène, étant donné qu'ils sont capables de traverser facilement la couche hydrophobique formée par les micelles. En effet, à la suite de cette pénétration, ces antioxydants vont bloquer ou au moins retarder la machinerie de la formation des RLs ce qui diminue la cinétique de blanchiment du β -carotène. Cela peut expliquer d'une part l'efficacité de l' α -tocophérol liposoluble qui inhibe la peroxydation de l'acide linoléique à 100%, et d'autre part, l'effet des extraits apolaires (EEp et EDCM) et surtout l'EDM de *M. deserti* qui sont trop riches en molécules liposolubles comme les terpénoïdes, les stéroïdes et les coumarines qui ont été comme des puissants agents antioxydants (**Kadri et al., 2011**).

Notons que le test de blanchiment de β -carotène ne dépend pas sur le type du solvant choisi pour l'extraction, mais il est plutôt influé par la nature et la structure des molécules présentes dans l'extrait. C'est dans ce contexte que **Mohammedi (2013)** ont montré que les fractions issus de l'acétate éthyle de *Tamarix aphylla* montrent un excellent pouvoir antioxydant (96,52%) par rapport la fraction butanolique de la même plante qui présente une faible activité antioxydante (10,10%), malgré que le butanol est plus polaire que l'acétate d'éthyle.

La comparaison entre la capacité des deux plantes dans l'inhibition de l'oxydation du β -carotène indique que les extraits polaires de *M. vulgare* sont les plus actifs, cela serait due à la richesse de ces extraits en composés phénoliques comme nous l'avons montré lors du dosage de ces constituants. De nombreuses études affirment les propriétés antioxydantes des acides phénoliques, des flavonoïdes

(flavonols) et des tanins (**Bruneton, 1999**). A l'inverse, les extraits apolaires de *M. deserti* et surtout l'EDCM se sont révélés plus actifs, cela peut être expliqué par la richesse de ces extraits en terpénoïdes et plus particulièrement en huiles essentielles qui sont abondantes dans les plantes Saharienne. En effet, **Laouar et al. (2009)** ont rapporté que les plantes du Sahara accumulent des quantités importantes d'huiles essentielles dont le rôle est inconnu. Selon **Kadri et al. (2011)**, le thymol et le carvacrol (des huiles essentielles) ont révélé une capacité considérable d'inhiber le blanchissement de β -carotène. Une autre étude révélée que l'huile essentielle de la nigelle possède un grand pouvoir d'inhiber la peroxydation des phospholipides du cerveau bovin (**Burits et Bucar, 2000**).

L'analyse statistique montre la présence d'une corrélation linéaire significative entre la teneur de ces extraits en polyphénols totaux, en flavonoïdes et le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique ($r = 0.87$ et $r = 0.83$ respectivement), ce qui indique la contribution de ces composés qui sont les antioxydants dominants dans ces extraits dans le pouvoir antioxydant des deux plantes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs chercheurs, qui ont rapporté une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante (**Wu et al., 2004; Djeridane et al., 2006; Katalinic et al., 2006; Wojdylo et al., 2007; Pukalskas et al., 2012**).

3. 2. 2. Effet scavenger du radical DPPH

Le criblage de l'activité antioxydante par méthode de CCM suivie par la révélation par une solution méthanolique de DPPH (2 mg/ml) a indiqué que les extraits apolaires des deux plantes, n'ont pas de pouvoir antiradicalaire détectable et seulement l'extrait polaire méthanolique qui a été testé positivement après la révélation.

Le pouvoir antiradicalaire des différents extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* vis-à-vis du radical DPPH a été par la suite évalué par spectrophotométrie à 517 nm. Le pouvoir antiradicalaire de la quercétine, l'acide gallique et la rutine a été déterminé dans les mêmes conditions à des fins comparatives.

L'activité antiradicalaire des différents extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* ainsi que les standards est illustrée dans les Figures (43, 44 et 45).

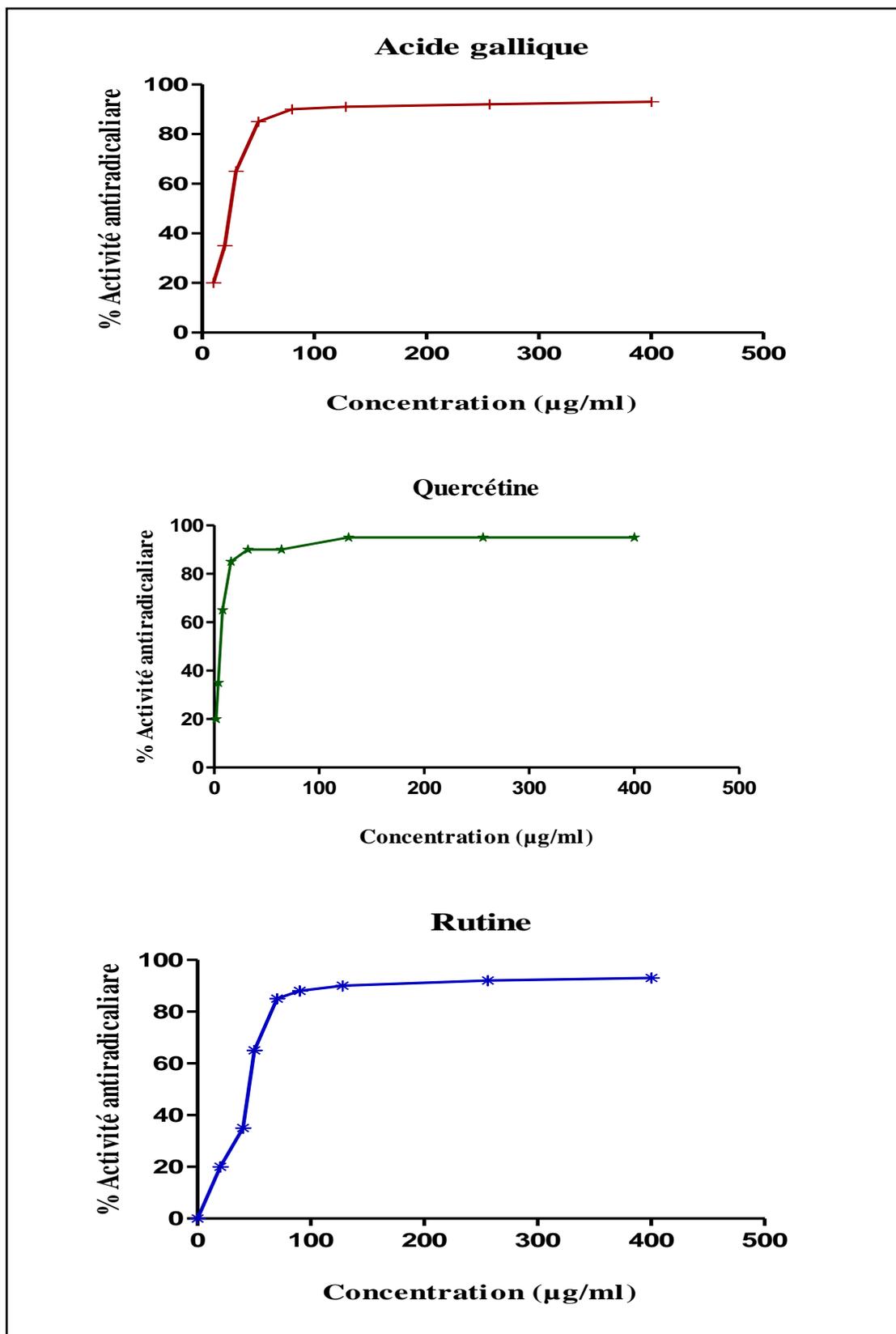


Figure 43. Pouvoir antiradicalaire des standards utilisés dans la présente étude.

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

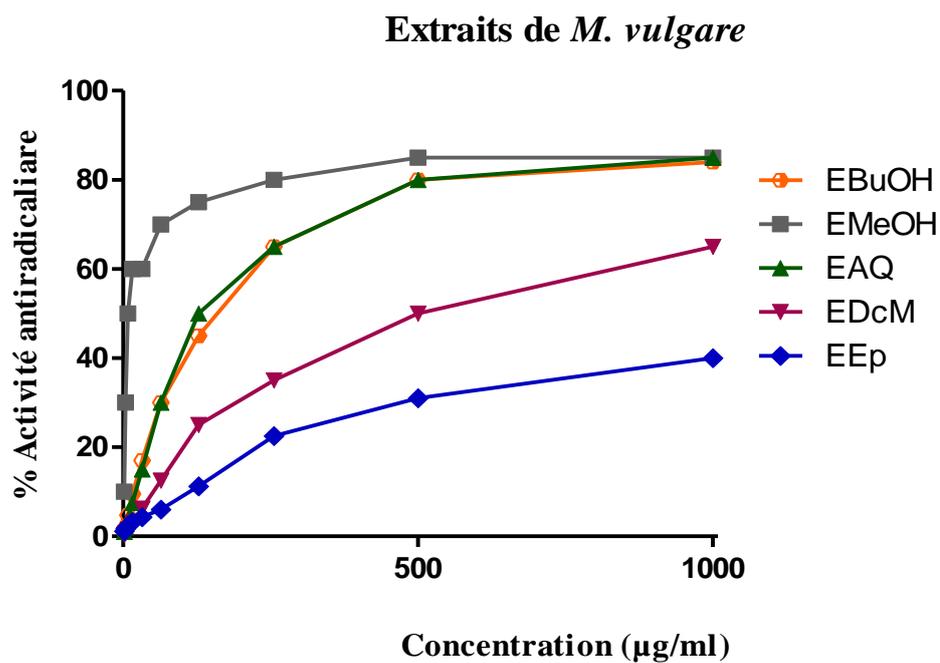


Figure 44. Activité antiradicalaire des extraits de *M. vulgare*

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

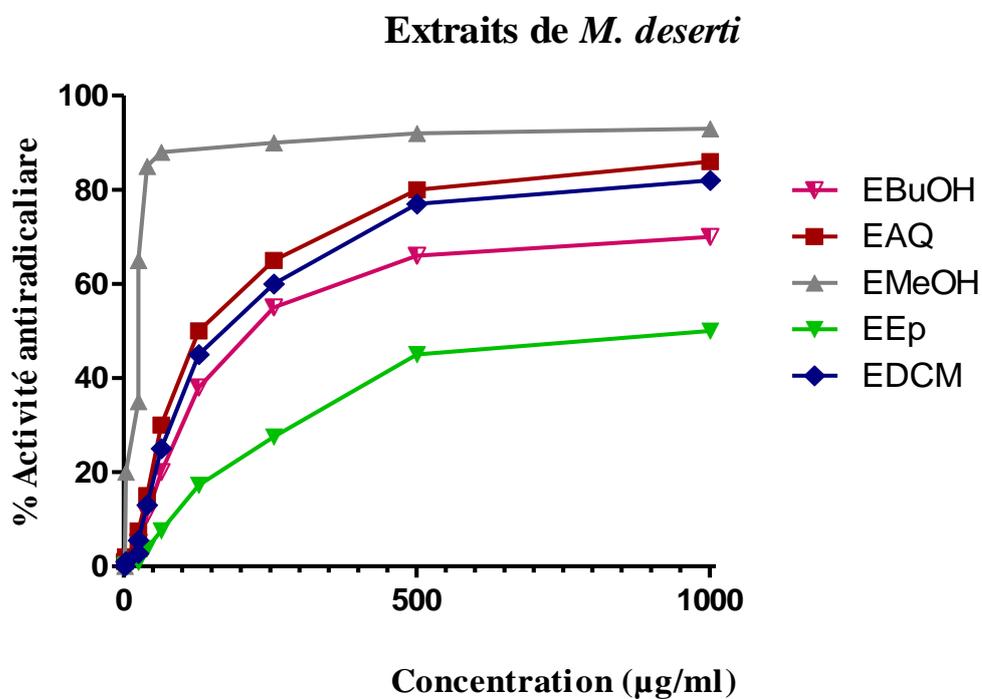


Figure 45. Activité antiradicalaire des extraits de *M. deserti*

(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Nos résultats montrent que les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*, ainsi que les standards exercent une activité antiradicalaire d'une manière dépendante de la concentration (Figures 43 à 45). L'activité augmente avec la concentration pour atteindre un maximum au-delà duquel elle reste constante (plateau). Ce phénomène est interprété par le transfert de(s) électron(s) célibataire(s) qui sont localisés dans l'orbitale externe de l'atome de nitrogène (N) du DPPH à cause de leur réaction avec les électrons issus des molécules antioxydantes (l'antioxydant va être oxydé par donation des protons pour réduire le DPPH• en DPPH-H) et après avoir atteint une concentration donnée l'antioxydant stoppe de ce réagir avec le radical DPPH-H complètement réduit quoi que la concentration de l'extrait est augmentée puisque cela s'accompagne par la saturation des couches électroniques externe du radical.

Les valeurs d'IC₅₀ de chacun des différents standards et des extraits sont calculées et sont représentées dans le Tableau 27 et la figure 46. Selon **Khoudali et al. (2014)**, ce paramètre (l'IC₅₀) est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante (**Kadri et al., 2011**).

L'EMeOH de la plante *M. vulgare* présente l'activité antiradicalaire la plus élevée (IC₅₀ = 12,40 ± 1,4 µg/ml). Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par l'EDCM (IC₅₀ = 500,3 ± 0,94 µg/ml), pour l'EEp, le pouvoir antiradicalaire n'atteint même pas 50%. L'étude statistique par ANOVA montre une différence très significative ($P < 0,0001$) entre les valeurs d'IC₅₀ obtenues par ces extraits. En ce qui est des extraits de *M. deserti*, l'EMeOH se montre toujours le plus efficace vis-à-vis du radical DPPH avec une IC₅₀ de l'ordre de 15,43 ± 1,11 µg/ml suivi par l'extrait aqueux, l'EDCM, l'EBuOH et enfin l'EEp dont le pouvoir antiradicalaire n'atteint même pas 50%.

Tableau 27. Valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les différents extraits et standards.

	Les Standards			Extraits de <i>M. vulgare</i>					Extraits de <i>M. deserti</i>				
	Que	Rut	AG	Ep	DcM	BuOH	MeOH	Aq	Ep	DcM	MeOH	BuOH	Aq
Valeurs d'IC ₅₀ µg/ml	5,39 ± 0,89	2,2,41 ± 2,06	8,60 ± 1,2	/	500,3 ± 0,94	145,6 ± 4,11	12,40 ± 1,4	125,5 ± 2,28	/	161,2 ± 1,5	15,43 ± 1,11	270,5 ± 2,2	125,5 ± 1,12

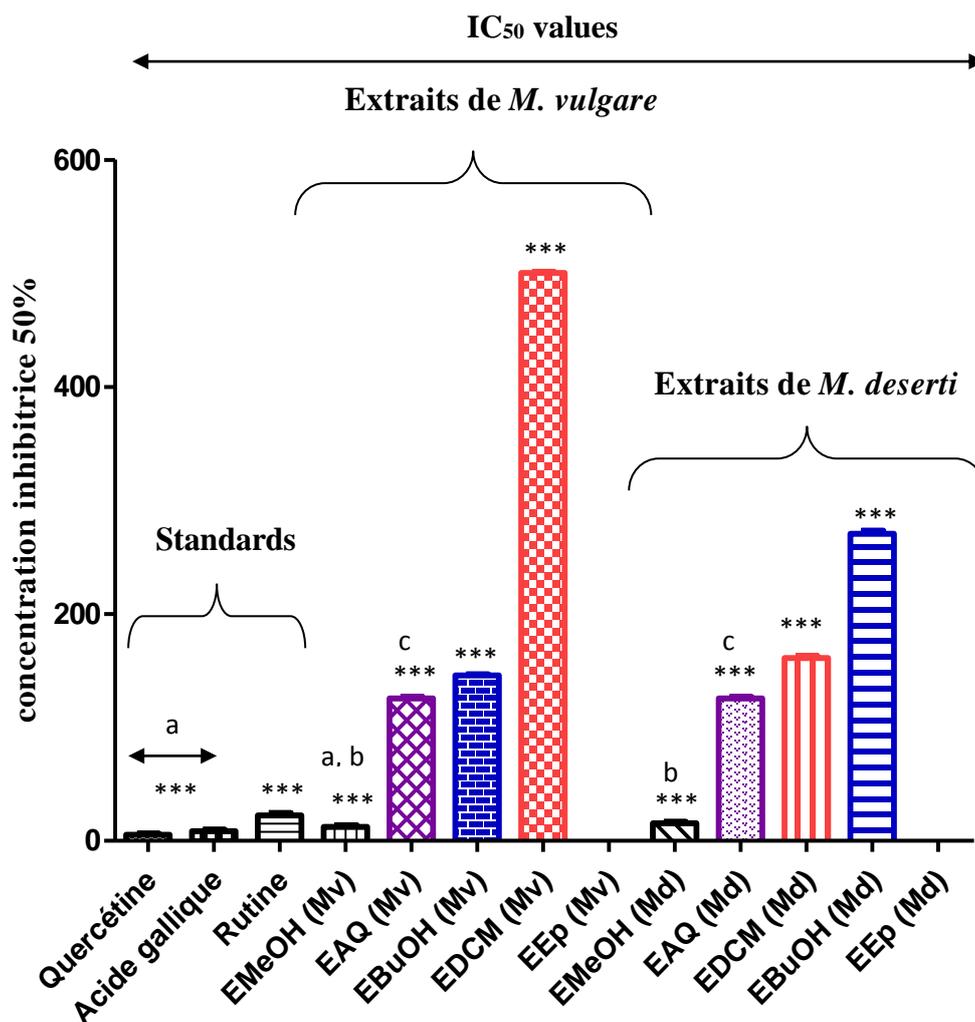


Figure 46. Histogrammes des valeurs d'IC₅₀ obtenues pour les différents extraits et standards (chaque valeur est la moyenne de 3 mesures \pm SD).

(*** signifié que $P < 0,0001$; les lettres indique que $P > 0,05$: pas de différence significative).

La comparaison statistique entre les différents standards et les extraits à révélé la présence d'une différence très significative ($P < 0,0001$) à l'exception entre l'acide gallique et l'extrait méthanolique de *M. vulgare* (EMeOH Mv) ou on a suggéré des effets proches ($P > 0,05$). Entre les extraits des deux plantes il apparait que la différence point de vue piégeage du DPPH est très hautement significative, sauf les extraits méthanoliques et aqueux qui exercent des effets similaires (pas de différence significative entre les mêmes extraits comme indiqué les lettres dans la Figure 46). On peut établir l'ordre de cette inhibition comme suit :

Quercétine > acide gallique > **EMeOH (Mv)** > **EMeOH (Md)** > Rutine > EAQ(Mv) > EAQ(Md) > EBuOH(Mv) > EDCM (Md) > EBuOH(Md) > EDCM(Mv).

L'activité antiradicalaire des extraits polaires pourrait s'expliquer par la présence des composés phénoliques qui sont détectés avec un taux élevé dans ces extraits surtout avec le méthanol.

En effet, l'EMeOH de *M. vulgare* a un pouvoir antiradicalaire important ($IC_{50} = 12,40 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$) et proche à celui exercé par l'acide gallique ($IC_{50} = 8,60 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$), toutefois, notons que cette activité obtenues avec les EMeOH des deux plantes est supérieure à celle obtenues avec la rutine ($IC_{50} = 22,41 \pm 2,06 \mu\text{g/ml}$) qui est une quercétine glycosylé. Cette glycosylation diminue ces propriétés antioxydantes à cause de la substitution de son groupement OH libre sur l'anneau C ce qui abaisse leur capacité scavenger.

Selon les travaux de **Ghedadba et al. (2014)** sur l'espèce *M. vulgare* cette activité est probablement due aux phénylpropanoïdes glycosides, qui sont considérés par plusieurs chercheurs comme des puissants antioxydants (**Seidel, 2000; Martin-Nizard, 2003; Berrougui et al., 2006**). Les plus importants sont le forsythoside B (**a**), le ballotétroside (**b**), l'arénarioside (**c**), l'actéoside (**d**) (verbascoside ou Kusagénine) et le marruboside (**Sahpaz et al., 2002a, 2002b; Hennebelle, 2006; Wolski et al., 2007; Pukalskas et al., 2012**).

Hennebelle (2006) a pu isoler quatre phénylpropanoïdes à partir de l'extrait méthanolique de *Marrubium peregrinum* dont le forsythoside B, le ballotétroside et le verbascoside, des flavones dont la Cosmosiine (apigénine-7-glycoside) et la ladanéine (5,6-dihydroxy-7,4' diméthoxyflavone) puis évalué leur activité antiradicalaire sur une solution méthanolique de DPPH en utilisant le Trolox comme standard. Dans cette étude, les flavones testées montrent une certaine activité, mais insuffisante pour qu'une IC_{50} puisse être établie, en revanche tous les phénylpropanoïdes testés se sont révélés très actifs. Selon **Hannebelle (2006)** les groupements *Ortho*-diphénoliques des phénylpropanoïdes (Figure 47) leur confèrent une activité antioxydante bien supérieure à celle des flavones. Ceci peut être dû à un transfert de radical entre les deux OH de façon intramoléculaire, qui permet une forte stabilisation et évite un transfert intermoléculaire (**Hannebelle, 2006**).

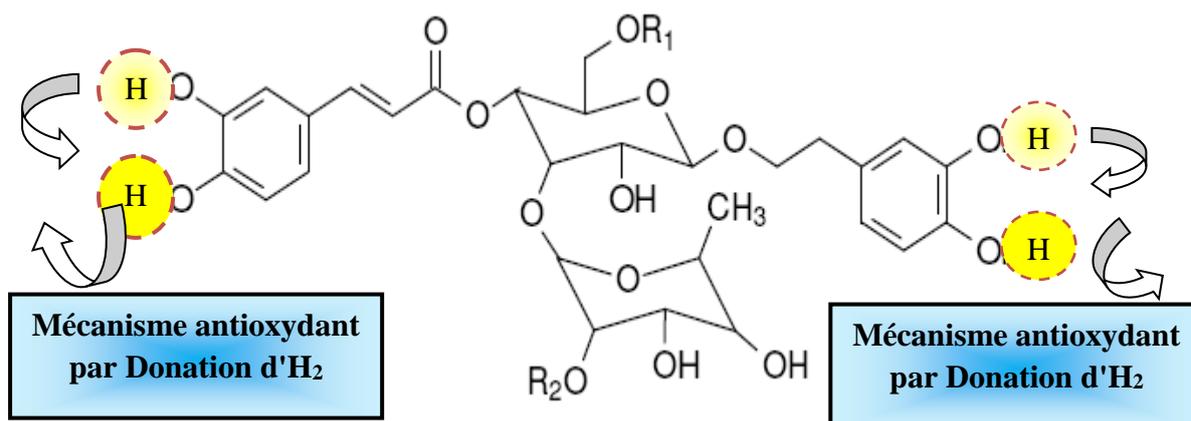


Figure 47. Structure chimique des phénylpropanoïdes glycosides de *Marrubium vulgare* et leur activité antioxydante

(Sahpaz *et al.*, 2002a; Hennebelle, 2006; Wolski *et al.*, 2007; Pukalskas *et al.*, 2012).

- (a) : R1 = β -D-apiose, R2 = H; (b) : R1 = β -D-apiose, R2 = α -L-arabinose;
 (c) : R1 = β -D-xylose, R2 = H; (d) : R1 = H, R2 = H.

De même, **Zaabat *et al.* (2011)** ont pu isoler ces composés à partir des extraits polaires de *M. deserti* ce qui témoigne l'effet de l'EMeOH de cette plante dans cette activité antiradicalaire. Selon **Martin-Nizard *et al.* (2003)** ces composants sont capables d'inhiber *in vitro* l'oxydation des LDL induite par le cuivre (Cu^{2+}) et un générateur des radicaux libres : le 2,2'-azobis-2-méthylpropionamide.

En plus, ces composés préservent l'aspect morphologique de cellules endothéliales d'aorte bovine durant leur incubation avec des LDL modifiées par la myéloperoxydase (effet cytoprotecteur) : baisse de la fuite extracellulaire du lactate déshydrogénase, maintien de l'activité réductrice des mitochondries et réduction de l'accumulation d'hydroperoxydes. Enfin, ils diminuent de 25 à 40 % la libération, par les cellules endothéliales d'aorte bovine, d'*endothéline-1*, peptide à effet vasoconstricteur relargué par les cellules endothéliales.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Matkowski et Piotrowska (2006)** qui ont prouvé que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* de Pologne exprime une activité antioxydante remarquable vis-à-vis du radical DPPH ($\text{IC}_{50} = 1,15 \mu\text{g/ml}$). De même, **Yousefi *et al.* (2016)** ont révélé que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* exerce une forte activité inhibitrice envers le DPPH• avec IC_{50} de $8,24 \mu\text{g/ml}$. Selon **Yousefi *et***

al. (2016), l'activité antiradicalaire considérable de *M. vulgare* est associée à l'effet synergique entre les composés phénoliques et les flavonoïdes.

Une autre étude établie par **Edziri et al. (2012)** en Tunisie sur l'espèce *M. deserti* de Noé a signalée que l'EMeOH montre une activité antioxydante importante dans le piégeage de radical DPPH avec une IC₅₀ de l'ordre de 15 µg/ml. En revanche, nos résultats sont légèrement différents à ceux obtenus par **Krimat et al. (2014)** qui ont rapporté que l'EMeOH de la plante *M. vulgare* exerce un pouvoir scavenger avec une IC₅₀ de 84,20 ± 0,30 µg/ml. En effet, **Bouterfas et ses collaborateurs (2016)** ont montré que les résultats de cette activité varient selon le type du solvant utilisé ainsi qu'à l'origine de la plante étudiée. Ces chercheurs ont mentionné que l'EMeOH de l'espèce *M. vulgare* issue de la région de Tessala exprime un effet scavenger meilleur que celui préparé de l'espèce *M. vulgare* issue de la région de M'Sila (IC₅₀ de 33,7 µg/ml et 52,7 µg/ml respectivement). Toutefois, notons que cette activité dépend également d'un certain nombre de paramètres : la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule.

