

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 5491 قالة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Département : Biologie

Spécialité/Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'effet Pro-oxydant du *Marrubium vulgare* chez
le Rat *In Vitro***

Présenté par :

- COUBAGEAT Abdel-Hakim
- IBRAHIM BICHARA Hadjar
- RAID Mahdjoub

Devant le jury composé de :

Président :	M. Hemic AHMED	MCB	Université de Guelma
Examineur :	M^{me}. Asma BRAIK SERIDI	MCB	Université de Guelma
Encadreur :	M^{me}. Nadia H. BOUSSENANE	MCB	Université de Guelma

Juin 2023

Remerciements

En premier lieu, nous remercions notre seigneur « Allah », qui par sa volonté a rendu possible la réalisation de notre travail, en nous accordant la force, le courage et la persévérance d'aller jusqu'au bout de notre projet.

Nous remercions tous les enseignants de l'université qui ont contribué à notre apprentissage durant la totalité de notre cursus universitaire à travers le partage de connaissance et la disponibilité avant, durant et après les cours.

Nos sincères remerciements aux membres du jury Monsieur **HEMICI Ahmed** et Madame **Asma BRAIK** de nous accorder de leur précieux temps dans le but d'assister et d'évaluer notre travail. Veuillez agréer l'expression de notre profonde gratitude.

Nous tenons à profiter de cette occasion pour exprimer notre profonde gratitude à Madame **BOUSSENANE**, pour son suivi et son encadrement. Son expertise dans le domaine de la recherche, son soutien constant, son dévouement, et sa passion pour la recherche ont été essentiels à la réalisation de notre travail. Tout au long de notre collaboration, elle a été une source inépuisable de connaissance, de conseils éclairés et d'encouragements. Son mentorat a été bien plus qu'une simple supervision académique.

Nous sommes également reconnaissants envers tout le personnel administratif de l'université, spécifiquement le personnel du laboratoire Madame **Ratiba** et Monsieur **Mehdi**, qui ont contribué à la réalisation de notre travail en toute sérénité.

Merci à tous

Dédicace

A ma très chère mère

Maman, tu as été la source de ma force et de ma détermination. Tu as toujours cru en moi. Tu as été ma plus grande admiratrice tout au long de ce parcours. Ce mémoire est le reflet de ton amour maternel inébranlable et de ton soutien indéfectible.

A mon cher père

Papa, tu es mon modèle et ma source d'inspiration. Ta persévérance et ton dévouement envers l'éducation m'ont montré la voie à suivre. Merci pour tes conseils sages et ton soutien.

A mon oncle Abdou

Aujourd'hui je souhaite t'adresser une dédicace. Tes conseils éclairés et ton soutien ont été des éléments essentiels de ma réussite académique

A mon grand frère Mahamat

Tu m'as toujours encouragé à poursuivre mes rêves à viser l'excellence et à ne jamais abandonné. Au-delà de ton rôle de grand frère, tu es devenu un véritable mentor pour moi. Ta sagesse, tes expériences ont été une source d'inspiration constante.

A mes sœurs

Afrah et Macka mes sœurs bien-aimées, votre soutien et encouragements sont inestimable. Je suis fier de vous avoirs comme sœurs

A mes frères

Djiddou, Abdou et Abdelhakim vous avez été mes plus grands supporters et mes alliés fidèles.

A mes tantes

Meriam, Aïcha, Sittador, Awatif, Kaltouma... vos conseils avisés et votre soutien moral ont été mes éléments clés de ma réussite. ***Vous avez été mes guides bienveillants.***

A mes collaborateurs

Je tiens à vous adresser une dédicace spéciale pour toutes vos collaborations.

Hakim, depuis le début, tu as été un collaborateur d'étude engagé fiables et pleins d'idées innovatrices. Ta perspicacité a grandement contribué à la qualité de notre travail. Notre

échange constant d'idées, nos discussions passionnés et notre approche collaboratives ont été des éléments clés de notre réussite.

IBRAHIM BICHARA Hadjar

Dédicace

Grâce à l'aide d'Allah, le tout-puissant

Ce travail est achevé, je le dédie à toute

Personnes qu'on aime

À mon père et ma mère :

L'honneur de ce travail revient à mes très.

Chers Parents pour leur affection, leurs sacrifices et

Encouragements pendant ma formation et que Dieu

Le protège et les gardes en bonne santé.

À mes frères seif edin et donia

À mon collègue hakim

À tous mes amis khaled, ibrahim, akrem, Abdallah, etc.

À tous les enseignants qui nous suivies au long de

Mon cursus universitaire.

À tous ceux qui nous aidé et contribué à ma

formation.

À toutes les personnes qui m'ont vraiment

Soutenu et aidé même de loin ; vous êtes une

Source de force pour moi.

À toute la promotion biochimie appliquée (2022-2023).

Raid Mahdjoub

DÉDICACE

Je dédie ce travail, à ma famille, qui durant mon parcours n'ont jamais cessé de croire en moi et de me pousser à faire face à tous les problèmes.

Spéciale dédicace à mon cher père M. COUBAGEAT Toure,

Ma très chère maman Mme OURO-AKPO Rafa,

Ma maman Mme TRAORE Sirina.

Mes sœurs Rachida, Shahrazad et Sadjida.

Mon frère : Abdel-Aziz.

Comme il est dit « Loin des yeux, mais près du cœur ». Vous comptez énormément pour moi.

Je m'en vais également remercier mes collègues Raid et Ibrahim qui ont été d'un soutien et plus que des collaborateurs durant la réalisation de ce travail. Merci pour tout.

Également, Merci à tous mes amis de la résidence pour lesquels j'ai une profonde gratitude au vu des années passés ensemble, des moments de joie et des problèmes affrontés avec leur aide en tant que représentant des étudiants étrangers. Mes respects.

La liste est longue et les mots manquent. Puisse Allah remercier toutes ces personnes qui apporte cet assaisonnement qui redonne goût à ma vie. Je vous aime énormément.

Abdel-Hakim COUBAGEAT

RESUME

L'objectif principal de notre travail de recherche était d'évaluer la capacité pro-oxydante *in vitro* du *Marrubium vulgare*, qui est une plante de la famille des lamiacées et est largement utilisée dans la médecine traditionnelle de bon nombre de pays.

Le travail expérimental s'est basé sur une extraction hydro-méthanolique, suivie d'une étape de screening phytochimique puis du dosage des marqueurs du stress oxydatif dans les tissus hépatiques de rats de laboratoire *in vitro*.

Un rendement de l'ordre de 10,04% a été obtenu suite à l'extraction hydro-méthanolique, du *Marrubium vulgare*. Le screening phytochimique a montré la présence des alcaloïdes, flavonoïdes, tannins, saponosides et des mucilages. Cependant, les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes ont donné respectivement $120,128 \pm 1,350557$ μg EAG/ mg d'extrait et $3,047 \pm 0,042$ μg EQ /mg d'extrait.