L'activité antiradicalaire de l'EDCM pourrait être expliquée par la présence des terpénoïdes. Plusieurs auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante de *M. vulgare* est due aux huiles essentielles qui ont une capacité importante d'agir comme donateurs d'atomes d'hydrogènes ou d'électrons d'où la transformation réductive de DPPH[•] en α-α, diphényl-β-picryl-hydrazine, de couleur jaune, était attribué à la présence de nombreuses molécules bioactives telles que : les monoterpènes oxygénés (thymol), le mélange de mono et sesquiterpènes hydrocarbures, β-citronellol, thujones, camphre, β-bisabolène et l'Eugénol (**Belhattab et al., 2006; Orhan et al., 2010; Kadri et al., 2011**). Ainsi **Kadri et al. (2011)** ont mentionné qu'une concentration de 300 µg/ml de l'hydro-distillat de *M. vulgare* donne une inhibition de 79,00 ± 3,00 % envers le DPPH.

En outre, l'activité antioxydante de l'EAQ pourrait être due aux polyphénols et aux flavonoïdes qui sont des puissants donateurs d'hydrogène au radical DPPH parce que leur structure chimique est mieux convenable pour exercer de tel effet (**Turkmen et al., 2007**). **Wojdylo et al. (2007)** ont montré que la mesure de l'activité antioxydante des polyphénols totaux de *Epilobium hirsutum* donne une inhibition significative de 2021 ± 22.1 µM Trolox/100 g de pois sèche vis-à-vis du radical DPPH. Dans ce travail, l'analyse statistique montre l'existence d'une corrélation

linéaire significative ($r = 0,82$; $r = 0,91$, $r = 0,75$) entre la teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en tannins successivement et l'activité antiradicalaire des extraits, ce qui confirme la contribution de ces composés dans cette activité antiradicalaire. Nos résultats convergent avec ceux obtenues par d'autres chercheurs (**Djeridane et al., 2006**; **Katalinic et al., 2006**; **Wojdylo et al., 2007**; **Matkowski et al., 2008**; **Stanković, 2011**; **Edziri et al., 2012**; **Amessis-Ouchemoukh et al., 2014**) qui ont montré la présence d'une relation proportionnelle entre l'activité antiradicalaire et la teneur des extraits en polyphénols totaux.

La structure des molécules bioactives jouent un rôle important dans le piégeage du radical DPPH. Cela est lié essentiellement à l'arrangement des groupes fonctionnels attachés à la structure de base. **Hannebelle (2006)** a déclaré que la marrubiine ($C_{20}H_{28}O_4$) n'a aucune activité captatrice vis-à-vis du radical DPPH car sa structure est dénuée de groupement phénolique ou de tout autre groupement connu pour être antioxydant. **Burda et Oleszek (2001)** ont rapporté que la 4'-*O*-méthylation de la structure 3',4'-catéchol réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes. Des études concernant la 4'-*O*-méthylation ont montré que la 4-*O*-méthylation de quercétine en tamarixetine réduit l'inhibition de la peroxydation lipidique.

D'autres études rapportent que la capacité de 3',4'-diméthoxykaempférol de piéger les peroxydes est deux fois plus faible que celle du kaempférol (**Burda et Oleszek, 2001**). Selon **Pukalskas et al. (2012)**, *M. vulgare* renferme un flavonoïde : ladanéine qui est méthoxylé en position 4' et 7, ce qui diminué sans doute son pouvoir antiradicalaire. Cela peut s'expliquer par un effet stérique qui modifier la planéité du flavonoïde et par la suite sa capacité à délocaliser les électrons (**Hadj-Salem, 2009**).

D'autre part, d'après les travaux de **Nawwar et al. (1989)**, il apparait que la plupart des flavonoïdes de *M. vulgare* sont glycosylés, ce qui diminue légèrement leur activité antiradicalaire, étant donné que les glucides qui occupent la position de l'OH sur le flavonoïde diminuent la chance pour que le radical comme DPPH être réagi par ces molécules. **Zaabat et al. (2010)** ont montré que les dérivés de l'apigénine 7-*O*- mono et di glycosylés : apigénine -7-*O*-néohesperidoside, apigénine-7-*O*glucoside de *M. deserti* ne présentent aucune activité antioxydante. **Wojdylo et al. (2007)** ont confirmé que les flavonoïdes aglycones sont doués d'une activité antiradicalaire mieux qu'être attribuée aux flavonoïdes glycosides, ce qui en accord avec nos résultats (les valeurs d'IC₅₀ obtenues avec la quercétine et la rutine).

3. 2. 3. Méthode FRAP *in vitro* (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

La concentration des composés réducteurs (antioxydants) dans les extraits est exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extrait ($\mu\text{g EAA/g}$ d'extrait). Les standards utilisés sont l'acide ascorbique et l' α -tocophérol. Les résultats obtenus sont illustrés graphiquement dans les figures (48 et 49).

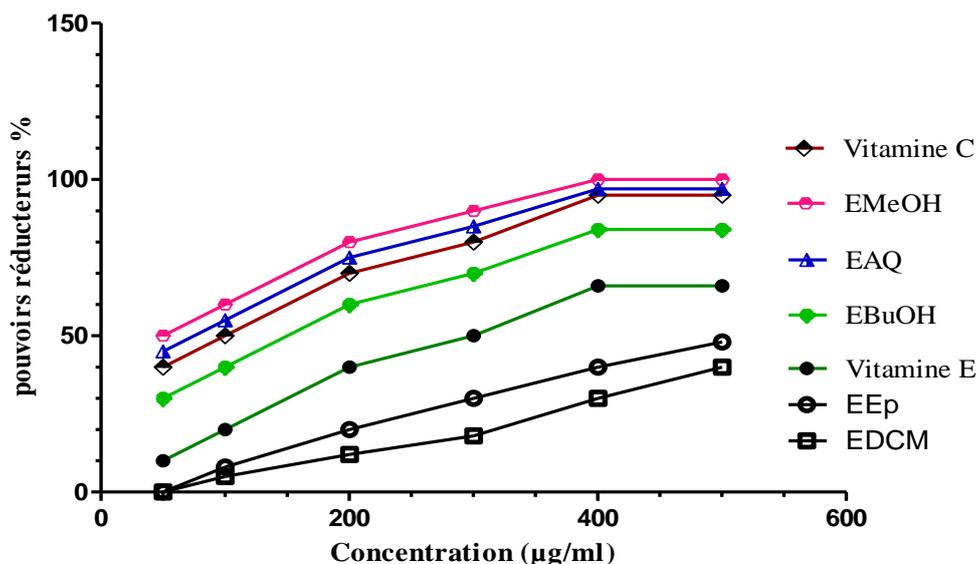


Figure 48. Pouvoir réducteur (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) des extraits de *M. vulgare* et des standards. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

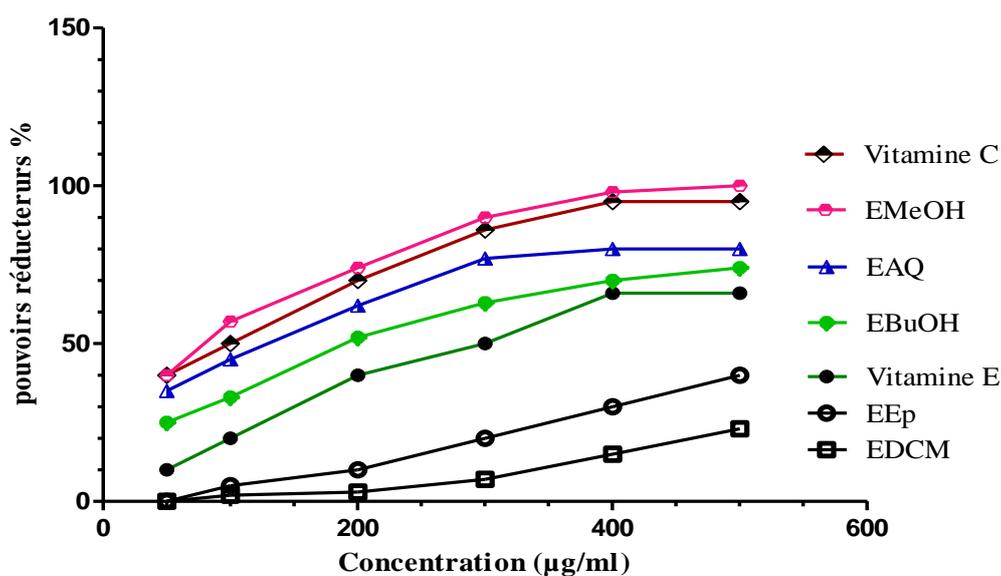


Figure 49. Pouvoir réducteur (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) des extraits de *M. deserti* et des standards. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les standards, aussi bien que et les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* réduisent les ions ferriques en ions ferreux d'une manière dépendante de la concentration. Les pouvoirs réducteurs de chacun des différents standards et des extraits sont représentés en histogrammes (Figure 50).

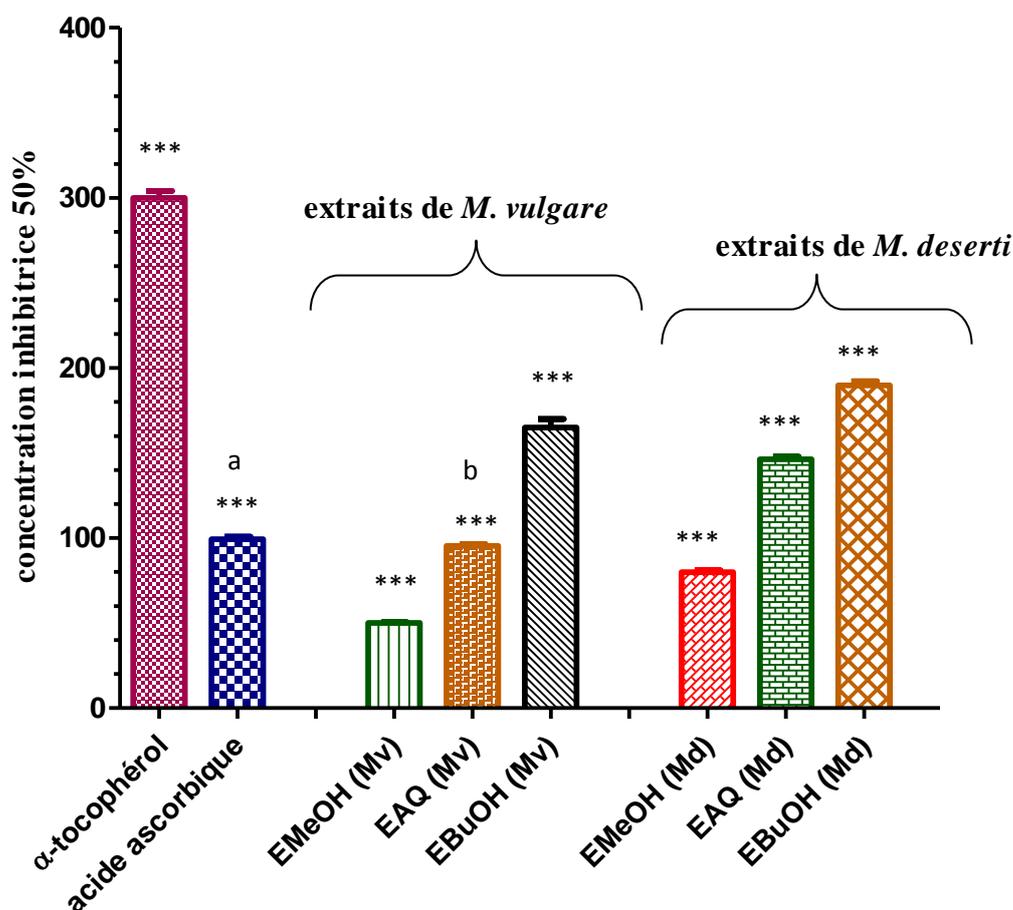


Figure 50. Comparaison des pouvoirs réducteurs des extraits de *M. vulgare* et de *M. deserti* obtenus par la méthode FRAP

(Chaque valeur est la moyenne de 3 mesures \pm SD).

(*** signifié que $P < 0,0001$; les lettres a-b, indique que $P > 0,05$: pas de différence significative).

Dans cette analyse qui est rapide, reproductible et facile, l'activité antioxydante est déterminée par la mesure de la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux

(Fe²⁺), l'acide ascorbique montre un pouvoir réducteur remarquable avec une concentration de l'ordre de $99,33 \pm 1,52 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait, en revanche, l' α -tocophérol indique plutôt un pouvoir réducteur faible vis-à-vis les ions ferriques (Fe³⁺) avec une concentration de $300,0 \pm 4,0 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait. En ce qui concerne les extraits, on note que l'EMeOH de la plante *M. vulgare* montre une excellente capacité réductrice (concentration = $50,01 \pm 0,24 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait), suivi par l'extrait méthanolique de *M. deserti* (concentration = $80 \pm 1 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait), l'EAQ de *M. vulgare* témoigne également une réduction considérable dépassant celle exercée par la vitamine C (concentration = $95,30 \pm 1,27 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait), par contre l'autre extrait (EAQ) de *M. deserti* a révélé un potentiel de captation faible envers les ions Fe³⁺ (concentration = $146,3 \pm 1,52 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait) et enfin les EBUOH des deux plantes témoignent aussi une faible valeur réductrice avec des concentrations qui dépassent $150 \mu\text{g EAA/g}$ d'extrait.

L'analyse statistique par ANOVA one way montre une différence très hautement significative ($P < 0,0001$) entre les valeurs des concentrations obtenues par ces extraits et les standards. La comparaison Tukey indique aussi qu'entre l'EAQ de *M. vulgare* et l'acide ascorbique, il n'existe pas de différence significative ($P > 0,05$). Ainsi, la capacité antioxydante des différents extraits et standards est dans l'ordre suivant : α -tocophérol < EBUOH (Md) < EBUOH (Mv) < EAQ(Md) < acide ascorbique \leq EAQ(Mv) < **EMeOH (Md)** < **EMeOH (Mv)**. D'après ce classement, il apparait que les extraits polaires surtout le méthanol ont une capacité très élevée dans la réduction des ions ferriques par rapport à celle des standards employés. Toutefois, notons que les extraits apolaires (EEp et l'EDCM) ne montrent aucun pouvoir réducteur, par conséquent les concentrations inhibitrices pour ces extraits ne sont pas détectées. D'autre part, on note que le pouvoir réducteur de l' α -tocophérol est très faible par rapport à celle de l'acide ascorbique.

Comme nous l'avons vu lors de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de blanchiment du β -carotène, l' α -tocophérol inhibe l'oxydation du β -carotène d'une manière hautement significative à 100%. Donc l'efficacité de ce standard dépend du type de test utilisé dans la mesure de l'activité antioxydante. Le degré de la solubilité d'une molécule dans un milieu donné dépend de ses caractéristiques physicochimiques et donc de sa nature : liposoluble ou hydrosoluble. Comme l' α -tocophérol est connu comme étant liposoluble, il devient donc efficace dans les

expériences qui se déroulent dans les milieux lipophiles, c'est le cas du test de blanchiment du β -carotène-acide linoléique. Cependant, il devient inefficace dans les tests réalisés en solution aqueuse comme la méthode FRAP, ce qui est en accord avec nos résultats. C'est pour cette raison, les extraits apolaires (EEp et l'EDCM) des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* ne montrent aucun pouvoir réducteur dans le test FRAP. C'est dans ce cadre qu'**Edziri et al. (2012)** ont montré que l'EEp apolaire de *M. deserti* inhibe d'une façon significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique- β -carotène ($77.00 \pm 0.02\%$) d'une manière comparable à celle de l' α -tocophérol qui a été utilisé comme un contrôle positif (82.51 ± 0.14). Dans le cas contraire, ce même extrait apolaire s'est montré, selon les mêmes auteurs, moins efficace lors de l'évaluation de son activité en utilisant deux tests : DPPH et ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), en revanche l'EMeOH de *M. deserti* est le plus puissant.

Selon **Bangou et al. (2012)**, la méthode de blanchiment du β -carotène est conseillée pour évaluer la capacité des molécules antioxydantes lipophiles et hydrophiles, tandis que le test DPPH est utilisé beaucoup plus pour tester le pouvoir antiradicalaire des molécules antioxydantes hydrophiles et lipophiles et enfin la méthode FRAP est employée pour évaluer le pouvoir réducteur des molécules hydrophiles seulement comme l'acide ascorbique, la quercétine. Par contre d'autres études affirment que l'augmentation de l'activité FRAP dépend de l'augmentation de la polarité des solvants (**Matanju et al., 2008 ; Atmani, 2009 ; Li et al., 2009**).

On peut donc constater que les deux facteurs influençant sur les résultats de l'activité antioxydante sont la nature des molécules antioxydantes présentes dans les extraits et la méthode utilisée pour évaluer cette activité. Toutefois, notons que la faible absorbance des extraits apolaires (EEp et EDCM) observée dans les figure (48, 49) ne signifie pas que ces extraits possèdent un pouvoir réducteur, car cela peut être due à la réduction des ions Fe^{3+} par les électrons issus de la chaîne photosynthétique de la membrane des thylakoïdes de chloroplastes à cause de la présence du chlorophyle dans les extraits apolaires. L'activité réductrice des extraits polaires est due probablement aux composés phénoliques, notamment les flavonoïdes qui jouent un rôle très important dans la réduction des métaux de transition impliqués dans la réaction de Fenton. Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la réduction des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites

essentiels pour la chélation des ions métalliques : (i) les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B (les fonctions catéchol), (ii) les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C (le motif *énone*), (iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxy en position 3. Ainsi, la quercétine qui se combine avec tous ces substituants, donne un complexe métallique particulièrement efficace. Ce processus d'autoxydation dépend de multiples paramètres tels que la concentration de l'ion métallique et du polyphénol, la température, le pH, la présence d'agents complexants... (**Van Acker et al., 1996**).

Une autre étude analysant la capacité de réduction du fer par les polyphénols des plantes montre que le noyau catéchol est la structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et selon cette étude cette structure augmente le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas. **DeGraf-Johnson et al. (2007)** ont montré que cette activité est due à la participation des groupements OH liés au noyau catéchol.

3. 3. Test de l'activité hémostatique *in vitro*

Le choix d'étudier l'activité hémostatique de l'extrait aqueux des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* a été fait en raison de son utilisation en médecine traditionnelle pour traiter les saignements sanguins suite à une blessure sous forme de cataplasme. Ce dernier est préparé dans la plupart du temps par la macération ou la décoction des feuilles hachées dans l'eau. Les résultats de cette activité sont représentés dans le Tableau 28 et l'analyse statistique est indiquée dans la Figure 51.

L'extrait aqueux des parties aériennes de *M. vulgare* et *M. deserti* (aux concentrations de 50, 100, 200 et 500 mg/ml) entraîne une diminution dose dépendante du temps de recalcification de plasma *in vitro*. Cette observation est une indication intéressante en faveur d'une activité hémostatique de l'extrait aqueux de *M. vulgare* et *M. deserti*.

On peut dire que les extraits aqueux des deux plantes précipitent les protéines de sang ce qui témoigne l'activité de ces plantes comme astringente. Il est important de signaler que cette activité astringente implique une vasoconstriction, ce qui est un paramètre important dans l'hémostase. Cette vasoconstriction est due probablement à la présence de tannins dans ces plantes (**Bruneton, 1999**).

Tableau 28. Temps de coagulation obtenus après le traitement du plasma avec l'extrait aqueux de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Dose de l'extrait (mg/ml)	Temps de coagulation (en second)	
	Plasma avec l'EAQ de <i>M. vulgare</i>	Témoin
50	94 ± 0,01 (s)	112 ± 0,01 (s)
100	82 ± 0,01 (s)	
200	76 ± 0,03 (s)	
500	73 ± 0,03 (s)	
Dose de l'extrait (mg/ml)	Plasma avec l'EAQ de <i>M. deserti</i>	Témoin
20	109 ± 0,01 (s)	112 ± 0,01 (s)
50	99 ± 0,02 (s)	
100	85 ± 0,02 (s)	
200	78 ± 0,04 (s)	

- Chaque valeur est la moyenne de trois mesures ± SD.

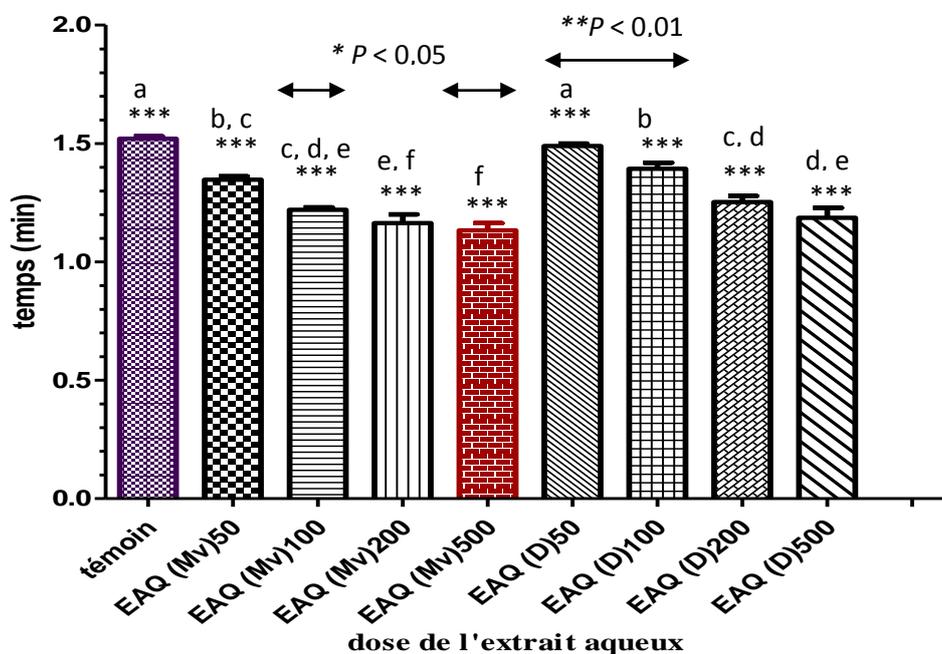


Figure 51. Histogrammes représentant les différences statistiques obtenues pour l'activité hémostatique

(*** signifié que $P < 0,0001$; les lettres a-b-c-d-f, indique que $P > 0,05$: pas de différence significative).

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Aouissa (2002)** qui a constaté que la propriété astringente des feuilles de *Mangifera indica* était étroitement liée à leurs contenus en tanins ayant un effet hémostatique et vasoconstricteur bénéfique sur les petits vaisseaux, ainsi que leur utilisation est indiquée contre les varices et les hémorroïdes. Selon **Bruneton (1999)**, les tanins utilisés par la voie orale, sont vasoprotecteurs car ils limitent la perte de sang et favorisent la régénération des tissus en cas de blessure ou de brûlure superficielle.

Nos résultats du dosage quantitatif ont révélé la richesse de l'EAQ des deux espèces en tannins condensés avec une valeur élevée et très importante de $16,55 \pm 0,03$ mg EC par g d'extrait pour *M. vulgare* et de $15,68 \pm 0,08$ mg EC par g d'extrait pour la plante *M. deserti*, ce qui est en accord avec les résultats mentionnés dans le Tableau 28. En effet, l'activité hémostatique de l'EAQ de la plante *M. vulgare* est importante en comparaison avec l'activité hémostatique de l'EAQ de *M. deserti* ($P < 0,001$). Ceci pourrait être attribué à la richesse de *M. vulgare* en tanins qui seraient à l'origine de sa grande efficacité hémostatique. En effet, l'analyse statistique a révélé une corrélation linéaire positive entre la teneur en tanins condensés et l'activité hémostatique ($r = 0,96$). Ces observations suggèrent un rôle probable de ces composés qui sont des vaso-constricteurs puissants dans l'activité hémostatique des extraits de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Bouterfas et al. (2013)** qui ont constaté que les fleurs de *M. vulgare* accumulent des teneurs appréciables en tanins condensés, équivalentes à celles observées pour les feuilles sèches. De plus, les travaux de **Djahra et al. (2013)** et **Amessis-Ouchemoukh et al. (2014)** ont montré la richesse de la plante *M. vulgare* en tanins. Quant à *M. deserti*, il y a très peu de données bibliographiques et notre étude est la première à s'intéresser aux tanins contenus dans cette plante. D'après **Bruneton (1999)**, l'activité hémostatique de la plante peut s'expliquer par la présence des tanins et des flavonoïdes. En effet, ils sont capables de réduire les saignements suite à une blessure. Cet effet serait dû à la présence des groupements hydroxyles phénoliques (OH) des tanins ou des flavonoïdes capables de réagir par des faibles liaisons hydrogène avec les acides aminés alcools (Ser, Thr) ou amides (Gln, Asn) des protéines, ce qui inhibe la thrombine, une enzyme protéolytique qui transforme le fibrinogène soluble en une molécule insoluble, la fibrine.

La présente étude indique que les extraits aqueux de *M. vulgare* et *M. deserti* ont une activité hémostatique. Toutefois, il est important de réaliser des études plus approfondies afin de chercher la ou les molécules bioactives impliquées dans ce processus hémostatique, contenues dans ces extraits. Ces biomolécules peuvent être également utilisées dans certaines chirurgies à risque hémorragique, en complément avec les médicaments hémostatiques afin de contrôler les pertes sanguines.

4. Evaluation des activités biologiques des extraits *in vivo*

4. 1. Etude de la toxicité aigüe

Dans ce test, deux doses des EMeOH (2000 et 5000 mg/kg) de chaque plante ont administrées *per os* chez des rats mâles albinos deux fois : le premier jour et le troisième jour du traitement. Les rats ont été observés pendant 14 jours. Les résultats des paramètres hématologiques et biochimiques sont reportés dans les Tableau (29 et 30) respectivement.

Tableau 29. Effet des différentes doses de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* sur les paramètres hématologiques des rats.

Paramètres étudiés	Groupe Témoin	Doses de l'EMeOH (Mv) (mg/Kg de P.C)		Doses de l'EMeOH (Md) (mg/Kg de P.C)	
		2000	5000	2000	5000
Globules rouge ($10^{12}/l$)	4,9 ± 0,6	4,7 ± 0,3	4,6 ± 0,8	4,68 ± 0,25	4,62 ± 0,81
Globules blanc ($10^9/l$)	8,6 ± 0,5	9,2 ± 2,1	9,4 ± 1,1	8,9 ± 2,07	9,14 ± 1,16
Plaquettes ($\times 10^9/l$)	669 ± 139,7	675 ± 205,4	654 ± 49,5	681 ± 128,3	649 ± 49,5
Hémoglobine (g/dl)	14,3 ± 1,0	13,6 ± 0,7	13,5 ± 0,8	13,9 ± 0,67	13,7 ± 0,08

- Les résultats sont exprimés en **moyennes ± SEM**, (n = 5/lot).

- La comparaison a été faite par rapport le groupe contrôle (témoin), indique qu'il n'y a pas une différence significative entre les valeurs obtenues ($P > 0,05$).

EMeOH (Mv), EMeOH (Md) : extrait méthanolique de *M. vulgare* et *M. deserti*.

Tableau 30. Effet des différentes doses de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* sur les paramètres biochimiques des rats.

Paramètres étudiés	Groupe Témoin	Doses de l'EMeOH <i>M. vulgare</i> (mg/Kg de P.C)		Doses de l'EMeOH <i>M. deserti</i> (mg/Kg de P.C)	
		2000	5000	2000	5000
Glycémie (g/l)	1,06 ± 0,24	0,86 ± 0,22	0,74 ± 0,18	0,93 ± 0,14	0,80 ± 0,26
Urée (g/l)	0,39 ± 0,10	0,40 ± 0,03	0,36 ± 0,06	0,38 ± 0,04	0,37 ± 0,05
Cholestérol (g/l)	0,42 ± 0,09	0,37 ± 0,02	0,40 ± 0,10	0,39 ± 0,22	0,41 ± 0,11
Triglycérides (g/l)	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,02	0,32 ± 0,03	0,25 ± 0,13	0,31 ± 0,04
HDL-Cholestérol (g/l)	0,20 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,19 ± 0,07
LDL-Cholestérol (g/l)	0,23 ± 0,05	0,19 ± 0,02	0,23 ± 0,06	0,21 ± 0,07	0,25 ± 0,06
ALAT (UL)	8,34 ± 0,95	5,30 ± 1,43*	5,13 ± 1,67*	5,26 ± 0,97*	5,46 ± 0,64*
ASAT (UL)	7,34 ± 2,27	5,58 ± 1,7*	5,23 ± 2,2*	5,82 ± 0,6*	5,42 ± 0,9*
Bilirubine (mg/l)	0,52 ± 0,17	0,44 ± 0,06	0,5 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,50 ± 0,09

- Les résultats sont exprimés en moyennes ± SEM, (n = 5/lot).

*: $P < 0,05$, est considéré comme une valeur significative par rapport au témoin.

D'après les résultats obtenus du test de toxicité aigüe, aucune perturbation n'a été observée et aucun cas de décès n'a été compté pour toutes les doses testées des deux

extraits pendant 14 jours d'observation, ce qui montre qu'il n'existe aucune toxicité remarquable jusqu'à la dose de 5000 mg/Kg de PC. Il convient de signaler que, immédiatement après avoir administré l'EMeOH de *M. vulgare* aux rats, on a remarqué un changement dans le comportement d'un grand nombre des rats qui entrent dans une période de sommeil profond pendant près de 3 ou 4 heures. Cette observation nous montre que l'EMeOH a un effet sédatif, ce qui est probablement dû à la présence de composés actifs dans l'extrait ayant un effet direct sur le système nerveux limbique (amygdala, septum, hippocampus) et exactement au niveau des récepteurs de GABA_A chimiodépendents associés aux ions de chlore (Cl⁻), mais le mécanisme d'action reste inconnu. Dans la littérature, Il y a quelques études à l'appui de cette idée, affirment que la plante *M. vulgare* a des effets sédatifs et hypnotiques sur des rats utilisés dans les études de laboratoire (De-Jesus *et al.*, 1999).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par (De Oliveira *et al.*, 2011) qui ont traité cinq rats femelles dans une étude de toxicité aiguë par voie orale avec une dose unique de 2000 mg/Kg d'extrait méthanolique de *M. vulgare*. Sur une période de 14 jours les animaux ont été observés et selon ces chercheurs, il n'y a pas de changements qui pourraient être détectés dans la peau, la fourrure, les yeux, le poids et en plus, aucun cas de mortalité n'a été prouvé, ce qui veut dire que l'extrait de la plante n'est pas toxique jusqu'à la dose testée. Nos résultats indiquent que la dose létale (DL₅₀) toxique de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* et *M. deserti* est probablement supérieure à 5000 mg/Kg.

D'après le Tableau 29 on note que tous les paramètres étudiés sont normaux et ne représentent aucune différence ($P > 0,05$) par rapport à ceux du groupe témoin sauf dans le cas du taux des enzymes (ALT et AST) où il y a une diminution significative ($P < 0,05$) par rapport aux valeurs enregistrées chez le groupe contrôle. Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que l'EMeOH pourrait avoir un effet hépatoprotecteur chez les rats ce qui en accordance avec les travaux d'Elberry *et al.* (2010) qui ont constaté que le même extrait de *M. vulgare* a un effet anti-hépatotoxique contre l'hépatotoxicité induite par CCl₄ (carbone tétrachlorure) chez le rat en diminuant le taux des enzymes (ALT, AST) d'une manière hautement significative ($P < 0,01$). Concernant la chimie des urines, les résultats sont reportés dans les Tableaux (31 et 32).

Tableau 31. Résultats des paramètres biochimiques obtenus par la chimie des urines pour l'EMeOH de *M. vulgare*.

paramètres	Acide ascorbique	Leucocytes	Nitrite	Protéines	pH	Sang	Densité	Cétones	Bilirubine	Glucose	Urobilobogène
Témoin 1	-	-	-	0,3	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 2	-	-	-	0,3	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 3	-	-	-	0,35	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 4	-	-	-	0,4	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 5	-	-	-	0,4	7	-	1,025	-	-	-	Normale
moyenne	-	-	-	0,35	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Lot 1 : R1	-	++75	-	-	6,5	-	1,030	-	-	-	Normale
Lot 1 : R2	-	++75	-	trace	6	-	1,025	-	-	-	Normale
Lot 1 : R3	+20	-	Trace	trace	7	-	1,030	-	-	-	Normale
Lot 1 : R4	+10	++75	-	0,35	6	-	1,015	-	+	-	Normale
Lot 1 : R5	+20	++75	-	-	6,5	-	1,025	-	-	-	Normale
moyenne	+10	++75	-	-	6,4	-	1,025	-	-	-	Normale
Lot 2 : R1	+20	-	-	Trace	6	-	1,025	-	+	-	Normale
Lot 2 : R2	-	-	Trace	-	6	-	1,030	-	-	-	Normale
Lot 2 : R3	+20	-	-	0,4	6,5	-	1,025	-	-	-	Normale
Lot 2 : R4	+20	-	-	-	6	-	1,020	-	-	-	Normale
Lot 2 : R5	-	-	Trace	trace	7	-	1,025	-	-	-	Normale
moyenne	+20	-	-	-	6,3	-	1,025	-	-	-	Normale

Tableau 32. Résultats des paramètres biochimiques obtenus par la chimie des urines pour l'EMeOH de *M. deserti*.

paramètres	Acide ascorbique	Leucocytes	Nitrite	Protéines	pH	Sang	Densité	Cétones	Bilirubine	Glucose	Urobilobogène
Témoin 1	-	-	-	0,3	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 2	-	-	-	0,3	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 3	-	-	-	0,35	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 4	-	-	-	0,4	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Témoin 5	-	-	-	0,4	7	-	1,025	-	-	-	Normale
moyenne	-	-	-	0,35	7	-	1,025	-	-	-	Normale
Lot 1 : R1	+20	-	Trace	-	6	-	1,015	-	-	-	Normale
Lot 1 : R2	00	-	-	-	6	-	1,020	-	-	-	Normale
Lot 1 : R3	+10	-	-	Trace	6,5	-	1,020	-	-	-	Normale
Lot 1 : R4	00	-	-	0,3	6	-	1,015	-	+	-	Normale
Lot 1 : R5	00	-	Trace	0,4	7	-	1,010	-	trace	-	Normale
moyenne	+5	-	-	0,2	6,3	-	1,016	-	-	-	Normale
Lot 2 : R1	00	-	-	trace	6,5	-	1,020	-	-	-	Normale
Lot 2 : R2	00	++75	trace	-	6	-	1,025	-	-	-	Normale
Lot 2 : R3	+20	-	trace	0,3	7	-	1,035	-	-	-	Normale
Lot 2 : R4	00	++75	trace	-	6,5	-	1,030	-	trace	-	Normale
Lot 2 : R5	00	++75	-	0,35	6,5	-	1,015	-	+	-	Normale
moyenne	+4	++75	-	0,125	6,5	-	1,025	-	-	-	Normale

D'après les Tableaux ci dessus, il apparait qu'il n'y a aucun signe de toxicité. Tous les paramètres étudiés ne montrent aucune différence entre le groupe témoin et les doses étudiées. Cela confirme les résultats obtenus avec les paramètres biochimiques et hématologiques.

En toxicologie, il est connu qu'une substance pharmacodynamique dont la DL_{50} est inférieure à 5 mg/kg de PC est ultra-toxique. Celle présentant une DL_{50} comprise entre 5 et 50 mg/kg de PC est une substance extrêmement toxique. Celle dont la DL_{50} pris entre 50 et 500 mg/kg de PC est considérée comme très toxique. Celle dont la DL_{50} se situe dans l'intervalle 500 à 5000 mg/kg de PC est modérément toxique. La substance ayant une DL_{50} se situant entre 5000 et 15000 mg/kg de PC est légèrement toxique et enfin celle dont la DL_{50} est supérieure à 15000 mg/kg de PC est dite non toxique (Diezi, 1989, cité par Nene BI *et al.*, 2008). Selon cette classification, les extraits méthanoliques des deux plantes étudiées *M. vulgare* et *M. deserti* de Noé administrés par la voie orale sont légèrement toxiques ou non toxiques.

4. 2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

4. 2. 1. Méthode de l'œdème plantaire induit par la carraghénine

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus comparés à des rats ayant reçu du diclofénac et de l'aspirine (Groupe 4 et 5) et à ceux du contrôle ayant reçu le sérum physiologique (Groupe 1, INT : enflammé non traité). L'évolution de l'inflammation pour les différents groupes est représentée dans le Tableau 33.

D'après le Tableau on constate que l'inflammation provoquée par la carraghénine augmente en fonction du temps et atteint un maximum de $7,04 \pm 0,04$ mm à la troisième heure. D'après l'analyse statistique réalisée par le test de « Dunnett », il apparait que les extraits méthanoliques des deux plantes inhibent d'une façon hautement significative la réaction inflammatoire ($P < 0,001$). Cette inhibition est en fonction du temps, or au temps égal (1 h) le diamètre de la patte mesuré est de $6,39 \pm 0,00$ mm pour les deux extraits, ainsi qu'au temps égal (2 h) le diamètre de la patte est de $6,42 \pm 0,05$ mm pour l'EMeOH de *M. vulgare* et de $6,87 \pm 0,01$ mm pour l'EMeOH de *M. deserti*. Les deux extraits ne présentent à ce temps de 2h aucune différence significative par rapport au groupe témoin ($P > 0,05$).

A partir de 3 h, les extraits représentent une inhibition hautement significative de l'inflammation de la patte dont le diamètre est réduit à $4,80 \pm 0,1$ mm pour *M. vulgare*

et $5,79 \pm 0,2$ mm pour *M. deserti*. A ce temps, l'analyse statistique montre que l'EMeOH de *M. vulgare* a un effet très proche à celui du diclofénac ($4,73 \pm 0,015$ mm), mais qui semble légèrement inférieur à l'effet de l'aspirine ($4,16 \pm 0,4$ mm) dans les mêmes conditions. Le suivi de la progression de la cinétique d'inhibition de l'œdème de la patte montre que les deux extraits ont un effet anti-inflammatoire considérable et expriment à la 5h un effet proche à celle du Dic (Tableau 33).

Tableau 33. Effet des extraits et des anti-inflammatoires de référence utilisés dans la présente étude sur l'œdème plantaire induit par la carraghénine chez les rats.

Groupes et doses (mg /kg)	Temps (h) et diamètre de la patte (mm)				
	1h	2h	3h	4h	5h
Témoin (INT)	6,43±0,01	6,94 ± 0,7	7,04 ± 0,04 ^b	6,88 ± 0,4 ^b	6,56±0,03 ^b
EMeOH (<i>M. vulgare</i>) 200 mg/kg	6,39±0,00 ^a	6,42±0,05 ^a	4,80 ± 0,1 ^a	4,41 ± 0,03 ^a	4,36±0,02 ^a
EMeOH (<i>M. deserti</i>) 200 mg/kg	6,39±0,00 ^a	6,87±0,01 ^a	5,79 ± 0,2 ^a	4,49 ± 0,05 ^a	4,41±0,2 ^a
Diclofénac	5,37±0,01 ^c	5,95±0,01 ^c	4,73 ± 0,015 ^a	4,63 ± 0,06 ^a	4,38±0,03 ^a
Aspirine	6,40±0,01	5,23±0,07 ^c	4,16 ± 0,4 ^{a, c}	3,98 ± 0,8 ^{a, c}	3,79±0,6 ^{a, c}

Valeurs représentées en **moyenne ± SEM**, (n=5). Les lettres (**a-b**) indiquent une différence hautement significative (***: $P < 0,001$) par rapport au témoin.

Les lettres (**a-c**) indiquent une différence hautement significative (***: $P < 0,001$) par rapport les groupes standards.

Les résultats montrent également que l'efficacité de l'aspirine dans l'inhibition de l'œdème plantaire chez les rats est comparable à celle du voltarène à partir de la 2^{ème} heure après l'injection de la carraghénine jusqu'à la 5^{ème} heure de traitement. On peut alors déduire l'ordre de cette inhibition comme suit : Aspirine > EMeOH de *M. vulgare* > Diclofénac > EMeOH de *M. deserti*.

La Figure 52 représente le pourcentage de l'inhibition de l'œdème induit par la carraghénine des différents extraits et des standards.

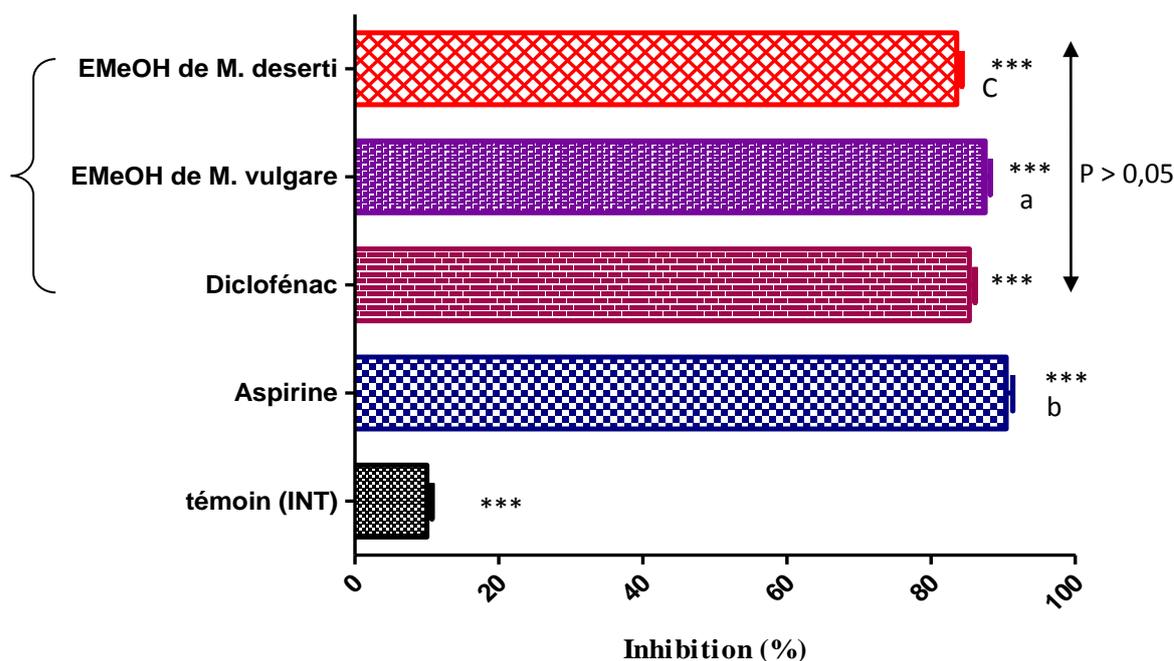


Figure 52. Histogrammes représentant le pourcentage de l'inhibition de l'œdème induit par la carraghénine des différents extraits (200 mg/kg) et des standards.

Les valeurs sont représentées en : **moyenne ± SEM ; (n = 5)**

(*** signifié que $P < 0,0001$ par rapport le témoin; les lettres a-b, indique que

* $P < 0,05$: entre l'aspirine et l'EMeOH de *M. vulgare* ; les lettres a-c, indique que

** $P < 0,01$: entre l'EMeOH de *M. vulgare* et l'EMeOH de *M. deserti*).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition de l'œdème chez le rat montre que les extraits méthanoliques des deux plantes possèdent une activité anti-inflammatoire, les valeurs enregistrées sont de $87,49 \pm 0,69$ % et $83,52 \pm 0,75$ % pour les deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* respectivement, par rapport à l'effet de deux anti-inflammatoires de référence (diclofénac et l'aspirine) qui donnent en respectifs des inhibitions de $85,31 \pm 0,76$ % et $90,40 \pm 0,92$ %. Les résultats de l'analyse statistique montrent que l'EMeOH de *M. vulgare* inhibe l'œdème causé chez le rat d'une manière hautement significative ($P < 0,01$) par rapport à l'EMeOH de *M. deserti*.

L'inhibition de l'œdème plantaire chez le rat signifie la présence des molécules bioactives dans l'EMeOH des deux plantes qui agissent probablement comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens en inhibant l'activité enzymatique de cyclooxygénase et permettent ainsi de limiter la quantité de médiateurs pro-inflammatoires produits lors de ce processus immunitaire.

Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique (chapitre I) lors de la description de COX, le site catalytique de cette famille enzymatique ressemble à un long tunnel terminé par un cul-de-sac élargi. Selon **Vane et al. (1998)**, les AINS non sélectifs bloquent l'entrée du site actif de COX par le substrat en se liant via leur groupement carboxyle à un résidu arginine en position 120 (Arg-120). Or, la plante *M. vulgare* renferme un composé important qui est l'acide marrubiique (**Ahmed et al., 2008**) qui regroupe 3 éléments distincts : un noyau aromatique central cyclique, un motif hydrophobe moins encombrant porté par le cycle et un groupement acide carboxylique, ionisable au pH physiologique.

Comme il regroupe ces trois éléments caractéristiques d'un AINS, l'acide marrubiique peut réagir avec l'enzyme COX grâce à l'établissement d'une interaction électrostatique entre la charge anionique du groupement carboxylique et la charge cationique de la fonction guanidine de l'Arg-120 (liaison ionique), il se forme ainsi un complexe: **acide marrubiique-COO⁻.....Arg₁₂₀-COX** (Figure 53), ainsi, cette liaison à l'arginine située à l'entrée du tunnel empêche l'acide arachidonique d'atteindre le site catalytique de l'enzyme. **Stulzer et son équipe (2006)** ont testé trois molécules issues de la plante *M. vulgare* sur l'effet anti-œdématogénique : la marrubiine, le marrubénol et l'acide marrubiique, ils ont démontré l'effet anti-œdématogénique de la marrubiine et de ses dérivés notamment, l'acide marrubiique qui est révélé le plus puissant. Il s'ensuit que les acides phénoliques (acide gallique, acide caféique et l'acide *P*-coumarique) peuvent exercer un effet anti-inflammatoire probablement par le même mécanisme.

D'autre part, dans notre travail publié en 2016, nous avons signalé que cette activité est probablement due à la présence d'autres composés présentés dans le marrube, qui sont les phénylpropanoïdes glycosylés qui peuvent être considérés comme des AINS non acide (**Ghedadba et al., 2016**).

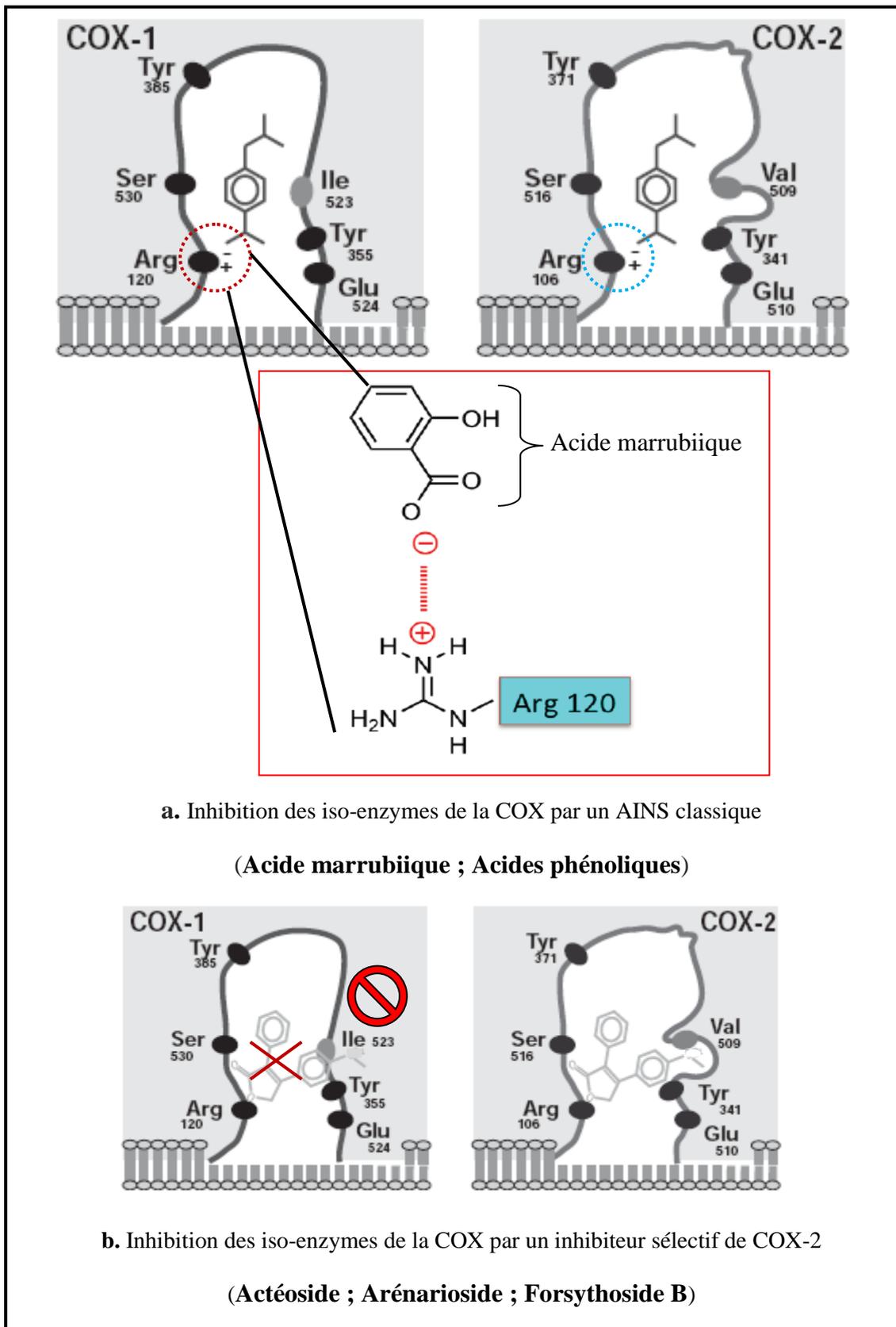


Figure 53. Inhibition des iso-enzymes de la cyclooxygénase par les AINS conventionnels ou les inhibiteurs sélectifs de COX-2.

Or, les travaux réalisés par **Sahpaz et ses collaborateurs (2002)** ont montré l'effet anti-inflammatoire puissant de ces composés en entraînant l'inhibition du cyclo-oxygénase 2 (Figure 53). Ces biomolécules constituent une particularité du fait qu'elles sont sélectives vis-à-vis le COX-2 en agissant ainsi comme étant des «*COXIBS*». En effet, le site actif COX-2 est dépourvu de l'isoleucine 523 et possède à la place une valine dont le groupement *isopropyle* est plus petit par rapport à *isobutyle*. La perte d'un groupe CH₃ permet de diminuer l'encombrement stérique : il se crée ainsi un passage vers une poche latérale qui devient alors accessible à des molécules relativement volumineuses comme les phénylpropanoïdes glycosylés.

La taille volumineuse de ces composés est due à la présence de deux noyaux benzéniques : les cycles aromatiques (Figure 47) qui vont permettre à ces composés de bien s'adapter à la taille importante du site actif COX-2 et par conséquent, ils ne peuvent pas accéder au site actif de la COX-1 (Figure 53). En effet, l'ancrage de ces composés dans le site actif du COX-2 favorise des interactions de type dipôle-dipôle entre les groupements OH des noyaux *Ortho*-diphénoliques de phénylpropanoïdes glycosylés et certains résidus polaires de la poche latérale du site COX-2 (Arg, His, Gln). Selon **Yousefi et al. (2014)**, les composants regroupés comme suit : le ballotétroside, l'arénarioside, l'actéoside, et le forsythoside B sont identifiés comme étant les principaux constituants anti-inflammatoires chez la plante *M. vulgare*. De plus, trois de ces molécules : l'actéoside, l'arénarioside et le forsythoside B ont une haute sélectivité anti-COX-2 que COX-1 (**Sahpaz et al., 2002; Yousefi et al. 2014**).

Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec ceux obtenus par **Kanyonga et al. (2011)**. D'autres études affirment que plusieurs plantes de la famille des Lamiaceae ont une activité anti-inflammatoire *in vivo* (**Stulzer et al., 2006**).

A. Dosage de CRP

Les résultats sont reportés dans le tableau 34.

Tableau 34. Résultats du dosage de la protéine C réactive.