D'autre part, les dosages réalisés pour mesurer l'activité prooxydante du *M. vulgare* à travers des marqueurs du stress oxydatif, dans les tissus hépatiques de rats, ont montré une diminution hautement significative du taux de GSH, accompagné d'une diminution de l'activité de la catalase et d'une augmentation du taux du MDA dans les tissus hépatiques.

Les résultats sont en accord avec l'effet prooxydant espéré du *M. vulgare*, fournissant également des informations utiles à connaître avant son utilisation dans le traitement de diverses affections, liées ou non au stress oxydant et dans les recherches futuristes, surtout dans la lutte contre le cancer.

Mots clefs : *Marubium vulgare* – effet prooxydant – foie – rat – *in vitro* – cancer.

ABSTRACT

The main objective of our research work was to evaluate the *in vitro* pro-oxidant capacity of *Marrubium vulgare*, which is a plant of the Lamiaceae family and is widely used in traditional medicine in many countries.

The experimental work was based on a hydro-methanolic extraction, followed by a phytochemical screening step and then the assay of oxidative stress markers in the liver tissues of laboratory rats *in vitro*.

A yield of around 10.04% was obtained after the hydro-methanolic extraction of *Marrubium vulgare*. Phytochemical screening showed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, saponosides and mucilages. However, the contents of total polyphenols and flavonoids respectively gave $120.128 \pm 1.350557 \mu\text{g EAG/mg}$ of extract and $3.047 \pm 0.042 \mu\text{g EQ/mg}$ of extract .

On the other hand, the assays carried out to measure the prooxidant activity of *M. vulgare* through markers of oxidative stress in the liver tissues of rats, showed a highly significant decrease in the level of GSH, accompanied by a decrease in the catalase activity and also increased MDA levels in liver tissue.

The results are in agreement with the expected prooxidant effect of *M. vulgare*, also providing useful information to know before its use in the treatment of various disease related or not to oxidative stress and in futuristic research, especially in the fight against cancer.

Keywords : *Marrubium vulgare* - prooxidant effect - liver - rat - *in vitro* – cancer

ملخص

كان الهدف الرئيسي من عملنا البحثي هو تقييم القدرة المؤيدة للأكسدة في المختبر من *Marrubium vulgare* ، وهو نبات من عائلة Lamiaceae ويستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي في العديد من البلدان.

اعتمد العمل التجريبي على الاستخلاص المائي الميثاني ، متبوعاً بخطوة فحص كيميائي نباتي ثم اختبار علامات الإجهاد التأكسدي في أنسجة الكبد لجرذان المختبر في المختبر.

تم الحصول على محصول يبلغ حوالي 10.04% بعد الاستخراج المائي الميثاني من *Marrubium vulgare*. أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود قلويدات وفلافونويد وعفص وصابونوسيدات وصمغ. ومع ذلك ، أعطت محتويات مجموع البوليفينول والفلافونويد على التوالي 120.128 ± 1.350557 ميكروغرام EAG / ملغ من المستخلص و 0.042 ± 3.047 ميكروغرام EQ / ملغ من المستخلص

من ناحية أخرى، أظهرت الفحوصات التي تم إجراؤها لقياس نشاط بروكسيدانت M. فولجاري من خلال علامات الإجهاد التأكسدي في أنسجة الكبد لدى الفئران ، انخفاضاً كبيراً في مستوى GSH ، مصحوباً بانخفاض في نشاط I catalase و زيادة مستويات MDA في أنسجة الكبد.

تتفق النتائج مع التأثير prooxidant المتوقع لـ *M. vulgare* ، كما توفر معلومات مفيدة يجب معرفتها قبل استخدامها في علاج الحالات المختلفة المتعلقة بالإجهاد التأكسدي أو عدمه وفي الأبحاث المستقبلية، لا سيما في مكافحة السرطان.

الكلمات المفتاحية: ماروبيوم فولغار - تأثير مؤكسد-كبد-جرذ-في المختبر-سرطان.

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Sommaire

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Introduction.....	1

CHAPITRE I *Marrubium vulgare*

I.1. Généralité.....	3
I.2. Description du <i>Marrubium vulgare</i>	3
I.2.1. Le nom vernaculaire.....	4
I.2.2 Taxonomie.....	4
I.2.3. Classification botanique.....	4
I.3. Propriétés et utilisation.....	5
I.3.1. Utilisations du marrube blanc.....	5
I.3.1.1. En cosmétique.....	5
I.3.1.2. En médecine.....	5
I.3.1.3. Utilisation traditionnelle.....	6
I.4. Composition chimique (Aspect phytochimique)	6
I.4.1. Les métabolites primaires.....	6
I.4.1.1. Glucides.....	6
I.4.1.2. Les pectines.....	7
I.4.1.3. Les mucilages.....	7

I.4.1.4. Les protéines.....	7
I.4.1.5. Les lipides.....	7
I.4.2. Les métabolites secondaires.....	7
I.4.2.1. Les flavonoïdes.....	8
I.4.2.2. Sesquiterpènes.....	8
I.4.2.3. Diterpènes.....	9
I.4.2.4. Triterpènes.....	9
I.4.2.5. Tanins spécifiques des Lamiacées.....	9
I.4.2.6. Huiles essentielles.....	9
I.5. Propriétés pharmacologiques.....	9
I.5.1. Activité antioxydante.....	10
I.5.2. Activités hépatoprotectrices.....	11
I.5.3. Activité antiproliférative.....	11
I.5.4. Activité anti-inflammatoire.....	11
I.5.5. Activité immunomodulatrice.....	12
I.6. Toxicité.....	12

Chapitre II Le stress oxydatif

II.1. Le stress oxydant.....	13
II.2. Les radicaux libres.....	14
II.2.1 Les radicaux primaires.....	14
II.2.2 Les radicaux secondaires.....	15
II.3. L'origines des radicaux libres.....	15
II.4. Les types de radicaux libres et leurs actions.....	15
II.4.1. Les espèces radicalaires.....	15
II.4.1.1. L'anion superoxyde (O_2^-).....	15