Groupe témoin (INT)	Les extraits	Groupes standards
R ⁺	R ⁻	R ⁻
4,66	< 2	< 2

R⁻ : signifie une réaction négative

R⁺ : signifie une réaction positive

D'après le Tableau 34, il apparaît que le sérum des rats enflammés non traités contient une quantité importante de la CRP qui atteint un seuil de 4,66 unités, par contre cette protéine est absente dans le sérum des rats traités par les extraits ou par les AINS standards. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par un groupe de chercheurs en Egypte, **Essawy et al. (2014)** qui ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Marrubium alysson* (500 mg/kg) a un effet anti-inflammatoire bénéfique en réduisant significativement le taux de la protéine C réactive chez les lapins enflammés par ($3,4 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$) en comparaison au groupe des lapins non traité ayant enregistré un taux équivalent à $6,6 \pm 0,49 \mu\text{mol/l}$ dans les mêmes conditions. Des études montrent que la libération de l'histamine causée par l'injection de la carraghénine (agent phlogogène) provoque une vasodilatation suivie par la libération et l'activation des médiateurs plasmatiques de l'inflammation aigüe (le complément, la protéine C réactive), ces médiateurs entraînent par conséquence le recrutement de cellules de l'inflammation : les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles, les monocytes et les lymphocytes (**Stulzer et al., 2006**). On peut donc constater que les extraits qu'on a testés dans la présente étude contiennent des molécules bioactives, probablement des flavonoïdes qui inhibent la migration des leucocytes en diminuant le taux de ces médiateurs comme la protéine C réactive.

B. Evaluation de la vitesse de sédimentation

Les résultats sont reportés dans la Figure 54. D'après les analyses statistiques, nous avons remarqué que les deux extraits ainsi que les AINS standards utilisés dans notre travail de recherche réduisent la vitesse de sédimentation d'une façon hautement significative par rapport au groupe témoin enflammé non traité ($P < 0,0001$).

Selon **Suralkar et al. (2012)** la vitesse de sédimentation d'érythrocytes s'élève parallèlement en réponse à une réaction inflammatoire ce qui est en accord avec nos résultats obtenus avec le groupe témoin enflammé non traité, les valeurs enregistrées durant la 1^{ère} et le 2^{ème} heures sont de l'ordre de ($11,57 \pm 0,85$; $21,25 \pm 1,15$ mm/h) respectivement. Cependant, la VS diminue fortement avec le groupe des rats traités avec les extraits et les chiffres obtenus après 2 h sont de l'ordre de ($6,34 \pm 0,20$; $4,59 \pm 0,09$ mm/h) avec l'extrait de *M. deserti* et *M. vulgare* respectivement, ce qui suggère que l'EMeOH de *M. vulgare* est plus efficace que l'extrait de la deuxième plante, mais la différence n'est pas significative. D'autre part, les érythrocytes provenant du groupe traité avec l'aspirine se sédimentent plus rapidement que les

autres qui proviennent du groupe traité avec le diclofénac, les résultats obtenus après 2h sont de l'ordre de $3,13 \pm 0,05$ mm/h et $2,17 \pm 0,09$ mm/h en respectifs avec les groupes traités avec le diclofénac et l'aspirine.

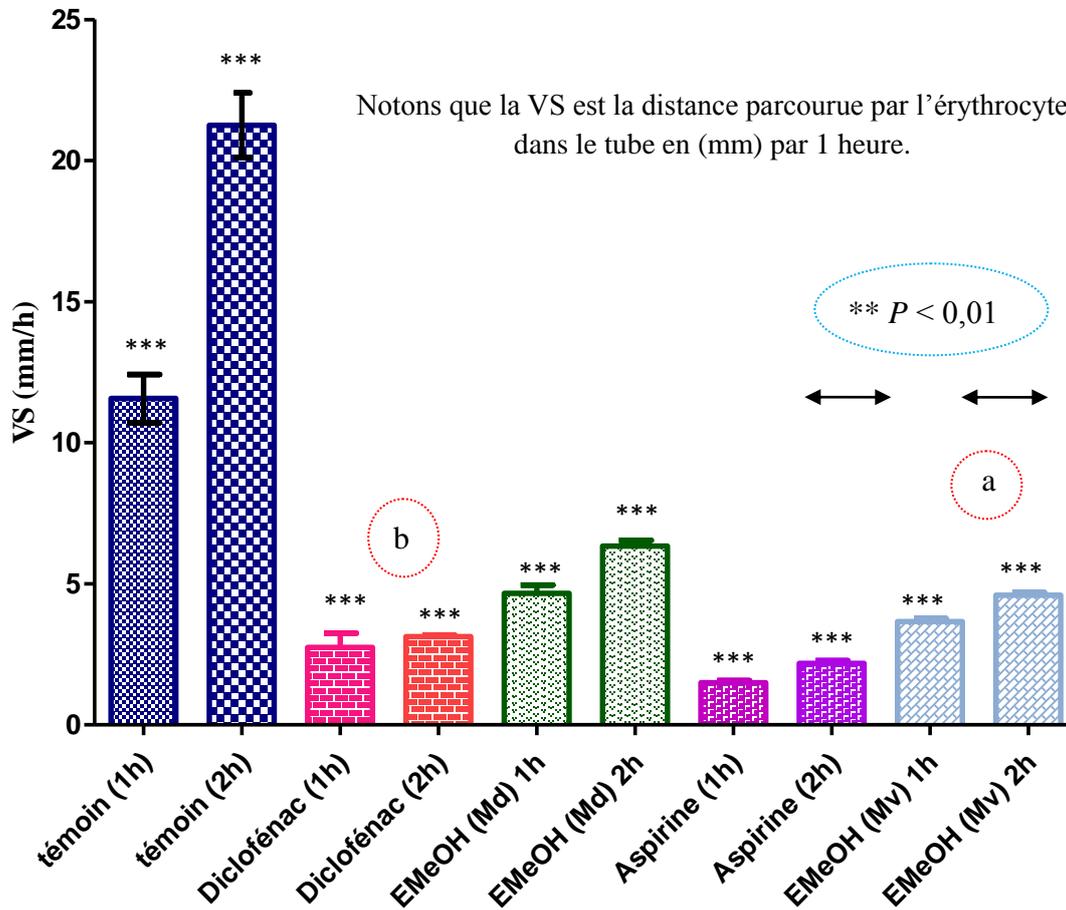


Figure 54. Histogrammes représentant la valeur de vitesse de sédimentation.

(*** signifié que $P < 0,0001$ par rapport le témoin, les extraits et les standards) ;

Les lettres (a-b), indique que pas de différence significative entre la VS du groupe traité par le diclofénac et le groupe traité avec l'EMeOH de *M. vulgare* (Mv).

4. 2. 2. Méthode de l'œdème de l'oreille induit par le xylène

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire obtenus sont comparés à ceux du diclofénac (Groupe 3) et à ceux du contrôle ayant reçu l'eau physiologique (Groupe 1). L'évolution de l'inflammation pour les différents groupes est mentionnée dans le Tableau 35.

Tableau 35. Effet des extraits et de l'AINS (diclofénac) sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les rats.

Groupes	La dose (mg/oreille)	Poids de l'œdème (g)	% d'inhibition
Témoin	-	0,142 ± 0,021 ^{\$}	-
EMeOH de <i>M. vulgare</i>	10	0,053 ± 0,029 #	62,67 %
	20	0,040 ± 0,033 #	71,61 %
	40	0,012 ± 0,009 #	91,33 %
EMeOH de <i>M. deserti</i>	10	0,086 ± 0,001 #	57,23 %
	20	0,072 ± 0,026 #	65,02 %
	40	0,039 ± 0,014 #	83,47 %
Diclofénac	100	0,009 ± 0,003 #	93,66 %

Valeurs représentées en **moyenne ± SEM**, (n= 5).

Les symboles (#, \$) indique une différence hautement significative par rapport au témoin ($P < 0.001$).

Les résultats obtenus montrent que l'inflammation causée par le xylène a atteint un seuil de (0,142 ± 0,021). D'après le tableau 35, il apparaît que les extraits de *M. vulgare* et *M. deserti* possèdent une activité anti-inflammatoire significative et dose dépendante contre l'œdème de d'oreille induit par le xylène. En effet, les groupes traités par les extraits et l'AINS standard montrent une diminution remarquable dans le poids de l'œdème qui est de l'ordre de (0,053 ± 0,029; 0,086 ± 0,001 g) pour l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* respectivement à la dose de (10 mg/oreille) et de (0,012 ± 0,009; 0,039 ± 0,014 g) à la dose de (40 mg/oreille). De même, l'AINS utilisés (diclofénac) montre des résultats semblables en induisant une diminution significative de l'œdème de l'oreille chez le groupe traité (0,009 ± 0,003 g).

Cette diminution correspond à l'inhibition de la réaction inflammatoire qui est de l'ordre de (91,33 %) pour l'EMeOH de *M. vulgare* et de (83,47 %) pour l'EMeOH de *M. deserti* à la dose de (40 mg/oreille) par rapport au diclofénac qui provoque une inhibition significative équivalent à 93,66 %. Comme nous l'avons vue pour l'activité antimicrobienne et antioxydante, l'activité anti-inflammatoire est influencée aussi par un certains nombres de facteurs, y compris la nature et la structure des molécules bioactives présentes dans les extraits, la méthode d'évaluation, le site de l'inflammation et la dose thérapeutique indiquée pour traiter l'inflammation.

Essawy et al. (2014) ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle de *M. alysson* possède un effet dose dépendant contre l'inflammation causée par un régime diététique riche en cholestérol chez les lapins par l'inhibition de l'expression de l'ARNm de la protéine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). En effet, selon ces chercheurs le traitement des lapins enflammés par cet extrait à la dose de 250 mg/kg montrent une inhibition de $92,7 \pm 6,2$ (pg/ml) du MCP-1, en augmentant la dose à 500 mg/kg, les mêmes auteurs suggèrent une inhibition importante de $85,3 \pm 6,5$ du MCP-1. En outre **Essawy et al. (2014)** ont montré que l'extrait hexanique de la même plante possède un effet moins efficace que celui de l'acétate d'éthyle, toutefois, notons que l'expérience se faite dans les mêmes conditions.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique des deux plantes contre l'œdème induit par la carraghénine peut être due à la présence des phénylpropanoïdes glycosylés (**Sahpaz et al., 2002**), des flavonoïdes (**Zaabat et al., 2010; Boudjelal et al., 2012**), des tannins (**Djahra et al., 2013**) et des diterpènes (**Stulzer et al., 2006**). L'étude établie par **Essawy et al. (2014)** montre la présence d'un effet synergique entre ces différents constituants.

A. Etude histopathologique

L'étude histo-pathologique des oreilles droites des rats traités par le xylène n'a révélée aucun cas d'inflammation. La Figure 55 montre les différents aspects des coupes réalisées sur les différents groupes. Cette observation a été réalisée sur des lames témoins et des lames supposées pathologiques, les prélèvements effectués au niveau des lobes des oreilles des rats montrent un tissu cutané revêtu par un épithélium fin. L'œdème renferme des glandes anexielles et des follicules pileux sans particularité microscopique (**Dr Djaaba, clinique Ibn Sina**).

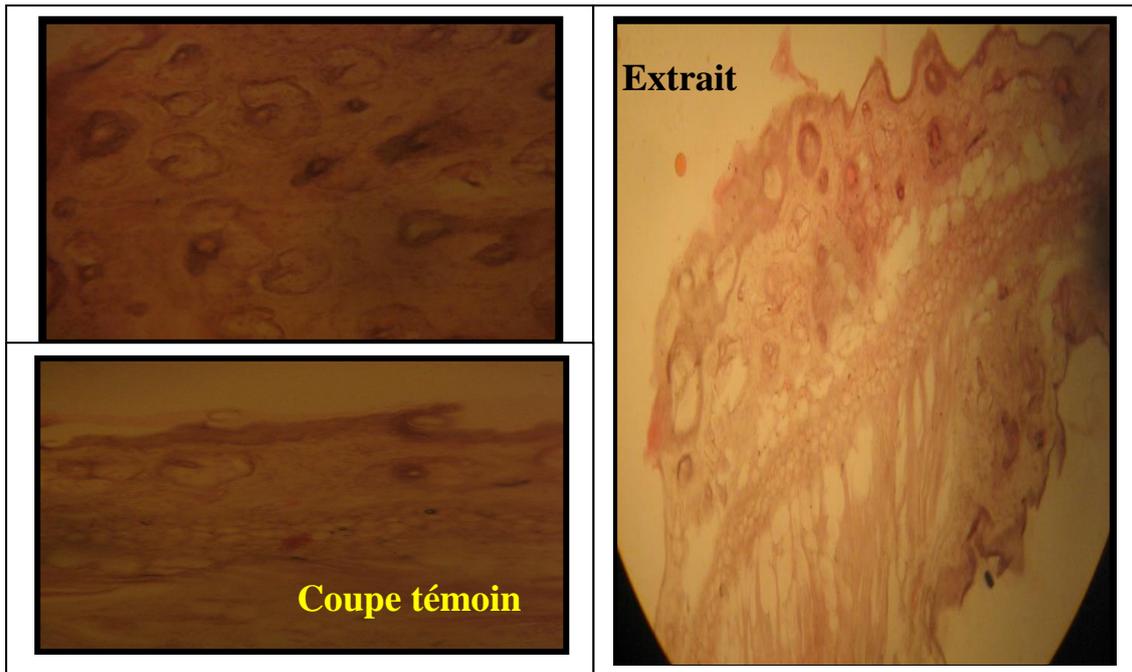


Photo (a) : Microphotographie des oreilles des rats traités par l'EMeOH de *M. vulgare*.

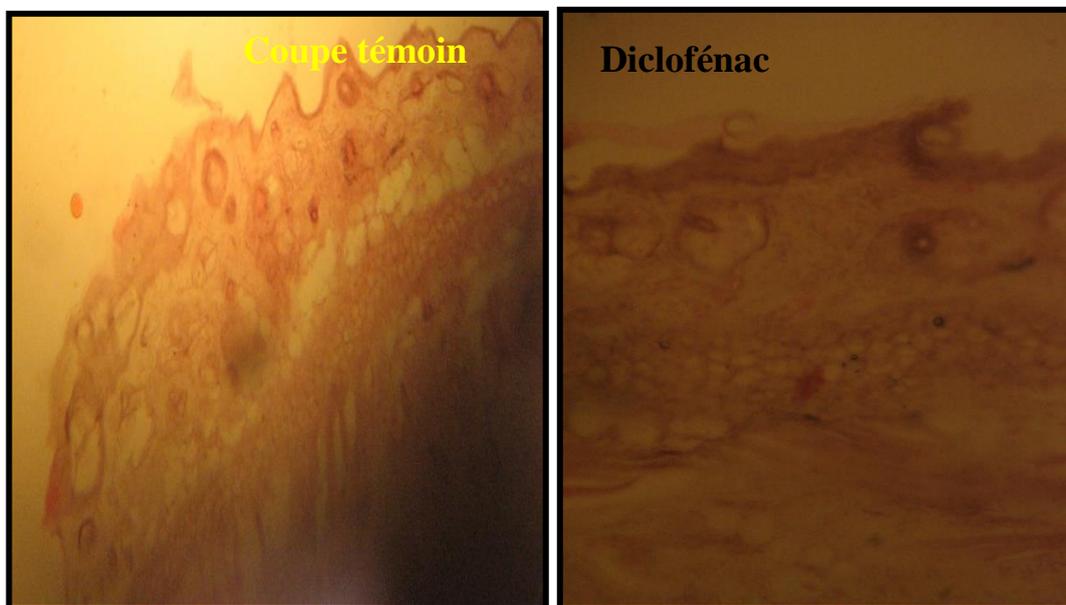


Photo (b) : Microphotographie des oreilles des rats traités par le diclofénac.

Figure 55. Observation microscopique ($\times 100 \mu\text{m}$) des coupes histologiques des oreilles droites des rats.

4. 2. 3. Evaluation de la pleurésie chez le rat (*test anti-pleurétique*)

L'évaluation de la pleurésie causée chez les rats par l'injection intra-pleurale d'une solution fraîchement préparée de la carraghénine (0,2 ml) à 1 % au niveau de la cavité thoracique est déterminée par l'estimation du volume de l'exsudat et le nombre de PMNs présents dans la cavité pleurale de chaque rat.

Les rats du groupe placebo (contrôle sain) ayant reçu une injection intra-pleurale de 0,2 ml du NaCl 0,9 % stérile, ces rats produisent un volume extrêmement faible d'exsudat au niveau de leur cavité pleurale de $0,052 \pm 0,001$ ml. Ce volume ne représente qu'approximativement 4 % du volume produit par les rats du groupe contrôle positif ($1,3 \pm 0,114$ ml) ayant reçu par voie orale 2 ml de l'eau physiologique une heure avant l'injection de la carraghénine. Il s'ensuit que les groupes traités par les EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* ainsi que l'AINS de référence produisent des volumes respectivement de l'ordre de ($0,74 \pm 0,014$ ml; $0,95 \pm 0,017$ ml; $0,67 \pm 0,01$ ml). L'étude statistique montre la présence d'une différence très significative ($P < 0,001$) entre le volume de l'exsudat produit par le groupe enflammé non traité (contrôle +) et ceux produit par les groupes enflammés traités (Figure 56).

En outre, l'infiltration des PMNs vers la cavité pleurale des rats du groupe placebo est également faible de l'ordre de $3,1 \times 10^3 \pm 0,08$ PMNs/ μ l et qui ne représente que 5 % d'environ des nombres de PMNs récupérés chez le groupe des rats enflammé non traité (contrôle positif) soit : $62,1 \times 10^3 \pm 1,15$ PMNs/ μ l.

Concernant le groupe enflammé traité par l'extrait méthanolique de *M. deserti* montre une inhibition de l'exsudation de 61 % environ par rapport aux rats du groupe contrôle positif, avec une diminution de 39 % dans le nombre de PMNs présents dans l'exsudat ($37,88 \times 10^3 \pm 1,17$ PMNs/ μ l). Par contre, l'extrait méthanolique de *M. vulgare* provoque une inhibition de l'exsudation de 56 % par rapport aux rats du groupe contrôle positif, avec une diminution de 44 % dans le nombre de PMNs présents dans l'exsudat, soit $34,77 \times 10^3 \pm 0,73$ PMNs/ μ l (Figure 57). L'analyse statistique montre que le traitement des rats enflammés par ces deux extraits provoque une diminution très significative dans le développement de la pleurésie ($P < 0,001$) par rapport au groupe contrôle positif, toutefois notons que l'effet de l'EMeOH de *M. vulgare* est légèrement important par rapport à celui de *M. deserti*, mais pas de différence significative obtenue entre les deux ($P > 0,05$).

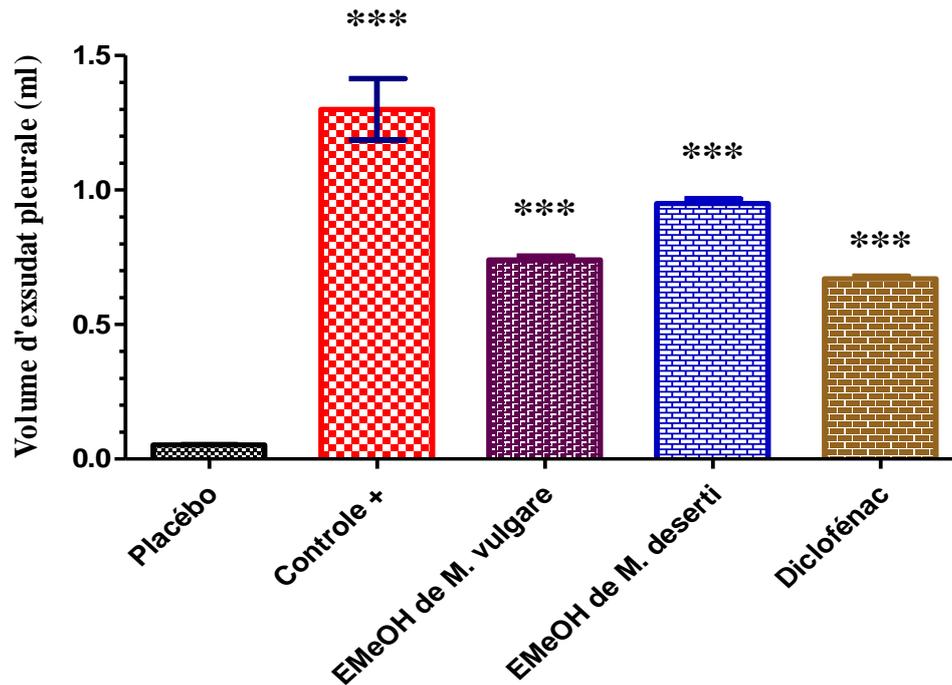


Figure 56. Volume de l'exsudat récupéré à partir de la cavité pleurale chez les groupes de rats enflammés traités et non traités (***) : $P < 0,001$).

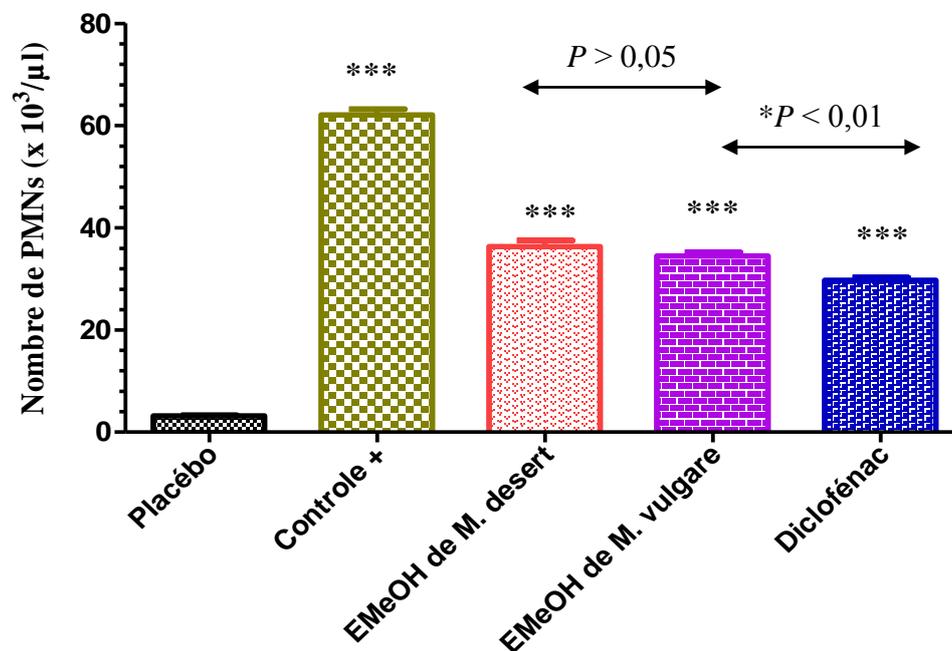


Figure 57. Histogrammes représentant le nombre de PMNs récupérés de l'exsudat chez les rats enflammés traités et non traités (***) : $P < 0,001$).

Les résultats sont exprimés en moyennes \pm SEM; (n=6).

Selon **Cuzzocrea et al. (1998)**, la carraghénine est un puissant agent phlogogène qui catalyse la libération de nombreux médiateurs dont l'histamine et la sérotonine par les mastocytes, favorisant ainsi une série de réactions qui se terminent par la libération d'autres médiateurs intervenant dans l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë. Selon les mêmes auteurs la carraghénine induit au cours de la phase précoce (1 à 2 h) de la réaction inflammatoire, la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la bradykinine, la sérotonine, les leucotriènes, le thromboxane A₂, le PAF et les prostanoïdes qui vont provoquer des changements vasculaires importants conduisant à l'exsudation plasmatique.

L'effet anti-pleurétique de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* de Noé est dû probablement à la présence de certains composés bioactifs. Selon **Anné et al. (1994)**, ces composés inhibent le recrutement des neutrophiles vers la cavité pleurale par l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion sur la paroi des cellules endothéliales des veines. En effet, il a été déclaré que les flavonoïdes empêchent la migration des leucocytes au site inflammatoire par l'inhibition des molécules d'adhésion *ICAM-1* et *VCAM-1*.

Tsuda et son équipe (2002) rapportent que l'administration du cyanidine 3-*O*- β -glucoside inhibe l'inflammation induite par le zymosan. En effet, le traitement par la cyanidine 3-*O*- β -glucoside réduit significativement l'augmentation des concentrations de NO, TNF- α , IL-1 β , et CINC-1 (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1*). En outre, les mêmes auteurs montrent que ce même composé normalise les niveaux de certaines protéines de la phase aiguë, parmi lesquelles on peut citer la transferrine, l'albumine et l' α 2-macroglobuline (**Calixto et al., 2004**).

Les flavonoïdes bloquent la migration des leucocytes en inhibant leur adhésion à la paroi vasculaire (**Middleton et al., 2000**). Cet effet est dû probablement à l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le TNF- α , les principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire (**Cho et al., 2000**). D'autre part, Il a été suggéré que la quercétine bloque l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliale des veines ombilicales par inhibition de l'expression des *ICAM-1* (**Anné et al., 1994**). L'acide gallique (qui été révélé par la CCM) bloque également la migration des leucocytes en inhibant les molécules d'adhésion *VCAM-1*, *ICAM-1* et *E-sélectine* dans les cellules endothéliales vasculaires (**Anné et al., 1994**).

Selon **Middleton *et al.* (2000)** les flavonoïdes agissent aussi comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens, en bloquant l'activation du facteur nucléaire *NF-kB*. En prenant en considération de ces données, l'extrait méthanolique de chacune des plantes *M. vulgare* et *M. deserti* exerce probablement son effet anti-pleurétique par la réduction de la production des médiateurs inflammatoires impliqués dans le déroulement des étapes de la réaction inflammatoire aiguë induite par la carraghénine, ainsi que par l'inhibition du recrutement des leucocytes vers la cavité pleurale en exerçant des effets anti-chimio-attractants sur ces derniers et cela en faveur toujours de la présence des molécules bioactives dans ces extraits.

4. 3. Étude de l'activité analgésique (*Writhing test*)

Ce test consiste à vérifier l'action inhibitrice de l'extrait MeOH brut des deux plantes sur la douleur provoquée chez les rats par l'injection intra-péritonéale d'une solution diluée d'acide acétique. Les contractions abdominales induites par l'injection de l'acide acétique sont utilisées pour évaluer l'effet analgésique des deux plantes. Le Tableau 36 représente les effets du paracétamol et des extraits MeOH sur le nombre de contorsions provoquées par l'injection de l'acide acétique (1%).

Tableau 36. Effet analgésique de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* sur les contractions abdominales induites chez les rats par l'injection de l'acide acétique.

Les groupes	La dose (mg/kg)	Le nombre de contorsions	Pourcentage d'inhibition
Témoin	/	23,4 ± 2,88	–
EMeOH de <i>M. vulgare</i> L	400	5,4 ± 1,14***	77 %
EMeOH de <i>M. deserti</i> de Noé	400	5,14 ± 0,23***	73,29 %
Paracétamol	100	5,54 ± 1,58 ***	79 %

Valeurs représentées en **moyenne ± SEM**, (n= 5).

***: $P < 0.001$ sont considérés significatif par rapport au témoin.

D'après ces résultats, il apparaît que les EMeOH des deux espèces *M. vulgare* et *M. deserti* montrent une activité antalgique très significative ($P < 0.001$) en diminuant le nombre de contorsions abdominales ($5,4 \pm 1,14$; $5,14 \pm 0,23$) respectivement à la dose de 400 mg/kg de PC. Ces résultats sont très proches à ceux obtenus avec le groupe traité par le paracétamol ($5,54 \pm 1,58$) à la dose de 100 mg /Kg de PC.

D'autre part, les résultats montrent que l'effet antalgique de l'espèce *M. vulgare* (77%) est important que l'effet de la 2^{ème} espèce *M. deserti* (73, 29%) dans les mêmes conditions, bien qu'il n'existe pas une différence significative entre les deux valeurs, l'effet de l'EMeOH de *M. vulgare* est très proches à celui obtenu avec le groupe traité par le paracétamol qui présente un pourcentage d'inhibition de (79 %).

Les contractions induites par l'injection intra-péritonéale de l'acide acétique est une méthode sophistiquée utilisée pour étudier l'effet analgésique périphérique d'une substance. La douleur provoquée par l'injection de l'acide acétique est due à la suite d'une libération massive de la sérotonine, de l'histamine, de la bradykinine et surtout de la substance P et des prostaglandines ($PGE_2\alpha$, $PGF_2\alpha$). Ces médiateurs chimiques stimulent les neurones nociceptifs périphériques et induisent l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Sanogo *et al.*, 2012).

L'activité analgésique de l'extrait méthanolique des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* peut être due à la présence des alcaloïdes, diterpènes furaniques labdaniques tels que : le marrubénol, le marrulubacétal A, la désertine et le principe actif connu « la marrubiine » et ses dérivés (Meyre-Silva *et al.*, 2005).

En effet, De Jesus *et al.* (1999) ont analysé l'effet anti-nociceptif de la marrubiine dans différents modèles de nociception chez la souris. Ils ont montré que la marrubiine présente un effet anti-nociceptif lié à la dose et inhibe les réponses de contorsion induites par l'acide acétique chez la souris. La valeur ID_{50} était de 2,2 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ dans le test de contorsion. Selon les mêmes chercheurs, la marrubiine était plus puissant que certains médicaments analgésiques connus, comme il avait une ID_{50} inférieur par rapport à l'aspirine et le diclofénac. Selon De Jesus *et al.* (1999), la marrubiine est considérée comme un antalgique efficace non morphénique. Ceci a été confirmé selon les mêmes auteurs par l'absence d'effets anti-nociceptifs dans le test de plaque chauffante (180 $\mu\text{mol}/\text{kg}$), une technique qui a une sélectivité pour les analgésiques dérivés des opioïdes. Dans le test de formaline, la marrubiine a inhibé de manière significative la dose de la première phase, a atteint un pic après 5 minutes et après 15-30 minutes (deuxième phases, représentant la douleur inflammatoire).

D'autre part, **Meyre-Silva et al. (2005)** ont montré que l'acide marrubinique possède un effet analgésique analogue à celui de la marrubiine dans les modèles expérimentaux (contre la douleur neurogénique induite par le formol et la capsaïcine ainsi que par l'hyperalgésie induite par le glutamate chez la souris). Bien que l'acide marrubinique ait des effets anti-nociceptifs moins importants que son prototype « la marrubiine », il était plus puissant que certains médicaments cliniquement utilisés tels que l'acide acétylsalicylique ou le paracétamol.

Il convient de signaler que nos résultats concordent avec ceux déjà rapportés par d'autres auteurs. Ainsi **Kanyonga et ses collaborateurs (2011)** ont révélé dans une étude établie sur la plante *M. vulgare* un pourcentage d'inhibition égale à 35,3% contre la douleur induite par l'acide acétique. L'action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines des feuilles de *Marrubium parviflorum* (200 mg/kg) a été également constaté par un groupe de chercheurs en Iran (**Khanavi et al., 2012**).

4. 4. Étude de l'activité antidiabétique

4. 4. 1. Effet des extraits sur la tolérance au glucose

Les résultats de l'évaluation de la tolérance au glucose chez les animaux hyper-glycémiques traités par les extraits méthanolique de *M. vulgare* et *M. deserti* ainsi que l'antidiabétique standard sont illustrés dans la Figure 58.

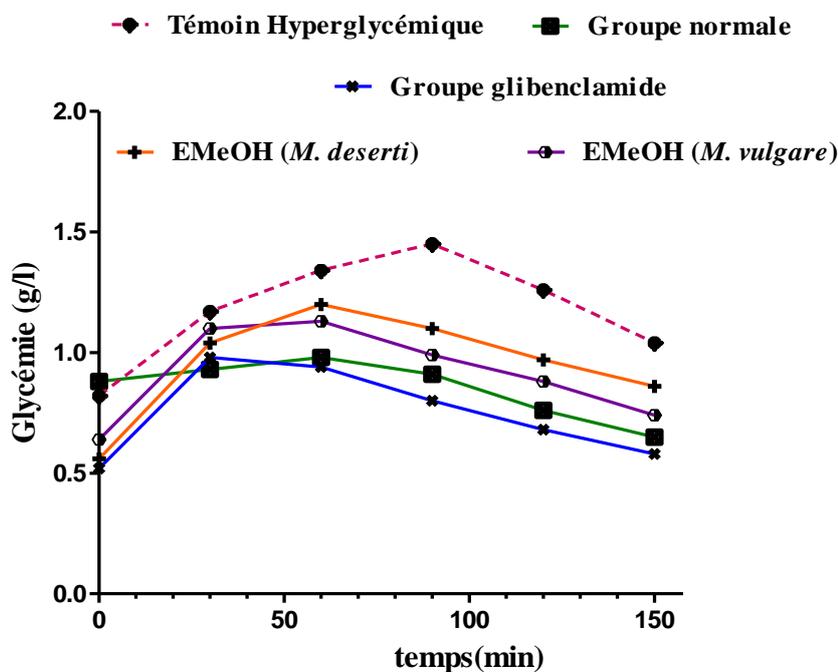


Figure 58. Evolution de la tolérance au glucose chez les rats hyper-glycémiques traités par les extraits méthanoliques des plantes étudiées.

D'après la Figure 58, nous constatons que les extraits et le glibenclamide ont un effet anti-hyper-glycémique important chez les rats ayant reçu le glucose, ainsi, les résultats montrent que le taux de glucose dans le sang a été diminué significativement chez les groupes prétraités par rapport aux rats non traités. En effet, on remarque après une période de 90 minutes une élévation significative de la glycémie chez les rats de groupe hyper-glycémique qui atteint un seuil de 145 mg/dl par rapport aux groupes des rats traités par les extraits méthanolique de *M. vulgare* et *M. deserti* de Noé, les valeurs enregistrées sont de l'ordre de 99 mg/dl, 110 mg/dl respectivement. Un effet équivalent est observé avec le glibenclamide (80 mg/dl).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Roman Ramos *et al.* (1992)** qui ont testé l'effet hypoglycémique de l'extrait aqueux de *M. vulgare* chez des lapins sains avec l'administration gastrique d'eau (4 ml / kg), du tolbutamide (20 mg / kg) ou de l'extrait (4 ml/kg). L'hyperglycémie a été induite par injection sous cutanée d'une solution de dextrose à 50%. Après 60 minutes, la glycémie a été déterminée toutes les 60 minutes pendant une durée de 5 h. Ces auteurs ont constaté que le tolbutamide et l'extrait diminuent de manière significative l'hyperglycémie par rapport le groupe contrôle (eau).

4. 4. 2. Effet des extraits sur la glycémie

L'effet des extraits méthanoliques de *M. vulgare* et *M. deserti* sur la glycémie des rats diabétiques est présenté dans le Tableau 37.

Tableau 37. Effet de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* sur la glycémie.

Groupes	Glycémie (moyenne ± écart type) (mg/dl)					
	Période de traitement (Jours)					
	1	3	5	7	9	11
Témoin	82,2 ± 0,23	84,2 ±0,75	81,6 ±0,45	61,2 ±1,25	82,5 ±0,36	82,5 ±0,78
DNT	525,5 ± 0,70 (a)	400,75 ± 0,50 (a)	304,5 ± 1,00 (a)	273,25 ± 0,7(a)	183 ± 0,5 (a)	140 ± 1,7 (a)
EMeOH (<i>M. vulgare</i>)	537 ± 1,14	322,3 ± 0,8 (b)	206 ± 0,6 (b)	191,6 ± 1,30 (b)	96 ± 0,38 (b)	71,5 ± 0,75 (b)

EMeOH <i>(M. deserti)</i>	521 ± 1,10	399,5 ± 0,7	283 ± 2,30 (b)	202 ± 1,10 (b)	175 ± 0,75	143 ±0,5
Glibenclamide (5 mg/kg)	442 ± 0,70 (b)	373,4 ± 1,50 (b)	208,2 ± 0,70 (b)	144,8 ± 1,92 (b)	91,8 ± 1,03 (b)	90,4 ± 0,47 (b)

Les résultats sont exprimés en **moyenne ± SEM** ; (n = 5).

Les lettres (a-b) indiquent une différence très significative par rapport le groupe diabétique non traité (DNT) où : $P < 0,001$.

Les résultats obtenus montrent que la STZ provoquait après son injection (72 h) une augmentation très significative ($P < 0,001$) de la glycémie chez les groupes de rats diabétiques traités et non traités par rapport au groupe de rats sains témoins, les valeurs obtenues sont variées entre (442-537 mg/dl) contre (82,2 mg/dl).

En effet, la streptozotocine est un dérivé nitrosurique qui représente l'une des plusieurs substances utilisées pour induire un diabète insulino-dépendant (diabète de type 1). La STZ provoque une nécrose des cellules β -pancréatiques et une carence sévère en insuline avec une hyperglycémie diabétique établie dans les deux jours suivants (Elberry *et al.*, 2015).

Toutefois, les résultats obtenus sont un petit peu compliqués et difficile à être interprétés car chez le groupe diabétique témoin non traité (DNT), nous avons constaté que la concentration sérique du glucose a diminuée et elle est arrivée à un taux équivalent à (140 ± 1,7 mg/dl) après la 2^{ème} semaine, malgré que les rats de ce groupe ne reçoivent aucun traitement, mais ils sont gavés par de l'eau physiologique seulement. Cependant, on peut interpréter ces observations probablement par la période de jeûne (jour par jour) qui a influé sur la glycémie en diminuant la concentration de glucose dans le sang de temps en temps, ou bien cela peut être expliqué par l'influence des hormones sexuelles du « cycle menstruel » notamment les œstrogènes qui peuvent influencer sur la glycémie, toutefois notons que le test réalisé pour évaluer l'activité antidiabétique dans ce travail de recherche a été fait sur des rats femelles.

D'autre part, nous avons observé une baisse du taux du glucose dans le sang à partir du 3^{ème} jour après le traitement des rats diabétiques par l'EMeOH de *M. vulgare* avec une valeur de 322,3 ± 0,8 mg/dl, tandis que le groupe des rats

diabétiques traités avec l'EMeOH de *M. deserti*, cette observation a été faite qu'au 5^{ème} jour de traitement à une concentration de $(283 \pm 2,30 \text{ mg/dl})$. Dans les mêmes conditions, le groupe traité avec le médicament de référence, le glibenclamide montre une diminution très significative dans le niveau du glucose sanguin à partir de 1^{ère} jour de traitement. Le traitement par l'extrait méthanolique de *M. vulgare* à la dose de 600 mg/kg PC a montré une baisse plus efficace ($P < 0,001$) de la glycémie ($71,5 \pm 0,75 \text{ mg/dl}$) comparable au traitement par l'extrait méthanolique de *M. deserti* ($143 \pm 0,5 \text{ mg/dl}$) dans la même période qui ne représente aucune différence avec le groupe DNT ($P > 0,05$). D'après la littérature l'activité antidiabétique est attribuée à la richesse des plantes en flavonoïdes et en verbascosides connus pour leurs activités antidiabétiques et dont le mécanisme pourrait être dû à une stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots de Langerhans et/ou l'inhibition du processus de dégradation de l'insuline (Boudjelal *et al.*, 2012; Elberry *et al.*, 2015 ; Ghissi *et al.*, 2015). Selon Vergara-Galicia *et al.* (2012), l'extrait éthanolique des racines de *M. vulgare* (100 mg/kg) a un effet hypoglycémique significatif qui peut être dû à la suppression de l'absorption des carbohydrates au niveau des intestins. Selon les mêmes chercheurs cet effet est lié à la présence de molécules bioactives dans l'extrait qui inhibent l'enzyme α -glucosidase.

4. 4. 3. Effet des extraits sur le poids corporel

Les résultats présentés dans le Tableau 38 indiquent des changements dans le poids corporel entre le groupe des rats rendus diabétiques par STZ et le groupe des rats diabétiques traités et normaux.

D'après le Tableau on remarque qu'au départ et avant l'induction du diabète (t_0), les rats dans tous les groupes (les lots constitués) possèdent presque le même poids, étant donné que la constitution de ces groupes se fait selon la loi d'homogénéité.

Après l'induction de diabète par l'injection de la STZ, le groupe DNT a montré une chute progressive du poids corporel durant toute la période expérimentale et les rats de ce groupe subissent une perte sévère du poids corporel par rapport au groupe témoin sain contrôle. Cette diminution est de l'ordre de 8%, de 14% et de 16% par rapport au poids corporel initial. L'étude statistique montre qu'il y a une différence très significative ($P < 0,001$) entre le poids corporel des rats de groupe diabétique non traité et le groupe sain contrôle qui représente durant les mêmes périodes de traitement une augmentation régulière de poids par rapport le poids de départ.

Tableau 38. Effet de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* sur le poids corporel.

Groupes	poids corporel (moyenne \pm écart type) (g)						
	Période de traitement (Jours)						
	t0	1	3	5	7	9	11
Témoin	150 \pm 0,3	154 \pm 0,35	158,8 \pm 0,2	160 \pm 0,65	155 \pm 0,90	158,67 \pm 2,00	157 \pm 3,00
DNT	150 \pm 0,6	138,6 \pm 1,40 (a)	130,1 \pm 0,75 (a)	128 \pm 0,35 (a)	128 \pm 0,60 (a)	124,5 \pm 0,45 (a)	129,5 \pm 0,50 (a)
EMeOH (<i>M. vulgare</i>)	152,16 \pm 0,7	146 \pm 1,50 (b)	147,25 \pm 1,00 (b)	151 \pm 0,42 (b)	149 \pm 0,75 (b)	153,5 \pm 0,10 (b)	150 \pm 0,49 (b)
EMeOH (<i>M. deserti</i>)	151 \pm 0,85	145 \pm 0,60 (b)	144 \pm 0,40 (b)	147,4 \pm 0,1 (b)	143 \pm 2,10 (b)	144,7 \pm 0,30 (b)	145 \pm 0,6 (b)
Glibenclamide (5 mg/kg)	150,5 \pm 0,50	145,8 \pm 0,20 (b)	148 \pm 2,00 (b)	149,5 \pm 0,50 (b)	150,20 \pm 0,63 (b)	154,5 \pm 0,81 (b)	155,5 \pm 0,26 (b)

Les résultats sont exprimés en **moyenne \pm SEM** ; (n = 5).

Les lettres (a-b) indiquent une différence très significative par rapport le groupe diabétique non traité (DNT) où : $P < 0,001$.

De même, les groupes diabétiques traités par l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* de Noé ont révélé un signe de rétablissement au niveau du poids corporel par rapport au groupe diabétique non traité ($P < 0,001$), toutefois cet effet est comparable à celui obtenu avec les rats de groupe traité par le médicament.

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Boudjelal *et al.* (2012)** qui ont montré que l'injection de la STZ provoquait chez les rats une diminution significative de gain de poids corporel. De même, **Elberry *et al.* (2015)** et **Ghissi *et al.* (2015)** ont eux aussi enregistré des résultats similaires et suggèrent que la perte du poids corporel chez le groupe diabétique non traité peut être expliquée par la dégradation des lipides (lipolyse), des protéines structuraux (protéolyse) et du glycogène (glycogénolyse). La capacité de l'extrait de protéger les rats diabétiques contre la perte du poids corporel est due probablement à sa capacité de réduire le taux des lipides et à son effet hypoglycémique et donc à sa capacité de renverser la néoglucogénèse et de contrôler cette perte protéique (**Elberry *et al.*, 2015**).

4. 4. 4. Effet des extraits sur les différents paramètres biochimiques

Les résultats obtenus des différents paramètres biochimiques sont reportés dans le Tableau 39. Les résultats montrent une diminution significative de la concentration sérique du glucose chez les rats traités par l'EMeOH de *M. vulgare* par rapport aux rats DNT (92 mg/dl contre 145 mg/dl). Par contre le groupe des rats traités avec l'EMeOH de *M. deserti* ne présente aucune différence avec le groupe DNT.

Tableau 39. Effet de l'EMeOH de *M. vulgare* et *M. deserti* sur les paramètres biochimiques.

Paramètres biochimiques	Groupe Témoin	STZ		Groupes des extraits	
		DNT	Gliben-clamides	EMeOH (<i>M. vulgare</i>)	EMeOH (<i>M. deserti</i>)
Glycémie à jeun (mg/dl)	85	145	93	92	130
Urée sanguine (g/l)	0,5	1,2	0,8	0,40	1,3
Cholestérol (g/l)	0,66	0,57	0,85	0,90	0,88
Triglycérides (g/l)	1,08	0,41	0,77	1,47	0,66
TGO (UI/l)	39,3	108	84,73	74,44	101
TGP (UI/l)	41	80	52	24,06	49
Créatinine (mg/l)	7,3	14,25	4,92	7	6,5
Cholestérol HDL (g/l)	0,43	0,56	0,68	0,57	0,52
Cholestérol LDL (g/l)	-0,12	-0,07	-0,17	-0,05	-0,05
Protéines sériques (g/l)	81,9	70,5	81,5	80,2	74,2

Nous remarquons chez le groupe diabétique non traité une augmentation de la concentration en urée et en créatinine mais dans le sens inverse le taux sérique des protéines totales est diminué. Selon **Boudjelal et al. (2012)**, ce mécanisme peut être interprété par le fait que les protéines peuvent être dégradées en acides aminés puis en urée et en créatinine considérés comme marqueurs du dysfonctionnement rénal. D'autre part, l'activité enzymatique des transaminases (TGO et TGP) a été augmentée dans le sérum du groupe diabétique non traités par rapport à celle du contrôle. Selon **Boudjelal et al. (2012)**, ceci peut s'expliquer par l'accumulation des acides aminés comme l'alanine et le glutamate dans le sérum provenant de la dégradation des composés protéiques du corps. De ce fait, ces acides aminés peuvent se transformer sous l'action des transaminases sériques en composés carboxyliques tels que l' α cétoglutarate et le pyruvate.

Dans la présente étude, nous avons constaté que l'extrait MeOH de *M. vulgare* a pu jouer un rôle crucial dans la baisse de la concentration sérique du glucose, soit par la stimulation de la sécrétion de l'insuline, soit par une action extra-pancréatique et donc par l'influence de l'absorption de glucose et son utilisation par les différents tissus. Ces résultats viennent donc confirmer les premières conclusions d'**Elberry et al. (2015)** qui ont constaté que l'administration de l'EMeOH de *M. vulgare* à une dose de 500 mg/kg provoque une diminution significative de la glycémie après deux semaines de traitement. Les mêmes chercheurs ont montré que l'EMeOH de cette plante augmente significativement le taux de l'insuline dans le plasma ainsi la capacité de stockage du glycogène dans le foie et les muscles chez les rats.

L'augmentation de la concentration sérique de l'insuline dans le plasma chez les rats est due probablement à la présence des molécules bioactives dans l'extrait de plante provoquant la fermeture des canaux K^+ /ATP, ce qui entraîne une dépolarisation membranaire qui va stimuler l'afflux des ions Ca^{2+} dans les cellules β -pancréatiques, première étape clé pour la libération d'insuline (**Elberry et al., 2015**).

Arellano et al. (2004) ont étudié l'effet clinique de l'extrait aqueux de *M. vulgare* sur la glycémie et le taux des lipides sériques chez des patients atteints de diabète de type 2 et ayant une mauvaise réponse aux médicaments conventionnels de traitement. Tous les patients inclus ont montré une glycémie ≥ 140 mg/dl, indépendamment du taux de cholestérol et de triglycérides. Ces patients ont été traités par l'EAQ de *M. vulgare* avec le glibenclamide comme un co-médicament à des doses différentes. Après 21 jours de traitement, le taux de glucose plasmatique à jeûne a été réduit

modérément de 0,64%, de même, les taux de cholestérol et de triglycérides diminuent de 4,16% et de 5,78% respectivement.

Novaes *et al.* (2001) ont étudié l'effet hypoglycémique de *M. vulgare* chez les rats diabétiques dont le diabète est induit par l'alloxane. L'extrait éthanolique de *M. vulgare* (300 mg/kg) a été administré *per os* à des rats diabétiques. Ces auteurs ont montré que l'extrait a eu des effets modérés vis-à-vis les paramètres étudiés.

Conclusion et Perspectives

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Les essais phytochimiques ont révélé la présence de nombreux métabolites : les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les alcaloïdes, les terpénoïdes et les stérols.

La chromatographie sur couche mince (CCM) nous a permis de révéler probablement la présence de l'acide gallique, la quercétine, l'acide trans-cinammique, la rutine dans l'EMeOH des deux plantes.

Le criblage préliminaire des extraits en CCM a permis également de cibler l'activité scavenger du radical DPPH dans l'extrait méthanolique (EMeOH) le plus riche en composés phénoliques et en flavonoïdes.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé que les deux plantes sont riches en polyphénols, de même les deux tests d' AlCl_3 et la méthode de la vanilline ont confirmé leur richesse en flavonoïdes, en flavonols et en tannins. L'abondance en principes actifs confère aux deux plantes des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier leurs multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elles sont utilisées en tradithérapie.

L'évaluation des activités biologiques *in vitro* et *in vivo* sur un model animal en utilisant des rats de type Wistar a montré que les extraits méthanoliques des deux plantes *M. vulgare* et *M. deserti* ont une activité antioxydante, antimicrobienne, hémostatique, analgésique, anti-inflammatoire et antidiabétique.

Suite à ces premiers résultats, il conviendrait de faire des études plus poussées en utilisant des techniques de pointes telles que : l'infra-rouge (IR) et la technique de la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour l'identification des structures de nos composés. En effet, la détermination de la structure peut aboutir à d'autres études, il s'agissait de la modification de la structure par diverse méthodes : acylation, hydroxylation, méthylation,... cela pourra permet d'améliorer les activités biologiques des composés présents dans la plante (activité antioxydante, activité antibactérienne).

Conclusion et Perspectives

En perspectives, l'étude relation structure-activité permettra de corrélérer les résultats des tests biologiques avec des structures bien précises responsables de l'activité. Cette étude est très importante si l'on veut améliorer l'effet biologique de ces composés surtout au niveau moléculaire. Ceci permettra dans le futur la synthèse de molécules potentiellement actives pourquoi non des médicaments?. L'étude *in vivo* viendra confirmer ou infirmer ces premiers résultats.

Finalement, d'autres études biologiques (activité anticancéreuse, activité anti-hépatotoxique et l'activité antiparasitaire : « anti-leishmaniose ») plus approfondies *in vivo* sur différents animaux (souris, rats, lapins...) sont nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre les mécanismes d'action des différentes molécules bioactives, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- **Abadi, A., et Hasani, A. (2013).** Chemical composition of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, **8(3)**, pp 210-214.
- **Abdel-Hameed, E. S. (2009).** Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem*, **114**, pp1271-1277.
- **Ahmed, B., Masoodi, M. H., Siddique, A. H., et Khan, S. (2008).** A new monoterpene acid from *Marrubium vulgare* with potential antihepatotoxic activity. *Natural Product Research*, **24**, pp 1671–1680.
- **Akther, N., Shawl, A. S., Sultana, S., Chandan, B. K., et Akhter, M. (2013).** Hepatoprotective activity of *Marrubium vulgare* against paracetamol induced toxicity. *Journal of pharmacy research*, **7**, pp 565-570.
- **Al-Bakri, A. G., et Afifi, F. U. (2007).** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, **68**, pp 19-25.
- **Alilou, H., Rouhi, R., Idrissi Hassani, L. M., et Akssira, M. (2007).** Activité antifongique de *Bubonium odorum* (Asteracées) sur des champignons pathogènes d'agrumes. *Reviews in Biology and Biotechnology*, **6 (1)**, pp 20-24.
- **Aliyu, A. B., Musa, A. M., Abdullahi, M. S., Ibrahim, H., et Oyewale, A. O. (2011).** Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua*, *Vernonia blumeoides* and *Vernonia ocephala* (ASTERACEAE). *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, **68**, pp 67-73.
- **Alkhatib, R., Joha, S., Cheok, M., Roumy, V., Idziorek, T., Preudhomme, C., et al. (2010).** Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, **76**, pp 86–87.
- **Allain, C. C., Poom, L. S., Chan, C. S., Richmonal, W. S., et Fu, P. C. (1974).** Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, pp 470-475.
- **Allain, P. (1996).** Les médicaments. *Editions ESTEM*. Paris, p 414.