II.4.1.2. Le Radical hydroxyle (HO [•]).....	16
II.4.1.3. L'hydroperoxyde (HO ₂ [•]).....	16
II.4.2. Les espèces non radicalaires.....	16
II.4.2.1. Le Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	16
II.4.2.2. Le Peroxynitrite (ONOO ⁻).....	17
II.4.2.3. L'oxygène singlet (¹ O ₂).....	17
II.4.2. Le mécanisme de production des (ERO).....	18
II.5. Les principales cibles biologiques des (ERO).....	18
II.5.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN.....	20
II.5.2. Les protéines.....	21
II.5.3. Les lipides membranaires.....	22
II.5.4. L'Oxydation des glucides.....	23
II.6. Les systèmes de défense antioxydants.....	24
II.6.1. Le Système antioxydant enzymatique.....	25
II.6.1.1. Le Superoxyde Dismutase (SOD)	25
II.6.1.2. La Catalase.....	25
II.6.1.3 Le Glutathion Peroxydase (GPx)	26
II.6.2. Le Système de défense non enzymatique.....	26
II.6.2.1. Les Vitamines E ou tocophérol.....	27
II.6.2.2. Les Vitamines C.....	27
II.6.2.3. Les Caroténoïdes.....	27
II.6.2.4. Glutathion (GSH).....	27
II.6.2.5. Polyphénols.....	28
II.7. Stress oxydatif et pathologies humaines.....	29

Chapitre III Matériel et méthodes

III.1. Matériels.....	30
III.1.1. Matériel biologique.....	30
III.1.1.1. Matériel végétal.....	30
III.1.1.2. Les animaux.....	31
III.1.2. Matériel non biologique.....	31
III.2. Méthodes.....	31
III.2.1. Méthodes d'extraction.....	31
III.2.1.1. Préparation des extraits hydro-méthanoïques.....	33
III.2.1.2. Extraction du foie des souris.....	34
III.3.1. Screening phytochimique.....	34
III.3.1.1. Alcaloïdes.....	34
III.3.1.2. Tanin.....	35
III.3.1.3. Flavonoïdes.....	35
III.3.1.4. Saponosides.....	35
III.3.1.5. Composés réducteurs.....	35
III.3.1.6. Oses et holosides.....	35
III.3.1.7. Mucilages.....	35
III.3.2. Dosage calorimétrique.....	36
III.3.2.1. Dosage des polyphénols.....	36
III.3.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	36
III.3.3. Préparation de la fraction cytosolique des cellules hépatique.....	36
III.3.3.1. Dosage des protéines cytosoliques par la méthode de Bradford.....	37
III.3.3.2. Mesure du taux du Malon dialdéhyde mitochondrial (MDA).....	37

III.3.3.3. Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH)	38
III.3.3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase.....	39

Chapitre IV Résultats et discussion

IV.1. Rendement de l'extraction.....	41
VI.2. Analyse qualitative.....	42
VI.2.1. Screening phytochimique.....	43
VI.3. Analyse Quantitative.....	43
VI.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	45
VI.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	46
VI.3.3. Dosage des protéines totaux.....	47
VI.3.4. Dosage du MDA (Malondialdehyde).....	48
VI.3.5. Dosage du GSH.....	49
VI.3.6. Dosage de l'activité de la catalase.....	51
Conclusion.....	52
Références bibliographiques.....	53

Liste des figures

Figure 1 : <i>Marrubium vulgare</i> (variété cultivée)	3
Figure 2 : Aspect morphologique du <i>Marrubium vulgare</i>	4
Figure 3 : structure moléculaire de la marrubiine contenue dans le <i>M. vulgare</i> L.....	6
Figure 4 : Structure d'un flavonoïde isolée du <i>Marrubium vulgare</i> et quelques dérivées.....	8
Figure 5 : Stress oxydant.....	13
Figure 6 : Représentation d'un radical libre.....	14
Figure 7 : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde.....	18
Figure 8 : Cascade de production des principales ERO : en orange ERO non radicalaires et en jaune ERO radicalaires	19
Figure 9 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	20
Figure 10 : les réactions d'oxydations des protéines.....	21
Figure 11 : Processus de la peroxydation lipidique.....	22
Figure 12 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation »	23
Figure 13 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène.....	23
Figure 14 : Système de défense antioxydant (Enzymatique et non-enzymatique)	24
Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la glutathion peroxydase.....	26
Figure 16 : Elimination des radicaux libres par la vitamine E, la vitamine C et le glutathion.....	27
Figure 17 : les antioxydants primaires et secondaires.....	28
Figure 18 : Les maladies humaines liées au stress oxydatif.....	30
Figure 19 : Les feuilles du <i>Marrubium vulgare</i>	30
Figure 20 : Le rat de laboratoire utilisé.....	30

Figure 21 : Les différentes étapes de la préparation de l'extrait brut du <i>Marrubium vulgare</i>	33
Figure 22 : Extraction du foie de rat.....	34
Figure 23 : Rendement de l'extraction du <i>Marrubium vulgare</i>	40
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols totaux.....	44
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	45
Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines totaux.....	46
Figure 27 : Variation du taux de MDA dans le cytosol après l'ajout de différent concentration de l'extrait du <i>M. vulgare</i> et ceux des blancs sans l'extrait du <i>M vulgare</i>	47
Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la GSH.....	48
Figure 29 : Variation des taux de GSH dans le cytosol après l'ajout de différentes concentrations de l'extrait du <i>Marrubium</i>	49
Figure 30 : Variation de l'activité de la catalase moyenne dans le cytosol après ajout des différentes concentrations de l'extrait.....	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets biologiques des biomolécules du *Marrubium vulgare*. Biomolécules et Fonctions.....**12**

Tableau 2 : Principales ERO radicalaires et non-radicalaires.....**17**

Tableau 3 : Résultats du screening phytochimique de l'extrait du *Marrubium vulgare*.....**43**

Liste des abréviations

µg /ml : Microgramme par millilitre

µl : Microlitre

AA : Acide ascorbique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNn : Acide Désoxyribonucléique du noyau

ADNm : Acide Desoxyribonucléique de la mitochondrie

APG III : Angiospermes Phylogénétiques III

ARN : Acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

BHA: Butylated hydroxyanisole

BHT : Butylated hydroxytoluene

CAT : Catalase

CHCl₃ : Chloroforme

CCI : Cholangiocarcinome Intra hépatique

Cl - : Ion chlore

COOH : Groupement carboxyle

CoQ10 : Coenzyme Q10

COX : Cyclooxygénase

DO : Densité optique

DPPH : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

E AA : Equivalent acide ascorbique

EAG : Equivalent d'acide gallique

EOA : Espèces oxygénées actives

ERO : Espèces réactives oxygénées

EX : Extraits

FCR : Folin-Ciocalteu

Fe³⁺ : Ion ferrique

Fe²⁺ : Ion ferreux

g : Gramme

GGPP : Géranylgéranylpyrophosphate

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxide

H⁺ : Proton

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

HO• : Radical hydroxyle

HOCl: Acide hypochlorique

IC50 : Concentration d'inhibition de 50%

KH₂PO₄ : Phosphate de potassium monobasique

LDL : Lipoprotéines de densité légère

LOOH : Hydroperoxyde lipidique

MDA : Malondialdéhyde

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

N₂O₃: Trioxyde d'azote

Na_2SO_4 : Sulfate de sodium

NaCl : Chlorure de Sodium

NH_2 : le groupe amine

nm : Nanomètre

NO_2 : Dioxyde d'azote

O_2 : Oxygène.