- **Amadou, A. (2006).** Etude d'une recette traditionnelle, des écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* et d'*Uapaca togoensis* utilisées dans le traitement de diabète. Thèse de doctorat. Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie, p 55.
- **Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aaarab, L., El Ajjouri, M., et Chaouch, A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss and Reut et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth du Maroc. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **14**, pp 141-148.
- **Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I. M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., et Segura-Carretero, A. (2014).** Phytochemical profiling, *in vitro* evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, **61**, pp 120–129.
- **Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., Fougrach, H. (2013).** Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire d'*Erica arborea* L. du Maroc. *Pathologie Biologie* (Paris) (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2013.03.005>
- **Anandharajan, R., Jaiganesh, S., Shankernarayanan, N. P., Viswakarma, R. A., Balakrishnan, A. (2006).** *In vitro* glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glu T₄, PI3 Kinase and PPAR γ in L6 myotubes. *Phytomedicine*, **13** pp 434-441.
- **Anné, S., Agarwal, M., Nair, M. P., Schwartz, S. A., Ballow, M., Kandaswami, C., et Middleton, E. J. (1994).** Inhibition of endotoxin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adhesion to endothelial cells by plants flavonoïds quercetin. *J Allergy Clin Immunol*, **93**, p 276.
- **Aouadhi, G., Ghazghazi, H., Hasnaoui, B., et Maaroufi, A. (2013).** Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim*, **25**, pp 9-14.
- **Aouissa, I. W. R. (2002).** Etude des activités biologiques et la toxicité aigue de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera Indica* L. (Anacardiaceae). Thèse de doctorat. *Université de Bamako*. p 128.

- **Arellano, A. H., Santamaría, L. A., Hernández, B. G., Torres, N. P., et Tortoriello, J. (2004).** Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*, **11**, pp 561–566.
- **Atefeibu, E. S. I. (2002).** Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii*. Thèse de Doctorat. Université cheikh Anta Diop de Dakar, p 33.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Louis, H., Boudaoud, H., Debbach, N., et Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *Food Chemistry*, **112**, pp 303-309.
- **Aubry, P., et Gaüzère, B. A. (2015).** Les Salmonelloses. *Medecine tropicale*, pp 1-6.

B

- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, T., Gazin, T. C., Pinkas, M., Luycky, M., et Gazin, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arznein Forsch/Drug Res*, pp 1-6.
- **Baker, F. J., Silverton, R. E., Kilshaw, D., Shannon, R., Guthrie, D. L., Egglestone, S., et Mackenzia, J. C. (1985).** Introduction to haematology. In *Introduction to Medical Laboratory Technology* (6th edn). Butterworths: London and Boston, pp 147-334.
- **Balentine, C. W., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., Duong, D. Q., et Pohlman, F. W. (2006).** The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, **73**, pp 413-421.
- **Balmé, F. (1982).** *Plantas medicinais*. Ed. Hemus Ltda, São Paulo.
- **Bangou, M. J. (2012).** Etude phytochimique et activités biologiques des tiges feuillées de *Lantana camara* L. et de *Lippia chevalieri* Moldenke: deux verbenaceae du Burkina Faso. Thèse de doctorat. Biochimie et Chimie des Substances Naturelles, *Université de Ouagadougou*, pp 25-42.

- **Bangou, M. J., Almaraz-Abarca, N., Méda, N. T. R., Zeba, B., Kiendrebéogo, M., Millogo-Rasolodimby, J., et Nacoulma, O. J. (2012).** Polyphenolic composition of *Lantana camara* and *Lippia chevalieri*, and their antioxidant and antimicrobial activities. *International Journal of Phytomedicine*, **4** (1), pp 115-124.
- **Barham, D., et Trinder P. (1972).** An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, **97**, pp 142–145.
- **Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A. C., Santos, P. A. G., Costa, M. M., Barroso, J. G., et Pedro, L. G. (2006).** Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *JEOR*, **18**, pp 369–373.
- **Bellakhdar, J. (1997).** La pharmacopée marocaine traditionnelle: médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press*, p 764.
- **Bello, S. O., Muhammad, B.Y., Gammaniel, K.S., Abdu-Aguye, I., Ahmed, H., Njoku, C. H., Pindiga, U. H., et Salka, A. M. (2005).** Preliminary evaluation of the toxicity and some pharmacological properties of the aqueous crude extract of *Solanum melogena*. *Res. J. Agr. Biol. Sci.*, **1**(1), pp 1- 9.
- **Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Meurlay, D., et Louaileche, H. (2012).** Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: A comparative study. *Journal of Functional Foods*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.005>.
- **Berrougui, H., Maxim, I., Cherki, M., et Khalil, A. (2006).** *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage, **80**, pp 105-112.
- **Beutler, E. (1984).** A manual of biochemical methods. In *Red Cell Metabolism*, 3rd ed, p 136.
- **Bisio, A., Pagano, B., Romussi, A., Bruno, O., De Tommasi, N., Romussi, G., et Mattia C. A. (2007).** Relative stereochemistry of a diterpene from *Salvia cinnabarina*. *Molecules*, **12**(10), pp 2279-2287.
- **Bokaeian, M., Saboori, E., Saeidi, S., Niazi, A. A., Amini-Borojeni, N., Khaje, H., et Bazi, S. (2014).** Phytochemical analysis, antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, **16**(10), pp 60-64.

- **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003).** Radicaux libres et anti-oxydants: *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Médecine-sciences*, pp 59-81.
- **Bonnet, E. D. (2012).** Note sur le *Marrubium vulgare L*, nomenclature, taxonomie, synonymie. *Tela Botanica*, pp 282-287.
- **Borgel, D., et Diehl, J. L. (2005).** Mécanismes de l'activation de la coagulation dans le sepsis : rôle du système de la protéine C. *Hématologie*, **11(2)**, pp 139-47.
- **Borghini, T., Vernez, L., Kessler, D., Mauris, A., Morandi, P. A., Deom, A. (2013).** Protéine C réactive (CRP) et Vitesse de sédimentation (VS). *Centre Suisse de contrôle de qualité (CSCQ)*, pp 1-2.
- **Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., et Ruberto, G. (2012).** Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare L.* infusion, *Fitoterapia*, **83**, pp 286-292.
- **Boullard, B. (2001).** Plantes médicinales du monde. *Editions Estem*, pp 340-341.
- **Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., et Ksouri, R. (2016).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, **28(12)**, pp 1649-1655.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Latreche, A., Hazem, Z ., et Bouredja, N. (2013).** Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare L.* du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. *Journal les technologies de laboratoire*, **8(31)**, pp 34-41.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Benmansour, D., Khaled, M. B., Bouterfas, M., et Latreche, A. (2014).** Optimization of extraction conditions of some phenolic compounds from white horehound (*Marrubium vulgare L.*) leaves. *International Journal of Organic Chemistry*, **4**, pp 292-308.
- **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., et Benchiha, W. (2016 in press).** Antioxidant activity and total phenolic and flavonoïds content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare Linné*) from three geographical origins. *Ann Pharm Fr*, [http://dx. doi. Org /10.1016 / j.pharma.2016.07.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.pharma.2016.07.002)

- **Boyer, F. (2016).** Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glyquée sur les cellules cardiaques et adipeuses. Médecine humaine et pathologie. Université de la Reunion, <https://tel.archives-ouvertes.fr>, pp 18-20.
- **Bravo, L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56**(11), pp 317-333.
- **Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation, *Lavoisier, 2e ed.* Paris, p 915.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie. Plantes médicinales, 3e édition. *Editions Tec & Doc; Editions médicales internationales*, Paris, P 1120.
- **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, *Tec & Doc - Éditions médicales internationales*. Paris, p 1288.
- **Buccolo, G., David, H. (1973).** Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, **19**, pp 476- 482.
- **Burda, S., et Oleszek, W. (2001).** Antioxidant and antiradical activities of flavonoïds. *J. Agric .Food .Chem.*, **49**, pp 2774–2779.
- **Burits, M., et Bucar, F. (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res*; **14**, pp 323–328.

C

- **Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F. et Santos, A. R. (2004).** Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II, modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*, **70**(2), pp 93-103.
- **Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. V., Castillejos, L., et Ferret, A. (2007).** Essential oils as modifiers of Rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, **90**, pp 2580- 2595.
- **Casagrande, F., Backueville, D., Pillaire, M. J., Malecaze, F., Manenti, S., Breton-Douillon, M., et Darbon, J. M. (1998).** G1 phase arrest by the Phosphatidylinositol 3-Kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27 (Kip1) and inhibition of G1 CDKs in choroidal melanoma cells. *FEBS Lett*, **422**, pp 385-290.

- **Chang, C. I, Chang, J. Y, Kuo, C. C, Pan, W. Y, et Kuo, Y. H. (2005).** Four new 6-nor5 (6→7) abeo-abietane type diterpenes and antitumoral cytotoxic diterpene constituents from the bark of *Taiwania cryptomerioides*. *Planta Medica*, **71(1)**, 72-76.
- **Chebrouk, F., et Hadj-Mahammed, M. (2009).** Composition des huiles essentielles de *Marrubium deserti* de Noé de la région de Ghardaia. *Ann Faculté Sci Sciences de l'Ingénieur*, **1**, pp 75–81.
- **Cheesbrough, M. (1991).** Detection of bence jones protein in urine. In *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries*, (2nd edn). ELBS with tropical health technology / Butterworth- Heinemann Ltd: Oxford, pp 473-474.
- **Chen, J. J., Wu, H. M., Peng, C. F., Chen, I. S., et Chu, S. D. (2009).** Seco-Abietane diterpenoids, a phenylethanoid derivative, and antitubercular constituents from *Callicarpa pilosissima*. *Journal of Natural Products*, **72(2)**, pp 223-228.
- **Cho, K., Yun, C. H., Yoon, D.Y., Cho, Y.S., Rimbach, G., Packer, L., et Chung, A. S. (2000).** Effect of bio-flavonoïds extracts from the bark of *Pinus maritime* on pro-inflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol Appl Pharmacol*, **168**, pp 64-71.
- **Choi, Y. M., Noh, D. O., et Cho, S. Y. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of Propolis from several regions of Korea. *LWT*, **39**, pp 756–761.
- **Ciulel, I. (1982).** Methodology for analysis of vegetable drugs. *Ed I.P.A.C.Romania*. p 67.
- **Cohen, Y. (1986).** Abrégé de Pharmacologie. *Masson*, Paris, p 440.
- **Cushnie, T. P. T., et Lamb, A. J. (2011).** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoïds. *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp 1-9.
- **Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A. et Szabo, C. (1998).** Anti-inflammatory effects of mercapto-ethyl-guanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, **24(3)**, pp 450-459.
- **Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Calabro, G., Dugo, L., De Sabro, A., Van De Loo F., et Caputi, A. P. (2000).** Inducible nitric oxide synthase-knockout mice

exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am Respir Crit Care Med*, **162**, pp 1859-1866.

D

- **Dacosta, Y. (2003)**. Les phytonutriments bioactifs. (Ed) Paris. p 317.
- **Davidson, P. M. (1997)**. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) *Food Microbiology*, pp 520-556.
- **De Bruyne, T., Deelstra, H., et Vlietink, A. (1999)**. Condensed vegetable tannins: Biodiversity and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*, **27**, pp 445- 459.
- **De Graft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., et Nowak, D. (2007)**. Ferric reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implication for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic and Clinical pharmacology and Toxicology*, **100**, pp 345-352.
- **De Jesus, R. A. P., Cechinel-Filho, V., Oliveira, A. E., et Schlemper, V. (1999)**. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*, *Phytomedicine*, **7**, pp 111-115.
- **Delattre, J., Beaudeau, J. L., Bonnefont-Rousselot, D. (2005)**. Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. *Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris*, p 547.
- **Dendougui, H., Seghir, S., Belloum, Z., Benayache, F., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., et Benayache, S. (2011)**. A New Labdane Diterpene and Other Constituents from *Marrubium deserti* Noe ex coss. *Rec. Nat. Prod*, **5(4)**, pp 300-304.
- **De-Oliveira, A. P., Santin, J. R., Lemos, M., Klein, L. C., Couto, A. G. (2011)**. Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Journal of Pharm Pharmacol*, **63**, pp 1230-1237.
- **De Souza, M. M., DeJesus, R. A. P., Cechinel-Filho, V., et Schlemper, V. (1998)**. Analgesic profile of hydro-alcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedecinr*, **5(2)**, pp 103-107.

- **Diallo, D., Martson, A., Terreaux, C., Touré, Y., Smestad-Paulsen, B., et Hostettmann, K. (2001).** Screening of Malian medicinal plants for antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and radical scavenging activities. *Phytotherapy research*, **15**, pp 401-406.
- **Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traré, A., Coulibaly, K., et Maïga, A. (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* lam.(Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie*, **7**, pp 1073-1080.
- **Djahra, A. B., Bordjiba, O., et Benkherara, S. (2013).** Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.), *Phytothérapie*, **11**, pp 348-352.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., et Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**, pp 654–660.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., et Stocker, P. (2010).** Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, pp 2599-2606.
- **Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L. M., Badoc, A., et Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm*, **142**, pp 61-78.

E

- **Edziri, H., Mastouri, M., Aouni, M., et Verschaeve, L . (2012).** Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South Afr J Botany*, **80**, pp 104–109.
- **El-Bardai, S., Lyoussi, B., Wibo, M., et Morel, N. (2001).** Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension*, **23(4)**, pp 329–343.

- **El-Bardai, S., Morel, N., Wibo, M., Fabre, N., Llabres, G., Lyoussi, B., et al. (2003a).** The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Medica*, **69(1)**, pp 75–77.
- **El-Bardai, S., Wibo, M., Hamaide, M. C., Lyoussi, B., Quetin-Leclercq, J., et Morel, N. (2003b).** Characterization of marrubenol, a diterpène extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. *British Journal of Pharmacology*, **140(7)**, pp 1211–1216.
- **El-Bardai, S., Lyoussi, B., Wibo, M., et Morel, N. (2004).** Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, **26(6)**, pp 465–474.
- **Elbashiti, T. A., Elmanama, A. A., et Masad, A. A. (2011).** The antibacterial and synergistic effects of some Palestinian plants extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Functional Plant Science and Biotechnology*, **5**, pp 57-62.
- **Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Gabr, S. A., Nagy, A. A., Suliaman, M. I., et Abdel-Sattar, E. (2010).** Antihepatotoxic effect of *Marrubium vulgare* and *Withania somnifera* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, **1(4)**, pp 247-254.
- **Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., Gabr, S. A., Nagy, A. A., et Abdel-Sattar, E. (2015).** Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in Streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes Mellitus*, **3**, pp 37-44.
- **Elkhalifa Chemsá, A., Zelligui, A., Öztürk, M., Erol, E., Özgür, C., Emin Duru, M., Gherraf, N. (2016).** Antibiofilm formation, antioxidant and anticholinesterase activities of essential oil and methanol extract of *Marrubium deserti* de Noé. *J. Mater. Environ. Sci.*, **7(3)**, pp 993-1000.
- **El-Kirat-Chatel, S. (2010).** Développement d’outils cellulaires et moléculaires pour l’étude des interactions *Candida* – phagocytes; Application à la caractérisation du gène *OLE2* codant une désaturase chez *C. lusitaniae*. *Thèse de doctorat*, pp 14-22.

- **Essawy, S. S., Abo-elmatty, D. M., Ghazy, N. M., Badr, J. M., et Sterner, O. (2014).** Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Marrubium alysson* extracts in high cholesterol-fed rabbits. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **22**, pp 472–482.

F

- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, **331**, pp 372-379.
- **Favier, A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. p 108-115.
- **Fayyad, A. G. S., Ibrahim, N., et Yaakob, W. A. (2014).** Phytochemical screening and antiviral activity of *Marrubium vulgare*. *Malaysian Journal of Microbiology*, **10(2)**, pp 106-111.
- **Fazeli, M. R., Amin, G., Ahmadian-Attari, M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., et Samadi, N. (2007).** Antimicrobial activities of Iranian sumac and *Zataria multiflora* against some food-borne bacteria. *Food Control*, **18**, pp 646-649.

G

- **Gao, J., Ferreri, M., Yu, F., Liu, X., Chen., L., Su., J., et Han, B. (2011).** Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. *The Veterinary Journal*, doi:10.1016/j.tvjl.2011.08.030.
- **Garcia, M. I., et Le Bouguéneq, C. (1996).** Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bull. Inst. Pasteur*, **94**, pp 201-236.
- **Garcia-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A. J., Pueyo, E., Martín-Alvarez, P. J., et Moreno-Arribas, M. V. (2008).** Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, **19**, pp 835–841.

- **Gaschler, M., M., Stockwell, B., R. (2017).** Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 419-425.
- **Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., Yahia, M. (2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, **12**, pp 15–24.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H., et Oueld-Mokhtar, S. M. (2015).** Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, **13**, pp118-129.
- **Ghedadba, N., Hambaba, L., Bousselsela, H., Hachemi, M., Drid, A., Abdessmad, A., et Oueld-Mokhtar, S. M. (2016).** Evaluation of *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of white horehound (*Marrubium vulgare* L) leaves. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **41(1)**, pp 252-259.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmacognosie*, **3**, pp 162-169.
- **Ghल्ली, Z., Atheymen, R., Sahnoun, Z., Zeghal, K., Mnif, H., et Hakim, A. (2015).** The effect of *Marrubium vulgare* L. on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of diabetic rats. *International Journal of Pharma and Chemical Research*, **1(2)**, pp 97-106.
- **Girotti-channu, C. (2006).** Etude de la lipolyse et de synthèse des composés du Derme sous l'effet de la Cirsimarine, Flavone extraite de *Microtea debilis*. Thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. p 127.
- **Gome, M., B., Kouakou, K., Toure, A., et Traoré, F. (2011).** Étude de la toxicité aiguë et subchronique de l'extrait aqueux de *Passiflora foetida* Linn. (Passifloraceae) chez les rats et les souris. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **5(5)**, pp 1777-1789.
- **Gomez-Caravaca, A. M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., et Fernandez-Gutierrez, A. (2006).** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, pp 1220-1234.
- **Gülçin, I., Uguz, T. M., Oktay, M., Beydemir, S., et Küfrevioğlu, Ö. I. (2004).** Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk J Agric.*, **28**, pp 25-33.

H

- **Hadi, M. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. *Université Louis Pasteur Strasbourg I*, p 155.
- **Hadj-Salem, J. (2009).** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat. Institut *National Polytechnique de Lorraine*, p 1-48.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., et Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, **62(10)**, pp 628-638.
- **Hammiche, V., et Maiza, K. (2006).** Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *Journal of Ethnopharmacol*, **105**, pp 358–367.
- **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., et Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoïds antioxydants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*, **13**, pp 572-584.
- **Hendrich, A. B. (2006).** Flavonoïd-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, **27**, pp 27-40.
- **Hennebelle, T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de doctorat. *Chimie Organique et Macromoléculaire. Université de Lille*, pp 37-114.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Skaltsounis, A. L. et Bailleul, F. (2007).** Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **35**, pp 624–626.
- **Herzi, N. (2013).** Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂ supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat, *Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP), Institut National Polytechnique de Toulouse*, p 118.

- **Hindumathy, C. K. (2011).** *In vitro* study of antibacterial activity of *Cymbopogon citrates*. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **5**, pp 2-22.
- **Hoensch, H., P., Weigmann, B. (2018).** Regulation of the intestinal immune system by flavonoids and its utility in chronic inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, **24**(8): 877-881.
- **Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W. L., et Cassidy, A. (2008).** Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, **88**, pp 38-50.
- **Huang, G., Jiang, J., et Dai, D. (2008).** Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala*. *African Journal of Biotechnol*, **7** (9), pp 1335-1338.
- **Hussein, A. H. S., Gendy, A. S. H., Abeer, A. M., et Hanaa, F. Y. M. (2015).** Essential oil composition of *Marrubium vulgare* L., cultivated in Egypt. *International Journal of Plant Science and Ecology*, **4**, pp 138-141.

J

- **Jouzeau, J. Y., Daouphars, M., Benani, A., et Netter, P. (2004).** Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroenterology Clin Biol*, **28**, pp 7-17.
- **Julkunen-Titto, R. (1985).** Phenolic constituent in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *J Agricult Food Chem*, **33**, p 213–217.
- **Jürgen, R., Paul, S., Ulrike, S., et Reinhard, S. (2009).** Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties - an Overview. *Forsch Komplementmed*, **16**, pp 79–90.

K

- **Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., et Gdoura, R. (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare*

- L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, **10(19)**, pp 3908-3914.
- **Kansole, M. M. R. (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Thèse (D. E. A). *Université d'Ouagadougou*, p 39.
 - **Kanyonga, P. M., Faouzi, M. A., Meddah, B., Mpona, M., Essassi, E. M., et Cherrah, Y. (2011).** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **3(1)**, pp 199-204.
 - **Kaplan, A. (1984).** Urea. *Clin Chem*, p 437.
 - **Karioti, A., Heilmann, J., et Skaltsa, H. (2005).** Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Phytochemistry*, **66**, pp 1060–1066.
 - **Karryev, M. O., Bairyev, C. B., et Ataeva, A. S. (1976).** Some therapeutic properties and phytochemistry of common horehound. *Seriya Biologicheskikh Nauk*, **3**, pp 86–88.
 - **Kassis-Chikhani, N. (2012).** *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial resistance et virulence, thèse de doctorat, *Université Pierre et Marie Curie*, Paris 6, pp 9-63.
 - **Katalinic, V., Milos, M., et Jukic, M. (2006).** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94**, pp 550–557.
 - **Kearney, T. H., et Peebles, R. H. (1960).** Arizona flora. *University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California*, p 1085.
 - **Kempf, I et Zeitouni, S. (2012).** Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences. *Pathologie Biologie*, **60**, pp 9-14.
 - **Khanavi, M., Delnavazi, M. R., Nikoui, V., Ostadhadi, S., et Bakhtiarian, A. (2012).** Evaluation of analgesic effects of hydro-alcoholic extract of *Marrubium parviflorum* by formalin test in mice. *Asian Journal of Plant Sciences*, pp 1-4.
 - **Khoudali, S., Benmessaoud left, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., et Benaissa, M. (2014).** Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti

corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *J. Mater. Environ. Sci.*, **5(3)**, pp 887-898.

- **Kim, P. H., Son, H. K., Chang, W. H., et Kang, S. S. (2004).** Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, **96**, pp 229-245.
- **Knöss, W., Reuter, B. et Zapp, J. (1997).** Biosynthesis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway. *Biochem. J.*, **326**, pp 449- 454.
- **Koller, A. (1984).** Total serum protein. *Clin Chem*, p 418.
- **Krimat, S., Dob, T., Lamari, L., Boumeridja, S., Chelghoum, C., et Metidji, H. (2014).** Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, **2(6)**, pp 478-483.

L

- **Lagnika, L. (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées des plantes béninoises. Thèse de Doctorat. *Université Louis Pasteur. Strasbourg*, p 249.
- **Lamb, G. M. (1981).** Manual of veterinary laboratory techniques in Kenya. Ministry of livestock development/CIBAGEIGY, Basale: Switzerland.
- **Laouer, H., Yabrir, B., Djeridane, A., Yousfi, M., Beldovini, N., et Lamamra, M. (2009).** Composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Marrubium Deserti*. *Naturel Product Commun*, **4(8)**, pp 1133-1138.
- **Li, H., Lu, X., Zhang, S., Lu, M., Liu, H. (2008).** Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Pholiota nameko*. *Biochemistry (Moscow)*, **73(6)**, pp 669-675.
- **Li, H. Y., Hao, Z. B., Wanga, X. L., Huang, L., et Li J. P. (2009).** Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bio resource Technology*, **100**, pp 970-974.
- **Lienou, T. C., Etoa, F. X., Nkegoum, B., Pieme, C. A., et Dzeufiet, D. P. D. (2007).** Acute and sub-acute toxicity of *Aspilia africana* leaves. *Afr. J. Trad. Cam.*, **4(2)**, pp 127-134.

- **Lillo-Le Louët, A. (2006).** Bases pharmacologiques à l'utilisation des médicaments hémostatiques. *John Libbey Eurotext*, **18(10)**, pp 529-537.
- **Liu, J. B, Chen, F., Chen, J., Xu, Q., Xia, D., Wang, Z., et Li, Y. (2013).** Magnetic signature of environmental change reflected by lacustrine sediments from the *Ningwu Gonghai* Lake. Shanxi. China: a record of Humid Medieval Warm Period. *Chinese Sci Bull*, **49**, pp 447–464.
- **Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., et Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193(1)**, pp 265-275.
- **Luong, C. et al. (1996).** Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nature Structural Biology*, **3(11)**, pp 927-933.

M

- **Ma, X. M., Liu, Y., et Shi, Y. P. (2007).** Phenolic derivatives with free-radical-scavenging activities from *Ixeridium gracile*. *Chem. Biodiv.*, **4**, pp 2172-2181.
- **Mahmoudi, S., Khali, M., et Mahmoudi, N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut : *Cynara scolymus* L, *Nature et Technologie*, **9**, pp 35- 40.
- **Mamadou, B. (2002).** Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat. *Université Cheikh Anta Diop de Dakar*, pp 1-25.
- **Mansouri, A., Ennbarek, G., Kokkalou, E., et Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, **89**, pp 411-420.
- **Marfak, A. (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. *Université de Limoges*, p 187.
- **Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., Furman, C., Fruchart, J.C., Duriez, P., et Bailleul, F. (2003).** Natural phenylpropanoïds protect endothelial cells against oxidized LDL induced cytotoxicity. *Planta Med*, **69**, pp 207-211.
- **Matanju, P., Mohammed, S., Mustapha, M. N., Muhammad, K., et Ming, C. H. (2008).** Antioxidant activity and phenolics content of eight species of sea weeds from north Borneo. *J Appl Phycol*, **20**, pp 367-373.

- **Matkowski, A., et Piotrowska, M. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the *Lamiaceae*. *Fitoterapia*, **77 (5)**, pp 346–353.
- **Matkowski, A., Tasarz, P., et Szypuła, E. (2008).** Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2(11)**, pp 321-330.
- **Meade-Tollin, L. C., Wijeratne, E. M. K., Cooper, D., Guild, M., Jon, E., Fritz, A., Zhou, G. X., Whitesell, L., Liang, J. Y., et Gunatilaka A. A. L. (2004).** Ponicidin and Oridonin are responsible for the antiangiogenic activity of *Rabdosia rubescens*, a constituent of the herbal supplement PC SPES. *Journal of Natural Products*, **67 (1)**, pp 2-4.
- **Mercader, A. G., Duchowicz, P. R., Fernández, F. M., Castro, E. A., Bennardi, D. O., Autino, J. C., et Romanelli, G. P. (2008).** QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoïds. *Bioorgan. Med. Chem.*, **16**, pp 7470–7476.
- **Meyre-Silva, C., Yunes, R. A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F., et Cechinel-Filho, V. (2005).** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpène present in *Marrubium vulgare*. *Brazil Farmaco*, **60(4)**, pp 321–326.
- **Middleton, E. J. R., Kandaswami, C., et Heoradies, T. C. (2000).** The effects of plant flavonoïds on mammalian cells: implications for inflammation, heart, disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, **52**, pp 673-751.
- **Migdal, C., et Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine sciences*, **27**, pp 405-412.
- **Miller, L. C., et Tainter, M.C. (1944).** Estimation of LD₅₀ and its error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Boil. Med.*, **57**, pp 261-264.
- **Mittal, V., Nanda, A. (2017).** Intensification of marrubiin concentration by optimization of microwave-assisted (low CO₂ yielding) extraction process for *Marrubium vulgare* using central composite design and antioxidant evaluation, *Pharmaceutical Biology*, **55:1**, 1337-1347.