ONOOH: Nitroperoxyde

PPM: PhosPhoMolybdate

SH: Groupement sulfhydryle

SOD: Superoxyde dismutase

TCA : Acide trichloroacétique

Introduction

INTRODUCTION

L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement des maladies remonte à des milliers d'années. De nombreuses cultures à travers le monde ont exploité les propriétés curatives de diverses espèces végétales. Parmi ces plantes médicinales, le *Marrubium vulgare* a gagné en popularité en raison de ses propriétés thérapeutiques potentielles.

En effet, cette plante appartenant à la famille des Lamiacées, est largement répandue dans les régions méditerranéennes à l'instar de l'Algérie. Elle a longtemps été utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter diverses affections telles que la toux, le rhume....

Cependant, la biochimie offre un cadre d'analyse précis, permettant d'étudier les composés chimiques présents dans les plantes médicinales et comprendre leurs effets sur la santé humaine. L'effet prooxydant d'une plante médicinale, tel que le *Marrubium Vulgare*, est un aspect important à explorer, car il peut avoir des implications significatives lors de son utilisation thérapeutique.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules produites naturellement dans les organismes vivants, jouant un rôle crucial dans divers processus physiologiques. Tout déséquilibre entre la production de ROS et les systèmes de défense antioxydants est susceptible d'entraîner un stress oxydatif, qui est souvent impliqué dans le développement de nombreuses maladies, y compris les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et surtout le cancer.

Toutefois, certaines plantes médicinales sont connues pour leur capacité à générer des ROS, ce qui peut sembler contradictoire avec leurs effets bénéfiques supposés. Assurément, il est essentiel de comprendre les mécanismes chimiques moléculaires des plantes et l'implication fonctionnelle de l'effet pro-oxydant, afin d'évaluer l'utilisation sûre et efficace de ces plantes dans le contexte médical. Dans cette étude, nous nous intéresserons spécifiquement à l'effet prooxydant du *Marrubium vulgare in vitro*.

Nous chercherons à évaluer la capacité de cette plante à générer des espèces réactives de l'oxygène et éventuellement à comprendre les mécanismes moléculaires qui y sont associés.

Une meilleure compréhension de l'effet prooxydant du *Marrubium vulgare* pourrait contribuer à son utilisation rationnelle dans le développement de nouvelles thérapies ou de compléments alimentaires. En combinant les connaissances en biochimie, et en biologie cellulaire, cette étude visera à apporter des éclaircissements sur les potentiels effets prooxydants du *Marrubium vulgare in vitro*, contribuant ainsi à une meilleure compréhension de son potentiel thérapeutique et de son utilisation médicinale. Nous avons ciblé le cytosol du tissu hépatique du fait que le foie est l'organe le plus exposé au stress

oxydatif et son cytosol représente une meilleure source d'enzymes antioxydantes. Notre recherche est réalisée sur le rat *Wistar in vitro*.

Dans la première partie, nous élaborerons une synthèse bibliographique sur le *M. vulgare* et le stress oxydant. Ensuite, nous développerons le matériel et les méthodes analytiques utilisés pour l'extraction, le rendement, le screening phytochimique. En second lieu, nous évaluerons l'activité prooxydante à travers les marqueurs du stress oxydatif puis nous présenterons les résultats obtenus accompagnés d'une discussion.

A la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche seront exposées faisant appel à la phytothérapie futuriste du *Marrubium vulgare*.

Chapitre I

Le Marrubium vulgare

I.1. Généralité

Le *Marrubium vulgare* ou marrube blanc est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen et utilisé pour ses vertus thérapeutiques (**Djahra et al., 2013**).

Le *Marrubium* est une plante utilisée en médecine populaire de plusieurs pays. De nombreuses recherches ont montré qu'il est utilisé pour le traitement de diverses maladies, en exemple, il est utilisé comme remède pour l'asthme et le diabète. (**Bouterfas et al., 2018**).

La plante dégage une odeur de thym. Elle est officinale depuis Hippocrate (**Schauenberg et Paris., 2005**).

L'habitat naturel du Marrube blanc est associé aux bords de chemins, près et terrains vagues. Il est lié à des sols légers, peu humides, fortement calcaires (**Bouterfas et al., 2014**).

I.2. Description du *Marrubium vulgare*

Le Marrube blanc (appelé communément "Marrioua" en Algérie), est une espèce de la famille des Lamiaceae. Elle est vivace ligneuse de 30 à 80 cm à tiges érigées et rigides. Les feuilles vert blanchâtre sont arrondies, faiblement dentées et tomenteuses. Les fleurs sont blanches, en verticilles denses disposés le long des tiges. La plante dégage une odeur de thym. Elle est officinale depuis Hippocrate (**Schauenberg et Paris., 2005**).

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., 2014**). Le *Marrubium vulgare* fleurit à partir d'avril à octobre, généralement tôt au printemps, aisément foré par des abeilles pour le nectar (**Stritzke., 1975 ; Weiss et al., 2012**).



Figure 1 : *Marrubium vulgare* (Lefrançois., 2007)

I.2.1. Le nom vernaculaire

En Algérie : Elle est connue par le nom de Marrioua (**Quezel et Santa., 1963**)

Au Maroc : c'est Merrîw (**Novak et al., 1966**),

En Tunisie : Marroubia (**Bellakhdar., 1997**),

En français : Marrube blanc

En Anglais : Horehound,

I.2.2. 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 est appartient à l'ordre des Lamiales, qui font partie des Angiospermes (plante à fleurs) Phanérogames (plante à graines) dicotylédones (**Hannebelle et al., 2007**).

I.2.3. Classification botanique

Selon [APG III].

Règne : Végétale

Sous règne : Plantes vasculaire

Embranchement : Spermatophytes

Division : Magnoliophytes

Classe : Magnolipsides

Sous classe : Astérides

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Marrubium*

Espèce : *vulgare*

Nom binomial : *Marrubium vulgare*



Figure 2 : Aspect morphologique du *M. vulgare* (**Köhler-s Medizinal-Pflanzen-224**).

I.3. Propriétés et utilisation

Parties utilisées : Feuilles et sommités fleuries

Mode d'utilisation : Infusion, décoction, cataplasmes.

Les Navajos administraient une décoction de racines aux mères avant et après l'accouchement. La marrubiine étant insoluble dans l'eau, on emploie de préférence la teinture (13-25 gouttes, 4 fois par jour). (Weel *et al.*, 1999 ; Boutabia., 2020).