- **Mohammedi, Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielle et flavonoïdes de quelques plants de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère. *Université de Tlemcen*. p 6-14.
- **Mohammedi, Z. (2013).** Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat, *Université de Tlemcen*, p 68.
- **Mohammedi, Z., et Atik, F. (2011).** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter J Pharma Bio Sci*, **2**, pp 609-615.
- **Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., et Roura, S. I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *LWT*, **38**, pp 565-570.
- **Moulin, M. (1998).** Pharmacologie. *Masson*, Paris, p 708.
- **Moussaid, M., Elamrani, A. A., Berhal, C., Moussaid, H., Bourhim, N., et Benaissa, M. (2012).** Comparative, evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* L. and *Origanum majorana* L. *International Journal of Natural Products Research*, **1(1)**, pp 11-13.
- **Murray, R. L. (1984).** Transaminases. *Clin Chem*, p 116.

N

- **Natarajan, D., John Britto, S., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., et Perumal, G. (2005).** Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis* a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*, **102**, pp 123-126.
- **Nawwar, M. A. M., El-Mousallamy, A. M. D., Barakat, H. H., Buddrus, J., et Linscheid, M. (1989).** Flavonoids lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, **28**, pp 3201–3206.
- **Nene BI, S. A., Traoré, F., Zahoui, O. S., et Soro, T. Y. (2008).** Composition chimique d'un extrait aqueux de *Bridelia ferruginea* benth. (*Euphorbiaceae*) et études de ses effets toxicologique et pharmacologique chez les mammifères. *Afrique Science*, **4(2)**, pp 287 – 305.

- **Newal, C. A., Anderson, L. A. et Philipson, J. D. (1996).** Herbal medicines: a guide for health care professionals. *The Pharmaceutical Press, London*.
- **N'GUESSAN, K., Kadja, B., Zirihi, G. N., Traoré, D., et Aké-Assi, L. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences et Nature*, **6**, pp 1-15.
- **Novaes, A. P., Rossi, C., Poffo, C., Pretti, E. J., Oliveira, E. A., Schlemper, V., Niero, R., Cechinel-Filho, V., et Burguer, C. (2001).** Preliminary evaluation of effect of some Brazilian medicinal plants. *Thérapie*, **56**, pp 427–430.

O

- **Orhan, I. E., Belhattab, R., Senol, F. S., Gülpinar, A. R., Hosbas, S., et Kartal, M. (2010).** Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*, **32**, pp 566-571.
- **Ould El-Hadj, M. D., Hadj-Mahammed, M., et Zabeirou, H. (2003).** Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla (Sahara septentrional est). *Courrier du Savoir*, **3**, pp 47-51.
- **Oyagbemi, A. A., Salihu, M., Oguntibeju, O. O., Esterhuyse, A. J., et Farombi, E. O. (2014).** Some selected medicinal plants with antidiabetic potentials, pp 95- 113.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Nutr*, **44**, pp 307–315.
- **Ozenda P. (1991).** Flore et végétation du Sahara (2^{ed}). *Paris, France, CNRS*, p 662.

P

- **Parker, K. F. (1972).** An illustrated guide to Arizona Weeds. *The University of Arizona Press, Tucson, AZ*, p 338.

- **Patrick, B., Jean, L., et Michel, S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{er} Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. pp 100, 108 et 274.
- **Pavela, R. (2004).** Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia*, **75**, pp 745–749.
- **Peronny, S. (2005).** La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (*Lemur Catta*). Thèse de Doctorat du Muséum national d’histoire naturelle. Discipline Eco- Ethologie, p 151.
- **Picot, D., Loll, P. J., et Garavito, R. M. (1994).** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, **367**(6460), pp 243-249.
- **Pietta, P. G. (2000).** Flavonoïds as antioxydants. *Journal of Natural Products*, **63**, pp 1035-1042.
- **Pincemail, J., Heusele, C., Bonté, F., Limet, R., et Defraigne, J. O. (2001).** Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act. Méd. Int. - Métabolismes - Hormones - Nutrition*, **4**, pp 158-164.
- **Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Salido, S., Waard, P., et Van Beek, T. A. (2012).** Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chemistry*, **130**, pp 695-701.

Q

- **Quezel, P., et Santa, S. (1963).** Nouvelle Flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. In: CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris. pp 801-802.

R

- **Reitman, S. N., et Frankel, S. (1957).** A colorimetric method for the determination of SGPT and SGPT. *Am. J. Clin. Pathol*, **25**, pp 56- 62.
- **Rhiouani, H., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., et Lyoussi, B. (2008).** Acute and sub chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, **118**, pp 378-386.

- **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., et Paganga, G. (1996).** Structure antioxidant activity relationships of flavonoïds and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, **20**, pp 933-956.
- **Rifai, N., Bachorik, P. S., et Albers, J. J. (1999).** Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Text book of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp*; p. 809–861.
- **Rigano, D., Aviello, G., et Bruno, M. (2009).** Antispasmodic effects and structure activity relationships of labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. Libanoticum. *Journal of Naturel Product*, **72**, pp 1477–1481.
- **Rolland, Y. (2004).** Actualités des lipides en cosmétique : Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, **11**, pp 419 – 424.
- **Roman-Ramos, R., Alarcon-Aguilar, F., Lara-Lemus, A., et Flores-Saenz, J. L. (1992).** Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as anti-diabetics. *Arch Med Res*, **23**, pp 59–64.
- **Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M., et Arbuck, S. G. (1992).** Taxol the 1st of the texanes, an important new class of anti-tumor agents. *Seminars in Oncology*, **19**, pp 646-662.

S

- **Sabin, C., Mitchell, E. P., Pokorna, M., Gautier, C., Utille, J. P., Wimmerova, M. et Imberty, A. (2006).** Binding of different monosaccharides by lectin PA-III from *Pseudomonas aeruginosa*: thermodynamics data correlated with X-ray structures. *FEBS Lett*, **580**, pp 982- 987.
- **Sachdev, S., et Davies, K. J. A. (2008).** Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, **44**, pp 215–223.
- **Sahpaz, S., Garbacki, N., Tits, M., et Bailleul, F. (2002a).** Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoïds esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, **79(3)**, pp 389–392.
- **Sahpaz, S., Hennebelle, T., et Bailleul, F. (2002b).** Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural Product Letters*, **16(3)**, pp 195–199.
- **Salinas, G. M. M., Guerra, M. C. R., Villareal, J. V., Cardenás, B. D. M., Montes, P. B., et Fernández, S. S. (2005).** Bacterial activity of organic

extracts from *Flourensia cernua* against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Medical Research*, **37**, pp 45–49.

- **Samson, R. A., et Frisvad, J. C. (2004).** *Penicillium* subgenus: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, **49**, pp 1–266.
- **Sanogo, R., Maiga, A., Diallo, D. (2006).** Activité analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *Maytenus senegalensis*, *Stereospermum kunthianum* et *Trichilia emetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, **14**, pp 123-136.
- **Santos, H. S., Barros, F. W., Albuquerque, M. R., Bandeira, P. N., Pessoa, C., Braz-Filho, R., Monte, F. J., Leal-Cardoso, J. H., et Lemos, T. L. (2009).** Cytotoxic diterpenoids from *Croton argyrophylloides*. *Journal of Natural Product*, **72(10)**, pp 1884-1887.
- **Sardet, A. (2003).** Antibacterial therapy against *Hemophilus influenza* and *Staphylococcus aureus*. *Archives de pédiatrie 10 suppl*, **2**, pp 347-351.
- **Sarikurkcü, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., et Harmandar, M. (2008).** Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (*Lamiaceae*) by three different chemical assays. *Bioresour. Technol*, **99**, pp 4239-4246.
- **Schlemper, V., Ribas, A., Nicolau, M., et Cechinel, F. V. (1996).** Antispasmodic effects of hydro-alcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*, **3(2)**, pp 211–216.
- **Seidel, V., Verholle, M., Malard, Y., Tillequin, F., Fruchart, J. C., Duriez, P., Bailleul, F., et Teissier, E. (2000).** Phenylpropanoïds from *Ballota nigra* L. inhibit *in vitro* LDL peroxidation. *Phytother. Res*, **14**, pp 93-98.
- **Sibilia, J. (2003).** Les corticoïdes : mécanismes d'action Steroids : mechanisms of action. *La Lettre du Rhumatologue*, **89**, pp 23-31.
- **Sies, H., Berndt, G., et Jones, D., P. (2017).** Oxidative stress. *Annu. Rev. Biochem.istry*, 86:25.1–25.34.
- **Stanković, M. S. (2011).** Total phenolic content, flavonoïd concentration and antioxydant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J. Sci*, **33**, pp 63-72.

- **Steven, P., Rachel, C., Martha, E., Paul, H., Jane, S., et Peter, W. J. (2004).** Microbiology of water borne diseases. *Ed Elsevier Academic Press*, pp 71-132.
- **Stritzke, J. F. (1975).** Germination characteristics and chemical control of horehound. *International Congress of Essential Oils. Fragrance and Flavors*, New Delhi. p 71.
- **Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Zampirolo, J. A., Cechinel-Filho, V., et Schlemper, V. (2006).** Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, **108(3)**, pp 379-384.
- **Süleyman, H., Demircan, B., et Karagöz, Y. (2007).** Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep*, **59**, pp 247-258.
- **Suralkar, A., Rodge, N., Kamble, D., et Maske, S. (2012).** Evaluation of anti-inflammatory activity. *Science and Drug Research*, **4(3)**, pp 213-217.

T

- **Tegeder, I., Pfeilschifter, J., et Geisslinger, G. (2001).** Cyclooxygenase independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J*, **15**, pp 2057-2072.
- **Tietz, N. W. (1990).** Clinical Guide to Laboratory Tests, *Second Edition W.B. Saunders Company, Philadelphia*, pp 554-556.
- **Tsuda, T., Horio, F. et Osawa, T. (2002).** Cyanidin 3-*O*- β -glucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rat. *Journal of Nutrition Science Vitaminol*, **48**, pp 305-310.
- **Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., et Polat, G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenols contents and antioxidant and antibacterial activities of *Black Tea*. *Molecules*, **12**, pp 484-496.

U

- **Urzua, A., Jara F., Tojo, E., Wilkens, M., Mendoza, L., et Rezende, M. C. (2006).** A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudates of *Haplopappus uncinatus*. *Journal of Ethnopharmacology*, **103**, pp 297-301.
- **Ulukanli, Z., et Akkaya, A. (2011).** Antibacterial activity of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* Var. Hirta grown wild in eastern Anatolia, Turkey. *Int. J. Agric. Biol*, **13**, pp 105-109.

V

- **Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D. j., Tromp, M. N. J. L., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., et Bast, A. (1996).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoïds. *Free Radical Biol. Med.*, **20**, pp 331-342.
- **Vane J. R. (1971).** Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, **231**, pp 232-235.
- **Vane, J. R, Bakhle, Y. S., et Botting, R. M. (1998).** Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **38**, pp 97-120.
- **Vergara-Galicia, J., Aguirre-Crespo, F., Tun-Suarez, A. et al. (2012).** Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *M. vulgare*. *Phytopharmacology*, 3(1), pp 54-60.

W

- **Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., et Mc-Phail, A. T. (1971).** Plant anti-tumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel anti-leukemic and anti-tumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, **93**, pp 2325-2327.
- **Warda, K., Markouk, M., Bekkouche, K., Larhsini, M., Abbad, A., Romane, A., et Bouskraoui, M. (2009).** Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*. *Afr. J. Pharm. and Pharmacol*, 3(3), pp 101-104.
- **Weiss, J., Ainsworth, N. et Faithfull, I. (2000).** Best practice management guide. P 8.
- **Wiradharma, N., Khan, M., Yong, L. K., Hauser, C. A. E., Seow, S. V., Zhang, S., et Yang, Y. Y. (2011).** The effect of thiol functional group incorporation into cationic helical peptides on antimicrobial activities and spectra. *Biomaterials*, **32**, pp 9100-9108.
- **Wojdylo, A., Oszmianski, J., et Czemerys, R. (2007).** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**, pp 940-949.

- **Wolski, T., Matosiuk, D., Baj, T., et Ziewiec, A. (2007).** White horehound (*Marrubium vulgare* L.) medicinal plant with multidirectional pharmacological activity. *Post. Fitoterapii*, **8**, pp 39-45.
- **Wong, S. P., Leong, L. P., et William Koh, J. H. (2006).** Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food chemistry*, **99**, pp 775-783.
- **Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., et Prior, R. L. (2004).** Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, **52**, pp 4026–4037.

X

- **Xu, W., Liu, J., Li, C., Wu, H. Z., et Liu, Y. W. (2008).** Kaempferol-7-O- β -D-glucoside (KG) isolated from *Smilax china* L. rhizome induces G2/M phase arrest and apoptosis on *HeLa* cells in a p53-independent manner. *Cancer lett*, **264**, pp 229-240.
- **Xue, Z., et Yang, B. (2016).** Phenylethanoid Glycosides: Research Advances in Their Phytochemistry, Pharmacological Activity and Pharmacokinetics. *Molecules*, **21(991)**, pp 2-25.

Y

- **Yousefi, K., Soraya, H., Fathiazad, F., Khorrami, A., Hamedeyazdan, S., Maleki-Dizaji, N., et Garjani, A. (2013).** Cardioprotective effect of *Marrubium vulgare* L. on isoproterenol induced acute myocardial infarction in rats. *Indian J Exp Biol*, **51**, pp 653-660.
- **Yousefi, K., Fathiazad, F., Soraya, H., Rameshrad, M., Maleki-Dizaji, N., et Garjani, A. (2014).** *Marrubium vulgare* L. methanolic extract inhibits inflammatory response and prevents cardiomyocyte fibrosis in isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats, *BioImpacts*, **4(1)**, pp 21-27.
- **Yousefi, K., Hamedeyazdan, S., Torbati, M., et Fathiazad, F. (2016).** Chromatographic Fingerprint Analysis of Marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC Technique. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **6(x)**, pp 1-6.

Z

- **Zaabat, N., Darbour, N., Bayet, C., Michalet, S., Doléans-Jordhem, A., Chelr-Ghedira, L., Akkal, S., et Dijoux-Franca, M. G. (2010).** Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une Lamiaceae endémique algérienne. *Pharmacognosie*, **8**, pp 353-358.
- **Zaabat, N., Hay, A. E., Michalet, S., Darbour, N., Bayet, C., Skandrani, I., Ghedira, L. C., Akkal, S., et Dijoux-Franca, M. G. (2011).** Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. *Food and Chemical Toxicology*, pp 1-8.
- **Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchi, A., Albasini, A., Melegari, M., Vampa, G., Bellotti, A., et Mazza, P. (1991).** Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta Medica*, **57**, pp 237-241.
- **Zarai, Z., Kadri, A., Ben Chobba, I., Ben Mansour, R., Bekir, A., Mejdoub, H., et Gharsallah, N. (2011).** The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, **161**, pp 1-10.
- **Zhang, Q., Zhao, X. H., et Wang, Z. J. (2008).** Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food chem. Toxicol*, **46**, pp 2042-2053.
- **Zlatanov, M. D., et Antova, G. A. (2004).** Composition of biologically active lipids of *Lamiaceae* seed oils. *Grasas y Aceites*, **55**, pp 143-147.
- **Zongo, C., Savadogo, A., Somda, K. M., Koudou, J., et Traore, A. S. (2011).** *In vitro* evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* H.B. & K. and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. *International Journal of Phytomedecine*, **3**, pp 182-191.



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2016, 8 (4):33-40
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract from *Marrubium deserti* leaves and evaluation of their acute toxicity

Ghedadba Nabil* and Hambaba Leila

Laboratory of Chemistry of Materials and Living: Activity and Reactivity, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Living, University Hadj Lakhdar, Batna, 05000, Algeria.

ABSTRACT

This work aims to investigate the acute toxicity of methanolic extract (MeOHE) from *Marrubium deserti* leaves and evaluate their *in vivo* anti-inflammatory and analgesic properties. Quantitative determinations of total polyphenols and flavonoids revealed that MeOHE is rich in polyphenols (184 ± 0.78 mg GAE/mg of extract) and flavonoids (28.48 ± 0.40 μ g QE/mg of extract). In addition, the dosage of condensed tannins showed that MeOHE contains an amount of 5.75 ± 0.42 mg E-Catechin/mg of extract. The study of acute toxicity in Wister albino rats, at a dose of 2000 mg/kg and the dose of 5000 mg/kg shows that MeOHE did not produce any toxic signs or deaths in rats for all parameters studied. Assessment of anti-inflammatory activity *in vivo* by the paw edema assay induced by carrageenan showed that oral administration of MeOHE at a dose of 200 mg/kg in rats treated with carrageenan causes a significant decrease (86.4%) of inflammation compared with the control group and which is slightly greater than the effect of diclofenac (85.52%) that was used as a positive control. The analysis of C-reactive protein shows the absence of this protein in the plasma of rats treated with MeOHE of the plant. As regards the analgesic activity of the MeOHE has a very significant reduction in numbers of abdominal writhes (5.14 ± 0.23) at a dose of 400 mg/kg bw, these results are very similar to those obtained in the group treated with paracetamol (5 ± 1.58) at a dose of 400 mg / kg bw.

Keywords: *Marrubium deserti* de Noé ex Coss, Lamiaceae, Polyphenols, Acute toxicity, Anti-inflammatory activity, Analgesia activity.

INTRODUCTION

Inflammation is a response mode of the organism to a pathogen which aims to repair tissue damage. Sometimes the inflammation can be harmful because of the aggressiveness of the pathogen, its persistence, the seat of inflammation, by abnormal regulation of the inflammatory process, quantitative or qualitative abnormality of cells involved in the inflammation. The use of synthetic anti-inflammatory is always accompanied by undesirable side effects, whereas the use of phytochemicals is useful and without side effects [1]. Different species of the *Labiatae* family are used in traditional medicine in several countries. *Marrubium deserti* (Lamiaceae) known as "Djaada" in Algeria's desert is considered a rare species. It never studied pharmacological side. However, the related species, *M. vulgare* is studied by a certain number of researchers to these anti-inflammatory properties.

M. deserti is endemic, occupies the entire central Sahara of Algeria [2, 3] and also pushes the Sahara in Morocco [4] and in arid regions in Tunisia. [5] This plant has several applications in traditional medicine. Bellakhdar [4] described the use of the leaves of *M. deserti* in many traditional recipes in Morocco to cure various diseases: colitis, colic, coughing and fever. Edziri *et al.* [5] reported that *M. deserti* leaves are used in traditional medicine in Tunisia as a remedy for asthma, diabetes and as a diuretic. This species also has antigenotoxic activity, antioxidant [6] and significant antiviral against Cocksackie B virus (CoxB-3) [5].

M. deserti is rich by flavonoïds. Zaabat *et al.* [6, 7] were able to isolate four glycosides of apigenin: apigenin-7-O- β -neohesperidoside; apigenin-7-O-glucoside; the terniflorin: apigenin-7-O-(6''-E-p-coumaroyl)-glucoside and apigenin-7-O-glucuronide. From the dichloromethane extract of the aerial parts of *M. deserti*, [6] have been isolated for the first time two new labdane diterpene: the desertin (C₂₂H₃₆O₈) and marrulibacetal A (C₂₁H₃₂O₇). In addition, other diterpenes have already identified: cyllenin A and 15-epi-cyllenin A [6], marrubiin [8] and marrulactone [6, 8]. The aim of this study was to investigate the pharmacological activity of *M. deserti* species. Thus, the analysis focused on the search of main chemical drugs and the evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities *in vivo* in rats and acute oral toxicity of the methanol extract of *M. deserti* leaves.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of *M. deserti* were collected from their natural habitat around Daya-Mogheul, Bechar. This plant was identified by Pr. Hocine Laouer, Department of Biology, Faculty of Science, University Ferhat-Abbas Setif, Algeria. The leaves were dried under shade for 25 days at room temperature, dried leaves parts were blended into fine powder and stored in the dark at a dry place.

Animals

Wistar albino rats for either sex (150-180 g) procured for Research institute of both sexes were housed in separately in plastic cage at temperature of (25) °C and 50-55 % relative humidity, with a 12 light/dark cycle respectively before and during the experiment. Animals were allowed the access to standard pellet diet and water *ad libitum*.

Chemicals and reagents

Standard phenolic acids "gallic acid", flavonoïds "quercetin" and tannins "catechin" were obtained from "Sigma Aldrich". The Folin-Ciocalteu reagent and Aluminum Chloride (AlCl₃) were purchased from "Fluka Chemie". Carrageenan, Acetic acid puriss glacial, methanol and Formaldehyde (CH₂O) were purchased from "Sigma-Aldrich", diclofenac (Dic) and Paracetamol were used in the present study also obtained from "Sigma-Aldrich".

Preparation of plant extract

Amount of 500 mg of powdered leaves was extracted with petroleum ether three times 3 L for each time. Then, the marc was dried and extracted with dichloromethane three times 3 L for each time and with methanol three times 3 L for each time and the supernatants were filtered sequentially using cloth filter, cotton wool, and Whatman filter paper. The solvents were then evaporated under reduced pressure and controlled temperature (35 °C) using a vacuum rotary evaporator "Buchi Rotavapor".

Phytochemical screening

The phytochemical screening of MeOH extract was performed using standard method [9]. Phytochemical constituents such as phenolic compounds, steroids and terpenoïds (*Lieberman-Burchard's test*), saponins (*Frothing test*), flavonoïds (*Shinoda test*), alkaloids (Mayer reagent) and tannins (*FeCl₃ test*) were qualitatively analyzed.

Polyphenols analysis

The total polyphenols were estimated by the method described by Stanković [10]. Ranslation of the Folin-Ciocalteu reagent (FCR) causes a reduction of its colorimetric properties, thus, the total polyphenol content is determined by extrapolation on a standard curve obtained from a serial dilution in distilled water gallic acid (125 mg/L). In each test tube was added an aliquot (0.25 mL) of the test sample (sample or gallic acid), 1.25 mL of FCR (diluted 1:10) and 1 mL (75 g/l) NaHCO₃. Blank was concomitantly prepared, containing 0.25 ml methanol, 1.25 ml 10% Folin-Ciocalteu's reagent dissolved in water and 1 ml of 7.5% of NaHCO₃. After agitation, various solutions have been left to the dark place for 30 min at 40° C. Absorbance was then measured at 765 nm using spectrophotometer (UV/Visible). The samples were prepared in triplicate for each analysis and the mean value of absorbance was obtained. The total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalent per mg of extract (mg GAE/mg of extract).

Determination of total flavonoïds concentrations

Amount of 1 ml of each sample and standard (prepared in methanol) was added to 1 ml of the solution of AlCl₃ (2% dissolved in methanol). After 10 minutes, the absorbance was measured at $\lambda_{max} = 430$ nanometers against the reagent blank prepared. The concentrations of flavonoïds have been deduced from the range of the calibration curve established with quercetin (0-35 mg/ml). The results were expressed as milligrams of quercetin equivalents per mg of extract (mg QE/mg of extract) [11].

Determination of tannins concentrations in the plant extracts

Condensed tannins were created by the vanillin method described by Julkumen-Titto [12]. Indeed, vanillin reacts with free flavan 3-ols and the terminal units of proanthocyanidins giving a red coloration whose intensity is proportional to the rate of flavanols present in the medium and which has an absorption maximum at 500 nm in length wave. Aliquots of 0.1 to 1 ml of the stock solution (0.5 mg/ml) catechin and extracts were added to a series of test tubes, the final volume in each tube was made up to 1ml by absolute methanol addition. 1.5 ml of 4% vanillin in methanol and dissolved in 750 μ l of HCl (12M) at 37% were added and at one-minute intervals to each tube of the series and thereafter placed in a water bath set at 30° C for 20 minutes. The results were expressed as milligrams of catechin equivalents per mg of extract (mg CE/mg of extract).

Acute toxicity

Two doses of the methanol extract were tested on groups of five homogeneous albino rats of either sex (150-180 g body weight) previously fasted for 18 hours. Doses of 2000 to 5000 mg/kg are administered orally by means gastric intubation: the first day and the third day of treatment (72 hours). The control group received an aqueous physiological saline (NaCl 9 ‰) orally as vehicle at a dose volume of 10 ml/kg bw. The lots were quarantined for 14 days by regularly noting the various disturbances that is to say the change in behavior: comments focused on mobility, sensitivity to noise and pinching, diet, breathing, the appearance of feces [13] and death from the first day of treatment. At the end of treatment, animals were sacrificed by decapitation using chloroform for anesthesia. The blood of each animal was collected at a time into a tube containing anticoagulant (EDTA, heparin), for respectively metering the haematological and biochemical parameters.

Hematologic analysis

Blood samples collected in tubes containing anticoagulant (EDTA, heparin) were immediately used to determine levels of white blood cells, red blood cells, platelets and hematocrit according to standard methods [14].

Biochemical parameters

Blood collected in heparin tubes and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The serum was analyzed for various parameters such as Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline Phosphatase (ALP), Cholesterol, Triglyceride, Urea, Blood glucose, Creatinine, Bilirubin.

Anti-inflammatory Activity

Searching for anti-inflammatory properties was conducted on the model of plantar edema induced in the rat by injection of a 1% suspension (100 μ l) of carrageenan in the right leg; technical based on those described by Winter *et al.* [15]. The tested products were administered orally 1 hour before the injection of carrageenan. The rats were fasted for 18 hours prior to treatment and divided into three groups of five rats each. Group A witness received 0.9% NaCl (10 ml/kg bw) only, group B was treated with 200 mg/kg bw of methanol extract, and rats of group C were treated with diclofenac (Dic), non-steroidal anti-inflammatory drug of reference at a dose of 100 mg / kg bw. Evaluation of the edema was followed by recording the diameter of the inflamed paw 0, 1, 2, 3, 4 and 5 hours after injection of the phlogogen agent. For each treatment group, average diameters obtained in these surveys (Dt) were compared to that obtained before treatment (D0) and for calculating the percentage of edema (inflammation percentage) from the formula $(Dt - D0) / D0 * 100$. While, the percentage inhibition of edema was calculated from the formula:

$$[(Dt - D0)_{\text{witness}} - (Dt - D0)_{\text{traited}}] / (Dt - D0)_{\text{witness}} * 100 \text{ (Amezouar } et al., 2013)$$

To determine exactly whether the MeOH extract plant has an anti-inflammatory effect, rats were anesthetized immediately after the last diameter measurement using chloroform and then blood was collected from the eye in tubes containing anticoagulant (EDTA) which was centrifuged at 3000 rpm for 10 min to determine the level of C-reactive protein (CRP). The sedimentation rate was also measured using pipettes VS.

Analgesic activity (writhing Test)

The analgesic effect of methanolic extract evaluated according to the number of abdominal writhing induced by the intra-peritoneal injection of acetic acid (1%) by the method described by [16]. Three groups of 5 rats of both sexes were formed. Lot white witness received distilled water; against the other lots were the methanolic extract of the plant (400 mg/kg) and the paracetamol (400 mg/kg). One hour after administration of the extract, the animals received by i.p. 1% acetic acid at a dose of 10 ml/kg. Five minutes after injection of acetic acid, writhing numbers were counted for each rat during 15 minutes. The analgesic effect was evaluated according to the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{W_t}{W_b}\right) \times 100$$

W_b : represents the average number of contortions of the control group rats and W_t : is the average number of rats contortions of the Treaty lot.

Statistical analysis

The values were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey multiple comparison tests. *P* values < 0.05 were considered as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical screening

The characterization of chemical constituents of the methanolic extract revealed the presence of quinones, gallic and catechic tannins, alkaloids, sterols, polyterpenes, polyphenols, reducing compounds, flavonoids and saponosides (Table 1).

Table 1 Phytochemical constituents of methanolic extract from *M. deserti* leaves

Sample	Phytochemical constituents	Results
MeOH extract	Flavonoids	+++
	Condensed Tannins	++
	Terpenoids	+++
	Steroid	++
	Alkaloid	++
	Saponin	++

For flavonoids, tannins, terpenoids and steroids, +: weak colour; ++: mild colour; +++: strong colour.

For alkaloids, +: negligible amount of precipitate; ++: weak precipitate; +++: strong precipitate.

For saponins, +: 1-2 cm froth; ++: 2-3 cm froth; +++: >3 cm froth.

Polyphenols content, total flavonoids and condensed tannins value

The results of quantitative analysis of phenolic compounds, total flavonoids and tannins of the methanol extract of *M. deserti* leaves by UV-visible spectroscopy showed that it contained 184 ± 0.78 mg GAE/mg of extract, 28.48 ± 0.40 mg QE/mg of extract and 5.754 ± 0.42 CE/mg of extract respectively. Phenolic compounds are abundant in species belonging to the family Labiatae [17]. The levels of polyphenols and flavonoids determined in this study are consistent with those reported by previous studies carried out on the same species (Table 2).

Table 2 Polyphenols content, total flavonoids and condensed tannins of methanolic extract from *M. deserti* leaves

Sample	Bioactifs Compounds	Results
MeOH extract	Polyphenols content ^(a)	184 ± 0.78 *
	Total flavonoids ^(b)	28.48 ± 0.40 ***
	Condensed tannins ^(c)	5.75 ± 0.42 ***

^(a) Gallic acid equivalent (mg GAE/mg extract), ^(b) Quercetin equivalent (mg QE/mg extract); ^(c) mg Catechin E per mg of extract.

*: highly significant value ($P < 0.0001$), ***: significant value ($P < 0.05$).

Acute oral toxicity

In this study, the oral administration of the methanolic extract at all given doses (2000 mg/kg and 5g per Kg) did not produce any visible sign of acute toxicity or instant death in rats tested during the period of observation. The results of hematologic parameters and biochemical profile of the treated and control groups are presented in Table 3 and 4.

Table 3 Effect of methanolic extract from *M. deserti* leaves on hematologic parameters of rats in acute toxicity (mean \pm SEM, n= 5)

Parameters	Methanolic extract from <i>M. deserti</i> treated group		
	Control group	2000 mg/Kg	5000 mg/Kg
Red Blood ($\times 10^{12}/L$)	4.9 ± 0.6	4.68 ± 0.25	4.62 ± 0.81
White blood cells ($\times 10^9/L$)	8.6 ± 0.5	8.9 ± 2.07	9.14 ± 1.16
Platelets ($\times 10^9/L$)	669.8 ± 139.7	681.6 ± 128.3	649 ± 49.05
Hemoglobin (g/dL)	14.3 ± 1.0	13.9 ± 0.67	13.7 ± 0.08

Values expressed as mean \pm STD; each batch comprising 5 animals (n=5/lot).

Table 4 Effect of methanolic extract from *M. deserti* leaves on biochemical parameters of rats in acute toxicity (mean \pm SEM, n= 5)

Parameters	Methanolic extract from <i>M. deserti</i> treated group		
	Control group	2000 mg/Kg	5000 mg/Kg
Glucose (g/l)	1.18 \pm 0.24	1.12 \pm 0.02	1.01 \pm 0.08
Urea (g/l)	0.39 \pm 0.10	0.38 \pm 0.04	0.37 \pm 0.05
Cholesterol (g/l)	0.42 \pm 0.09	0.37 \pm 0.02	0.41 \pm 0.11
Triglycerides (g/l)	0.28 \pm 0.07	0.24 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04
HDL-Cholesterol (g/l)	0.20 \pm 0.05	0.16 \pm 0.01	0.18 \pm 0.07
LDL-Cholesterol (g/l)	0.23 \pm 0.05	0.21 \pm 0.07	0.23 \pm 0.06
ALT (UL)	8.34 \pm 0.95	5.26 \pm 0.97*	5.46 \pm 0.64*
AST (UL)	7.34 \pm 2.27	5.85 \pm 0.70	7.23 \pm 0.73
Bilirubin (mg/l)	0.52 \pm 0.17	0.46 \pm 0.08	0.50 \pm 0.09

Values expressed as mean \pm STD; Significance with Tukey's test following one way ANOVA is evaluated as * $P < 0.05$.

ALT : Alanine aminotransferase and AST : Aspartate aminotransferase.

No statistically significant differences ($P > 0.05$) were recorded in the most biochemical parameters analyzed after 14 days except for the ALT (* $P < 0.05$) raised with groups treated with the (2 and 5 g/Kg). Moreover, there was no effect on the levels of indicators of liver and kidney functions such as alanine amino-transferase (ALT), aspartate amino-transferase (AST) and Bilirubin. This result demonstrated that "*M. deserti*" did not induce any damage to the liver.

These results of acute toxicity are consistent with those reported previously by [18] that dealt five female rats in an acute oral study with a single dose of 2000 mg / kg of methanol extract of *M. vulgare*. Over a period of 14 days the animals were observed. No changes could be detected in the skin, fur, eyes, mucous membrane (nasal), the central nervous system and the autonomic nervous system. The data suggest that the toxic dose of the methanolic extract of *M. vulgare* is greater than 2000 mg /kg witch consistent with our data.

In toxicology, it is known that pharmacodynamic substance, and the LD₅₀ is less than 5 mg/kg bw is super toxic. That having a LD₅₀ between 5 and 50 mg / kg bw is an extremely toxic substance. One whose LD₅₀ belongs to the interval 50 to 500 mg/kg bw is considered highly toxic. One whose LD₅₀ is in the range 500 to 5000 mg/kg bw is moderately toxic. The substance having an LD₅₀ of between 5000 and 15000 mg/kg bw is slightly toxic and finally one whose LD₅₀ is greater than 15,000 mg / kg bw is said to be non-toxic [19]. According to this classification, MeOH extract of *M. deserti* administered orally is slightly toxic or nontoxic. The difference in toxicity depending on the mode of administration, was observed by [19] with capsaicin and manganese. This difference was also observed with the decoction of leaves *Pilostigma reticulatum* and *Ziziphus mauritiana* crude extract [19]. Transaminases (AST and ALT) are good indicators of liver function and biomarkers to predict the possible toxicity of drugs [20] Therefore, ALT is more specific to the liver and is thus a better parameter for detecting liver injury [21]. Any elevation pertaining to these enzymes indicate their out flow into the blood stream due to damage in liver parenchymal cells. Furthermore, the enzyme (ALT) decreased significantly in animals treated with the dose of 2000 mg/Kg. Our results show that the MeOHE could have a hepato-protective effect in the animals which according to the work of Elberry *et al.* [22].

Anti-inflammatory Activity

The results of the anti-inflammatory activity obtained were compared to those of Diclofenac (group 3) and those of the control which received saline (Group 1). The evolution of inflammation for different groups is shown in Table 5.

Table 5 Effect of methanolic extract (200 mg/Kg) and diclofenac (200 mg/Kg) on the plantar edema induced by carrageenan in rats

Groups and doses (mg/Kg)	Time (H) and plantar diameter (mm)				
	1h	2h	3h	4h	5h
Control group	6.4 \pm 0.5	6.87 \pm 0.7	6.99 \pm 0.6	6.87 \pm 0.4	5.62 \pm 0.7
Extract (200mg/Kg)	6.40 \pm 1.0	5.94 \pm 0.4	4.79 \pm 0.2***	4.49 \pm 0.5**	4.41 \pm 0.2**
Diclofenac (200 mg/Kg)	5.37 \pm 1.0	5.95 \pm 0.5	4.73 \pm 0.5***	4.71 \pm 0.6**	4.38 \pm 0.3**

Values represented as mean \pm standard deviation (n = 5). * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$ is considered significant compared to the control.

According to the results of the table it is noted that the inflammation caused by carrageenan increases with time and reaches a maximum of 6.99 \pm 0.6 mm for three hours. From these results, it appears that the methanol extract of the plant inhibits significantly the inflammatory response. This inhibition is a function of time, or at equal time 1h the diameter of the paw is measured 6.40 \pm 1.0 mm, and the time equal to 2 hours the inhibition was 5.94 \pm 0.4 mm and showed no significant difference compared to control. At time equal to 3 hours the extract represents a highly significant inhibition of 4.79 \pm 0.2 mm and which is very close to the effect of diclofenac 4.73 \pm 0.5 mm. Then, this inhibition is continuous over time, one can deduce that the extract has an anti-inflammatory effect similar to the effect of diclofenac. The administration of DIC (200 mg / kg bw) significantly prevented the development of the

inflammation at the level of the plantar paw of the rats at the fourth and the fifth hour after the administration of carrageenan (4.71 ± 0.6 mm and 0.3 ± 4.38 mm) respectively. Fig. 1 shows the percentage inhibition of edema induced by carrageenan.

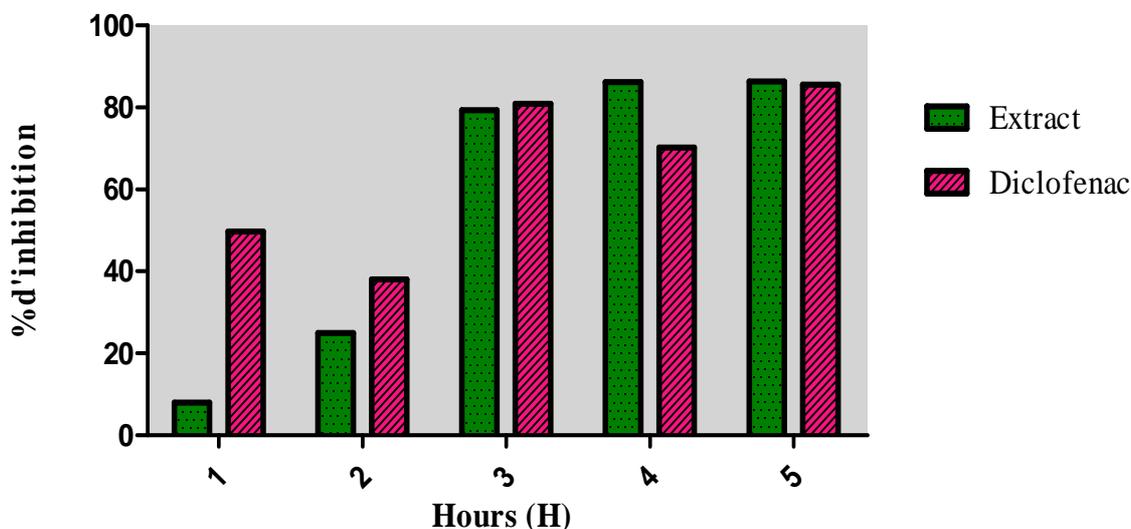


Fig. 1 Histogram percentage inhibition of paw edema after the treatment in the test of the anti-inflammatory activity

Assessment of percentage inhibition shown that *M. deserti* methanolic extract has anti-inflammatory activity. In the 1st hour the MeOH extract at a dose of 200 mg/kg shows a percent inhibition of 8.86% lower than that obtained with diclofenac at a dose of 200 mg/kg (49.68%). At the third time the effect of the extract (79.35%) is almost similar to that of diclofenac (80.86%). Thereafter and the fourth and fifth time it appears that the effect of the extract is higher slightly than that of the positive control (diclofenac) and represents 86.2% inhibition values, 86.40% respectively. The results of the analysis show the presence of CRP in serum of treated rats carrageenan which shows the role of carrageenan in the induction of inflammation, whereas this protein is absent in the serum of other rats treated by the extract or diclofenac standard.

The administration of *M. deserti* methanol extract at a dose of 200 mg/kg bw prevents significantly ($P < 0.05$) the plantar edema in rats from the third hour of treatment. This suggests the significant anti-inflammatory effect of the extract of the plant, it could be due to the richness of the methanol extract of *M. deserti* in bioactive compounds, mostly polyphenols, flavonoids and phenylpropanoids glycosylated. Flavonoids have been reported to exhibit antioxidant [23, 24], anti-inflammatory [25] and hepatoprotective [22] activities. Furthermore, condensed tannins have been suggested to possess free radical scavenging and antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective activities. Taking all these reports into consideration, it is plausible to suggest that the anti-inflammatory activity of MeOH extract of *M. deserti* involved, partly, synergistic action of alkaloids, flavonoids, condensed tannins, and saponins. However, the work performed by Sahpaz and colleagues [26] demonstrated the potent anti-inflammatory effect of these compounds cause the inhibition of cyclo-oxygenase 2. Flavonoids are also inhibitors of the C3 convertase of the alternative pathway and complement activation by inhibiting the binding between factor B and C3. More, recently Ghedadba *et al.* [27] have identified four groups of these compounds in methanolic extract of the plant *M. vulgare*: verbascoside, arenarioside, ballotétroside and forsythoside B. The results obtained in this study are consistent with those found by Kanyonga *et al.* [8, 28]. Also, other studies have shown that many species of the family Lamiaceae such as *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* develop an anti-inflammatory activity *in vivo* [8].

The cellular and molecular mechanism by which the λ -carrageenan induced inflammatory process is known. It stimulates the release of histamine and serotonin from mast cells, starting it with a cascade of events that produce other mediators that contribute to the establishment of the acute inflammatory response [29]. Indeed, the carrageenan induced during the early phase (1-2 h) of the inflammatory response, the production of pro-inflammatory factors such as histamine, serotonin, leukotrienes, PAF and prostanoids. These factors cause vascular changes leading to plasma exudation. In addition to their inhibition of the production of pro-inflammatory mediators, secondary metabolites inhibit neutrophil recruitment to the pleural cavity through the inhibition of the

expression of adhesion molecules on the endothelial cell wall veins [30]. Flavonoids block the migration of leukocytes to the inflammatory site by inhibiting adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1, and this regulation by TNF- α . Tsuda *et al* [31] report that the administration of cyanidin 3-O- β -glucoside inhibits inflammation induced by zymosan. Also, treatment with cyanidin 3-O- β -glucoside, reduced the increase in concentrations of NO, TNF- α , IL-1 β , and CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1). Moreover, cyanidin 3-O- β -glucoside normalises levels of several acute phase proteins including α 2 -macroglobulin, albumin, and transferrin [32].

Flavonoids inhibit leukocyte migration by blocking their adhesion to the vascular wall. This effect is due to inhibition of the synthesis of IL-1 and TNF- α , the major inducers of the expression of adhesive molecules on the vascular wall [33]. It has been reported indeed that quercetin blocks adhesion of leukocytes to the endothelial wall of the umbilical veins by inhibiting the expression of ICAM-1 [34]. Gallic acid in turn inhibits leukocyte migration by inhibiting the molecules VCAM-1 adhesion, ICAM-1 and E-selectin in vascular endothelial cells, this inhibition is due to inhibition of IL-1, TNF- α and NF- κ B [35]. In meningitis cytokines such as TNF- α and IL1 cause accumulation of leukocytes in the liquid cerebro-spinal which may cause neurological damage. Taking these data together, the methanol extract of the leaves of *M. deserti* likely exerts its anti-pleuritic effect by reducing the production of inflammatory mediators involved in the development stage of the acute inflammatory response induced by the λ -carrageenan and by the inhibition of leukocyte recruitment to the pleural cavity by exerting anti-chemoattractant effects.

Analgesic activity (writhing Test)

This test consists of checking the inhibitory action of the MeOH extract of plant on pain induced in rats by intraperitoneal (ip) injection of a dilute solution of acetic acid (writhing test). Abdominal contractions induced by injection of acetic acid were used to evaluate the analgesic effect of the plant. Table 6 shows the effects of the paracetamol, and the MeOH extract on the number of writhes induced by the injection of acetic acid (1%).

Table 6 Analgesic effect of the methanol extract on the abdominal contractions induced in rats by injection of acetic acid

Groups	Dose (mg/Kg)	Contractions number	Inhibition percentage
Witness	/	23.4 \pm 2.88	-
Extract	400	5.14 \pm 0.23***	73.29%
Paracetamol	400	5 \pm 1.58 ***	79%

Values represented as mean \pm standard deviation (n = 5).

*: P < 0.05, **: P < 0.01. ***: P < 0.001 were considered significant compared to the control (n = 5).

From these results, the MeOH extract has a very significant reduction in numbers of abdominal writhes (5.14 \pm 0.232) at a dose of 400 mg/kg bw, these results are very similar to those obtained in the group treated with paracetamol (5 \pm 1.58) at a dose of 400 mg/Kg bw. Compared with the results of other authors, it appears that the percentage of inhibition of abdominal contortions in the group treated by MeOHE plant (73.29%) is higher in the present study compared to results of [28] who found a percent inhibition (35.3%). Moreover, these results are very similar to those obtained in the group treated with paracetamol, which present a percentage inhibition (79%).

The contractions induced by i.p. of acetic acid are a method used to study peripheral analgesic effect of a substance. The pain caused by the injection of acetic acid is due to the release of serotonin, histamine, bradykinin, substance P and prostaglandins (PGE2 α , PGF-2 α). These chemical mediators stimulate peripheral nociceptive neurons induce and increased vascular permeability [1, 18]. The analgesic activity of *M. deserti* methanol extract may be due to the presence of marrubiin and its derivatives [6]. Thus the work of Stulzer *et al.* [8] on the plant *M. vulgare* "Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*" have shown the beneficial action of marrubiin against these chemical mediators which leads to an inhibition of pain.

CONCLUSION

The data obtained show that methanolic extract of *M. deserti* leaves has both anti-inflammatory and analgesic activities which may be produced by the plant inhibiting various chemical mediators including prostaglandins and bradykinins. The relatively high LD₅₀ value of 5000 mg/kg bw obtained for the plant shows that it may be safe in or non toxic to rat. The result obtained justifies the use of the plant species by traditional medicine practitioners in Algeria. However, more studies are needed to further elucidate the mechanism of the anti-inflammatory and analgesic actions of *Marrubium deserti*. It is important to note that these results were obtained in rats. It is therefore essential to carry out experiments at first in another animal model, and then in a second time in humans, to obtain confirmation of the potential of this plant.

REFERENCES

- [1] Y Chen; H Tsai; T Wu. *Planta Medica*, **1995**, 61(1), 2–8.
- [2] F Chebrouk; M Hadj-Mahammed. *Annales de la Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur*, **2009**, 1, 75-81.
- [3] H Dendougui; S Seghir; Z Belloum; F Benayache; F Leon; I Brouard; J Bermejo; Benayache S. *Rec. Nat. Prod.*, **2011**, 5(4), 300-304.
- [4] J Bellakhdar. La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *Ibis Press*, 1997; p 764.
- [5] H Edziri; M Mastouri; M Aouni; Verschaeve L. *South African Journal of Botany*, **2012**, 80, 104-109.
- [6] N Zaabat; AE Hay; S Michalet; N Darbour; C Bayet; I Skandrani; L Chekir-Ghedira; S Akkal; Dijoux-Franca, MG. *Food and Chemical Toxicology*, **2011**, doi:10.1016/j.fct.2011.08.026.
- [7] N Zaabat; N Darbour; C Bayet; S Michalet; A Doléans-Jordhem; L Chekir-Ghedira; S Akkal; Dijoux-Franca; MG. *Phytothérapie*, **2010**; DOI 10.1007/s10298-010-0589-y.
- [8] HK Stulzer; MP Tagliari; JA Zampirolo; V Cechinel-Filho; Schlemper V. *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**, 108(3), 379-84.
- [9] AB Aliyu; AM Musa; MS Abdullahi; H Ibrahim; Oyewale AO. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, **2011**, 68, 67-73.
- [10] M S Stanković. *Kragujevac J. Sci*, **2011**, 33, 63-72.
- [11] T Bahorun; B Gressier; F Trotin; C Brunete; T Dine; T Vasseur; TC Gazin; M Pinkas; M Luycky; Gazin M. *Arznein Forsch/Drug Res*, **1996**, 46, 1-6.
- [12] R Julkunen-Titto. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, **1985**, 33, 213-217.
- [13] TC Lienou; FX Etoa; B Nkegoum; CA Pieme; Dzeufiet DPD. *Afr. J. Trad. Cam*, **2007**, 4(2), 127-134.
- [14] MB Gome; K Kouakou; A Toure; Traore F. *Int. J. Biol. Chem. Sci*, **2011**, 5(5), 1777-1789.
- [15] F Amezouar; W Badri; M Hsaine; N Bourhim; Fougrach H. *Pathologie Biologie*, **2013**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.03.005>.
- [16] S Hunskaar; O Fasmer; Hole K. *Journal of Neuroscience Methods*, **1985**, 14 (1), 69–76.
- [17] A Wojdylo; J Oszmianski; Czemyers R. *Food Chem*, **2007**, 105, 940–949.
- [18] A Tjolsen; OG Berge; S Hunskaar; JH Rosland; Hole K. *Pain*, **1992**, 51(1), 5–17.
- [19] KP Nirmal; G Subhasish; Indrani C. *Int J Pharm Bio Sci*, **2013**, 4(2), 131 –143.
- [20] J Hilaly; Z Israili; Lyouss B. *J Ethnopharmacol*, **2004**, 91, 43–50.
- [21] J Ozer; M Ratnerb; M Shawc; W Bailey; Schomaker S. *Toxicology*, **2008**, 245, 194-205. DOI: 10.1016/J.TOX.2007.11.021
- [22] AA Elberry; FM Harraz; SA Ghareib; AA Nagy; SA Gabr; MI Suliaman; Abdel-Sattar E. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, **2010**, 001, 247-254.
- [23] J Ferreira; D Luthria; T Sasaki; Heyerick A. *Molecules*, **2010**, 15(5), 3135–3170.
- [24] A Tapas; D Sakarkar; Kakde R. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2008**, 7 (3), 1089–1099.
- [25] H Sandhar; B Kumar; S Prasher; P Tiwari; M Salhan; Sharma P. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **2011**, 1, 24–41.
- [26] S Sahpaz; N Garbacki; M Tits; Bailleul F. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, 79(3), 389–392.
- [27] N Ghedadba; H Bousselsela; L Hambaba; S Benbia; Mouloud Y. *Phytothérapie*, **2014**, 12, 15-24.
- [28] PM Kanyonga; MA Faouzi; B Meddah; M Mpona; EM Essassi; Cherrah Y. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2011**, 3(1), 199-204.
- [29] S Cuzzocrea; B Zingarelli; P Hake; AL Salzman; Szabo C. *Free Radic Biol Med*, **1998**, 24(3), 450-459.
- [30] EJR Middleton; C Kandaswami; Heoradies TC. *Pharmacol Rev*, **2000**, 52, 673-751.
- [31] T Tsuda; F Horio; Osawa T. *Journal of Nutrition Science Vitaminol*, **2002**, 48, 305-310.
- [32] JB Calixto; MM Campos; MF Otuki; Santos AR. *Planta Med*, **2004**, 70(2), 93-103.
- [33] Kj Cho; CH Yun; DY Yoon; YS Cho; G Rimbach; L Packer; Chung AS. *Toxicol Appl Pharmacol*, **2000**, 168, 64-71.
- [34] S Anné; M Agarwal; MP Nair; SA Schwartz; M Ballow; C Kandaswami; Middleton E. *J Allergy Clin Immunol*, **1994**, 93, 276.
- [35] M Takatoshi; K Noriaki; H Tadashi; S Yusuke; N Yoshinori; Ichiro TTK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **1999**, 19, 1412-1420.



جامعة العلوم و التكنولوجيا و الطب
Université des Sciences de Technologie et de Médecine



First International Symposium on Biology and Development

"Cibd2013"

Nouakchott, Mauritania, December 24 – 26, 2013

Attestation

Le comité scientifique du Congrès International de « **Biologie et Développement** » atteste que **Sidi Mohamed ould Mokhtar** a présenté avec les auteurs suivants :

Nabil Ghedadba, Nassima Fercha, Leila Hambaba, Ammar Ayachi & Aberkane M C

une communication orale, dans la session de « **Santé & Nutrition** » audit congrès, intitulée : (**Etude des extraits de Marrubium vulgare L. et évaluation de leurs activités biologiques**).

Cette attestation est délivrée, à la demande de l'intéressé, pour servir et valoir ce que de droit.

Nouakchott, 26 décembre 2013

Pour le Comité Scientifique

Ammar