I.3.1. Utilisations du marrube blanc

I.3.1.1. En cosmétique

La plante est utilisée en cosmétologie traditionnelle pour sa richesse en saponines, la décoction, en rinçage sur les cheveux, les embellis et les cataplasmes de la plante opposés sur les taches de rousseur et les éclaircit (Belakhdar., 1997 ; Ait youcef., 2006).

I.3.1.2. En médecine

I.3.1.2.1. Action contre la fièvre

Les recherches sur son action contre la fièvre typhoïde ont montré que la plante avait le pouvoir de faire baisser la fièvre tout en améliorant l'état général et en abrégant la maladie. La présence d'une substance antibiotique est possible (Lieutaghi., 1996). La plante hachée est couramment utilisée en cataplasme sur le front et les tempes contre la fièvre (Belakhdar., 1997). De plus l'infusion chaude aide à faire baisser la fièvre (Bremness., 2005).

I.3.1.2.2. Action contre la Malaria

Le marrube blanc est proposé aussi contre la malaria (Bremness., 2005).

I.3.1.2.3. Action contre la bronchite

Les vertus du marrube sont les plus intéressantes en pratique courante et ce sont elles qui méritent ici le plus de place. Depuis un temps immémorial, on prescrit cette plante dans les affections des voies respiratoires et les praticiens contemporains ont rendu justice aux vieux expérimentateurs dont le champ était souvent le seul laboratoire. Dans la bronchite et la trachéite (Lieutaghi., 2004).

I.3.1.3. Utilisation traditionnelle

Le marrube blanc est prescrit dans le traitement des difficultés respiratoires, des bronchites, des bronchectasies, des bronchites asthmatiformes des toux sèches et de la coqueluche. Il fluidifie les mucosités. La décoction est employée comme antidiabétique (Bellakhdar., 1997).

Le *Marrubium vulgare* est indiqué pour les dermatoses, eczéma chronique, hystérie (Valnet., 1983).

I.4. Composition chimique (Aspect phytochimique)

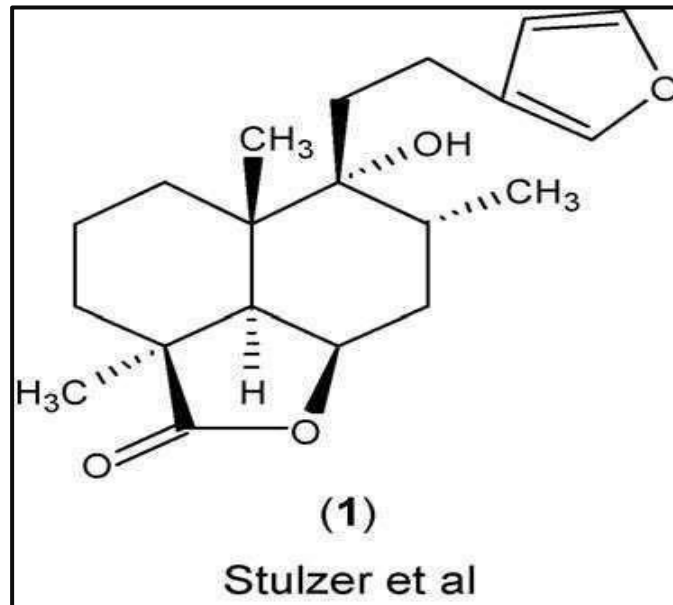


Figure 3 : structures moléculaire de la marrubiine contenus *M. vulgare* L (Stulzer *et al.*, 2006).

(1) : Marrubiine

Dans la composition biochimique du *Marrubium vulgare*, il existe deux 2 grands groupes de métabolites

I.4.1. Les métabolites primaires

Ce sont des molécules utiles à la vie des végétaux, ce type de métabolites présentent une activité pharmacologique de base (les lipides, l'amidon, les enzymes ainsi que les glucides à titre d'exemple la cellulose) (Grenez., 2019). Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule.

I.4.1.1. Les glucides

Les glucides (hydrate de carbone), sont des composants organiques, ils participent à la structure de la paroi cellulaire et ils sont responsable du processus de photosynthèse, ces composés sont transformés et mise en réserve dans les plantes sous forme d'amidon. Le *Marrubium vulgare* contient un certain nombre de glucides.

I.4.1.2. Les pectines

Les pectines sont des polymères de polysaccharides acides. Les pectines sont composées d'une chaîne principale d'acide uranique lié en (1- 4). Régulièrement entre ces monomères s'intercalent des molécules de rhamnoses par les liaisons (1-2) et (1-4) 1.2 (Boudjerda et al.,

2010). La pectine est une molécule très abondante dans les plantes. Dans le *Marrubium vulgare* on en trouve 2%. Elle est aussi une molécule relativement stable, résistante à des températures de plus de 100°C, mais elle est dans la nature dégradée par des enzymes pectine lyases produits par des microbes ou champignons (Boubsi., 2019).

I.4.1.3. Les mucilages

Un mucilage est une substance végétale constituée de polysaccharides, gonfle au contact de l'eau et produit une substance visqueuse semblable à la gélatine. La quantité du mucilage dans la plante *Marrubium vulgare* est moins abondante (Madar et Shomer., 1990).

I.4.1.4. Les protéines

Les protéines sont des polymères composés par un enchainement d'acide aminés, reliés par des liaisons peptidiques entre le groupe amine NH₂ et le groupement carboxyle COOH de deux acides aminés.

I.4.1.5. Les lipides

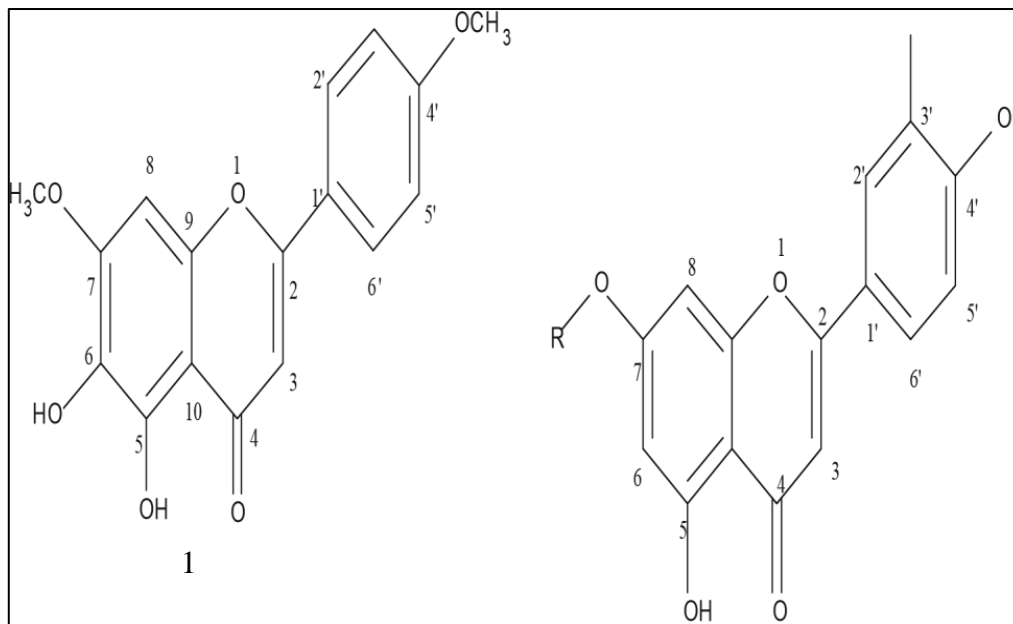
Les lipides sont des substances hydrophobe, soluble dans les solvants organiques apolaires ou peu polaire, ces composés non volatils, sont retrouvés sous le nom des huiles fixes. Il y'a plusieurs types des lipides : Les lipides simples et des lipides complexes (Leroux., 2014).

I.4.2. Les métabolites secondaires

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* (Ashkenazy et al., 1983) au regard des données bibliographiques ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que : les flavonoïdes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les tanins.

I.4.2.1. Les flavonoïdes

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, lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique (Nawwar et al., 1989 ; Wolski et al., 2007).



2 R = Glucose

3 R=Glucuronic acid

Figure 4 : Structure d'un flavonoïde isolée du *M. vulgare* et quelques dérivées
(Pukalskas.,2012)

- (1) Flavonoïde isolé du *M. vulgare* : 5,6-dihydroxy-7,4-diméthoxyflavone ;
- (2) 7-O-b-glucopyranosyl lutéolin ;
- (5) 7-O-b-glucuronyl lutéolin.

(Alkhatib et al., 2010 et 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).

I.4.2.2. Sesquiterpènes

Ce sont des hydrocarbures de formule $C_{15}H_{24}$, soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes vrais (en $C_{10}H_{16}$). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques. (Bruneton., 1987).

I.4.2.3. Diterpènes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2E, 6E, 10E-géranylgéranylpyrophosphate (GGPP). On dénombre plus de 1200 produits

diterpéniques répartis en une centaine de squelettes. On les rencontre dans certains insectes et divers organismes marins, ils sont surtout répandus chez les végétaux particulièrement dans les espèces des familles Lamiacées, Astéracées et Fabacées. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, tricycliques ou tétracycliques (**Dey et Harborne., 1991, Bruneton., 1999**).

I.4.2.4. Triterpènes

Ces composés en C₃₀ sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être aliphatique, tétracycliques ou pentacycliques. Composés aliphatiques : le squalène, surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans l'insaponifiable d'huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire dans la biogenèse des triterpènes cycliques et des stéroïdes.

I.4.2.4. Tanins spécifiques des Lamiacées

Dérivés de l'acide hydroxycinnamique : acide caféique, acide chlorogénique, acide pcomarique (**Wojdylo et al., 2007**). Il existe deux grands types de tanins :

Les tanins hydrolysables

Et les tanins condensés

I.4.2.5. Les huiles essentielles : limonène, sabinène, α -pinène, camphène, para-cymène, ...

Le *Marrubium vulgare* est une plante riche en principes actifs 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**).

Tableau 1 : Effets biologiques des biomolécules du *Marrubium vulgare*. Biomolécules et Fonctions (**Ghedadba N., 2018**).

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

I.5. Propriétés pharmacologiques

I.5.1. Activité antioxydante

Le déséquilibre des processus homéostatiques entre les oxydants et les antioxydants dans le corps, qui est causé par les radicaux libres, entraîne un stress oxydatif. Le stress oxydatif est considéré comme la principale cause du vieillissement et d'une grande variété de maladies humaines, telles que les cancers, le diabète, les troubles neurodégénératifs, la polyarthrite rhumatoïde, etc. (Mbah., 2019).

Les propriétés antioxydantes in vitro des extraits de méthanol de *M. vulgare* ont été déterminées à l'aide d'un test de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et les résultats ont révélé une forte activité avec une valeur de concentration inhibitrice semi-maximale (IC 50) de 8,24 –12,42 µg/ml (Yousefi *et al.*, 2016 ; Ghedadba., 2016).

I.5.2. Activités hépatoprotectrices

L'étude de l'effet hépatoprotecteur et thérapeutique de l'extrait éthanol-eau (70 :30, v / v) et des extraits d'éther de pétrole sur la toxicité des cellules hépatiques induite par le CCl₄ chez la souris a montré que les paramètres des fonctions hépatique et rénale restaient à des niveaux normaux dans les groupes traités. Avec des extraits de *M. vulgare*. L'administration d'extraits éthanologiques de *M. vulgare* a significativement amélioré l'activité SOD (superoxyde dismutase) et CAT (catalase), ainsi que la capacité antioxydante totale, avec une réduction significative de la concentration de peroxyde lipidique lorsque les extraits étaient utilisés comme agents protecteurs ou thérapeutiques (Faten *et al.*, 2014). Le *Marrubium vulgare* a révélé un très important pouvoir d'hépatoprotection (Akther *et al.*, 2013)

I.5.3. Activité antiproliférative

Le *M. vulgare* est souvent utilisé traditionnellement dans le traitement du cancer (Bourhia *et al.*, 2019), mais les mécanismes d'action exacts et la validité scientifique de leur utilisation restent à découvrir. (Zarai *et al.*, 2011) ont rapporté la capacité de l'huile essentielle de *M. vulgare* à inhiber la prolifération des lignées cellulaires du cancer du col de l'utérus avec une valeur IC₅₀ de 0,258 µg/mL. Les extraits éthanol-eau de *M. vulgare* (70 :30, v / v) ont réduit la viabilité du mélanome (B₁₆) et du gliome (U₂₅₁) de manière dose-dépendante. En démontrant la capacité des extraits de *M. vulgare* à inhiber la prolifération, induire l'apoptose et l'autophagie cryoprotectrice, les résultats suggèrent que cette plante pourrait être un bon candidat pour la thérapie anti-mélanome et anti-gliome (Paunovic., 2016).

I.5.4. Activité anti-inflammatoire

L'étude de l'effet anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de *M. vulgare* sur l'infarctus du myocarde induit par l'isoprotérénol dans un modèle de rat a montré que la créatinine kinase-MB sérique était diminuée de 52,2 à 69,0% (selon la dose d'extrait de *M. vulgare*). De plus, le traitement avec des extraits a réduit de manière significative l'activité de la myélopéroxydase myocardique dans l'infarctus du myocarde (**Rameshrad., 2012 ;Yousefi., 2014**).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a montré que l'administration orale d'extrait méthanolique de *M. vulgare* à la dose de 200 mg/kg chez des rats traités à la carraghénine provoque une diminution significative (87,30%) de l'inflammation par rapport au contrôle positif standard (diclofénac), qui a montré une protection de 85,52 % dans ce test (**Ghedadba., 2016**).

I.5.5. Activité immunomodulatrice

L'effet immunomodulateur de différentes concentrations d'extraits aqueux de *M. vulgare* (100, 500 et 1000 mg/kg de poids corporel) a été évalué comme agent curatif chez des souris préalablement infectées par *Salmonella typhimurium* et comme agent protecteur chez des souris infestées par *S. typhimurium* (**Ajedi et al., 2018**). Selon ces résultats, la concentration la plus faible de *M. vulgare* (100 mg/kg de poids corporel) a montré un effet immunomodulateur élevé au niveau des lymphocytes T doublement positifs, de l'interleukine (17AIL-17) et de l'interféron gamma (IFN- γ)

I.6. Toxicité

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il y a une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie (**Aouadhi., 2010**).

Chapitre II

Le stress oxydatif

II.1. Le stress oxydant

Le « Stress » est un terme général qui a d'abord été employé dans un contexte biologique par l'endocrinologue Hans Selye en 1936 pour décrire la réponse physiologique inadéquate d'un organisme, humain ou animal, à tout besoin mental, émotionnel, ou des exigences physiques, réelles ou imaginaires de cet organisme (**Schiavone *et al.*, 2013**).

Naturellement, il existe dans la cellule des Espèces réactives de l'oxygène ERO à des doses raisonnables, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (**Migdal et Serres., 2011**).

Dans des conditions physiologiques, la production de ces espèces oxygénées activées EOA est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense de notre organisme ainsi, la balance antioxydants/pro-oxydants est dite en équilibre. (**Haleng *et al.*, 2007**).

Cependant cette homéostasie rédox peut être rompue, soit par une production excessive d'EOA (comme dans le vieillissement ou l'athérosclérose), soit par une diminution des capacités antioxydantes (comme chez les personnes souffrant d'obésité et les fumeurs). On parle alors de stress oxydant (**Migdal et Serres., 2011**).

Lorsqu'un éventuel déséquilibre intervient (**figure 5**.) par surproduction de composés prooxydants ou par déficit en substances antioxydantes, on parle alors de stress oxydatif ou stress oxydant (**Favier., 2003**).

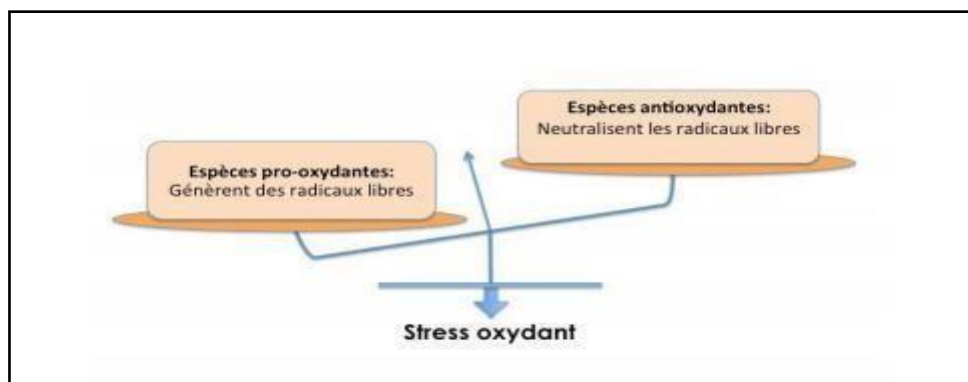


Figure 5 : Stress oxydant (**Baraka-vidot., 2014**).

Ce déséquilibre peut être provoqué de façon régulée par l'activation de systèmes de production d'ERO. La réponse antioxydante est alors efficace pour compenser cette production et le déséquilibre est transitoire. En revanche, dans certaines situations pathologiques (cancer), la production d'ERO est plus importante et prolongée, et la réponse antioxydante insuffisante. Le

déséquilibre est durable (Carrière *et al.*, 2006). Un tel déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (Bensakhria., 2018).

II.2. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. (Afonso., 2007)

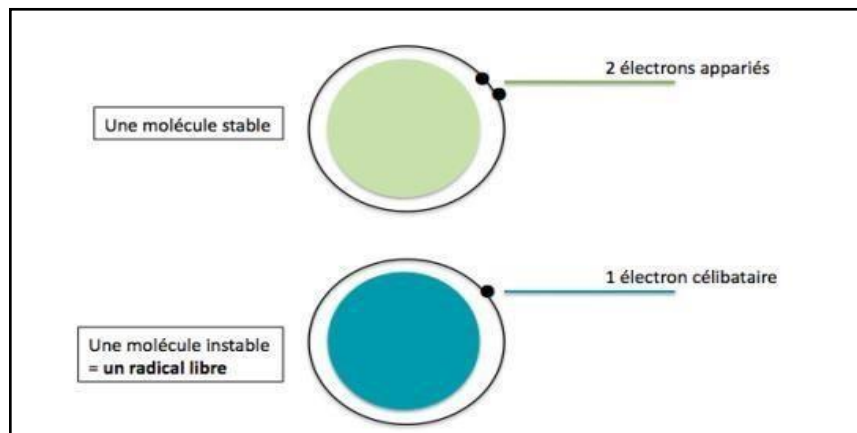


Figure 6 : Représentation d'un radical libre (Durand., 2018)

Actuellement, les radicaux les plus fréquents comprennent des espèces comme le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), le superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) et l'oxyde nitrique (NO) ainsi que d'autres molécules non radicalaires qui, sans électrons appariés supplémentaires, peuvent conduire à la formation de radicaux libres. C'est le cas par exemple pour le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl) et l'oxygène singulet (O_2) (Lykkesfeldt et Svendsen., 2007).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, on décèle deux grands groupes (Favier., 2003) :

II.2.1. Les radicaux primaires

Ils dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron à l'instar de l'anion superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$, le radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$; ou dérivent de l'azote tel le monoxyde d'azote $\text{NO}\cdot$;

II.2.2. Les radicaux secondaires

Ils se forment par réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites : **Espèces actives de l'oxygène**

Comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ce ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

II.3. Origines des radicaux libres

À l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolestants, l'oxygène (ou dioxygène, O₂) est indispensable à la production d'énergie par de nombreuses formes de vie (animaux, plantes, bactéries). Cette production d'énergie (sous forme d'ATP) appelée phosphorylation oxydative se fait notamment par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons présentes dans la membrane interne des mitochondries (**Mazat et Ransac., 2010**).

Le principal processus endogène de production d'ERO ou de radicaux libres *in vivo* est la respiration cellulaire (la chaîne respiratoire mitochondriale) (**Yu., 1994**). Ainsi, les peroxysomes, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération des ERO (**Barouki et Morel., 2001**).

II.4. Types de radicaux libres et leurs actions

II.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène

L'appellation espèces oxygénées réactives inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, etc...) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que (le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote, l'oxygène singulet et l'hypochlorite) (**Bartosz., 2003**).

Les ERO peuvent être produites dans tout type cellulaire, elles sont classées en deux groupes d'espèces :

II.4.1. Les espèces réactives radicalaires

II.4.1.1. Anion superoxyde (O₂^{•-})

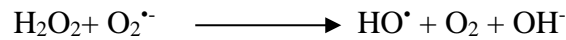
La formation de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) est un processus physiologique à la base de l'obtention des autres radicaux libres et par voie de conséquence à la formation en cascade de tous les autres oxydants (**Thomas, et al 1988; Sheng et al., 2014**).

Possédant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, L'anion superoxyde est une ERO primaire, qui est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques (**Gardès-Albert et al., 2005**). Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (**Abreu et al., 2010 ; Gardès-Albert et al., 2005**).

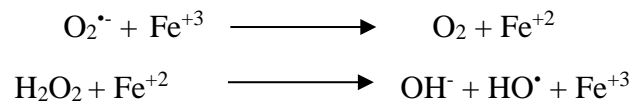
II.4.1.2. Radical Hydroxyle (HO·)

Il s'agit du radical le plus actif réagissant avec un très grand nombre de cibles moléculaires *in vivo*. (Tessier *et al.*, 1995; Gardes *et al.*, 2006; Buonocore *et al.*, 2010).

Il est généré par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde via la réaction d'Haber-Weiss, engendrant ainsi, un ion OH⁻ inoffensif et un radical hydroxyle HO· (Comhair et Erzurum., 2002) :



Il s'agit d'une réaction lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais, en présence de métaux de transition tels que : (le fer, le cuivre) l'H₂O₂ donne naissance (*in vivo*) via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO· hautement réactif (Goldstein *et al.*, 1994) :

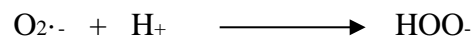


Le radical hydroxyle à une demi-vie extrêmement courte et une capacité à diffuser réduite, il est capable de réagir très rapidement avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaires (Demarchez., 2012; Delattre., 2005), il transforme la molécule cible en radical libre très réactif. Ce radical nouvellement formé peut alors interagir avec d'autres molécules cibles déclenchant ainsi des réactions en chaîne. Les réactions en chaîne représentent l'un des plus grands dangers du radical OH·. En revanche, l'H₂O₂ et l'O₂^{·-} ne sont pas suffisamment réactifs pour déclencher des réactions en chaîne (Lau *et al.*, 2008; Aprioku., 2013).

Le radical hydroxyle apparaît comme l'oxydant le plus puissant, et représente l'élément majeur dans la cytotoxicité des radicaux libres (Guetteridge., 1993; Jamdade., 2022).

II.4.1.3. Le Radical hydroperoxyde (HO₂·)

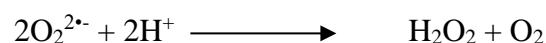
En milieu acide, l'anion superoxyde (O₂^{·-}) se protone pour former le radical hydroperoxyde qui est un radical beaucoup plus réactif que le superoxyde (O₂^{·-}) (Bielski *et al.*, 1983).



II.4.2. Les espèces non radicalaires

II.4.2.1. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La principale production de H₂O₂ résulte de la dismutation de l'O₂^{·-} par la superoxyde dismutase selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires. Il est possible qu'il soit éliminé en O_2 et H_2O par l'action de la catalase soit par action directe après interaction avec certaines biomolécules, soit par action indirecte en étant le précurseur des radicaux hydroxyles OH^\bullet . (Bensakhria., 2018).

II.4.2.2. Peroxynitrite ($ONOO^-$)

La réaction du Monoxyde d'azote (NO) avec le superoxyde $O_2^{\bullet-}$ entraîne la formation de l'ion peroxynitrite ($ONOO^-$) selon la réaction : $NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$ (Bensakhria., 2018).

Il s'agit d'une espèce oxydante à courte durée de vie qui est un puissant inducteur de la mort cellulaire (Szabó., 2007).

II.4.2.3. L'oxygène singulet (1O_2)

Il s'agit de la forme « excitée » de l'oxygène moléculaire. Formé en moindre quantité que les oxy-radicaux, il est produit lors de la peroxydation lipidique, et suite à l'action des rayons ultraviolets sur le dioxygène. L'oxygène singulet est très instable et extrêmement réactif avec une durée de vie très limitée. Au contact des molécules de son environnement, notamment les molécules d'eau, l'oxygène singulet se désactive en libérant de l'énergie. (Favier., 2003). **Tableau 2 :** Principales ERO radicalaires et non-radicalaires (Favier., 2003)

Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	
Radicalaire	Non radicalaire
- Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- Hydroxyle (OH^\bullet)	- Acide hypochlorique ($HOCl$)
- Hydroperoxyde (HO_2^\bullet)	- Ozone (O_3)
- Peroxyle (RO_2^\bullet)	- Oxygène singulet (1O_2)
- Alkoxyde (RO^\bullet)	- Hydroperoxyde ($ROOH$)
- Dioxyde de carbone ($CO_2^{\bullet-}$)	- Peroxynitrite ($ONOO^-$)

II.4.2. Mécanisme de production des (ERO)

Les ERO sont principalement produits au niveau du complexe I ou III. L' $O_2^{\cdot-}$ est également produit par de nombreuses enzymes tels que (la monoamine oxydase, la cytochrome P450 enzyme) situées au niveau de la membrane externe ou interne de la mitochondrie. (Finkel., 2011)

L'oxygène élément indispensable pour notre survie à travers son rôle dans la respiration cellulaire et dans le métabolisme énergétique, demeure l'élément duquel dérive la majorité des ERO. (Koechlin *et al.*, 2006)

En effet, au cours de la respiration cellulaire (production d'ATP), plus précisément au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, plus de 95% de l'oxygène présent est consommé au niveau du complexe IV (cytochrome C oxydase) (Tessier., 1995 ; Leeuwenburg., 2001). Durant cette étape de réduction toutefois pas parfaite, il se produit une fuite d'électrons au niveau des complexes I et III, cette fuite d'électron est à l'origine de la transformation de 2 à 3 % de l'oxygène en $O_2^{\cdot-}$ et de là à la production des autres ERO (Tessier.,1995 ; Beaudoux., 2006 ; Finkel., 2011)

L'anion superoxyde représente le chef de file des ERO. Il va conduire à travers de véritables chaînes d'oxydo-réductions, à la formation de nombreuses espèces réactives (Koechlin *et al.*, 2006 ; Fontaine., 2007)

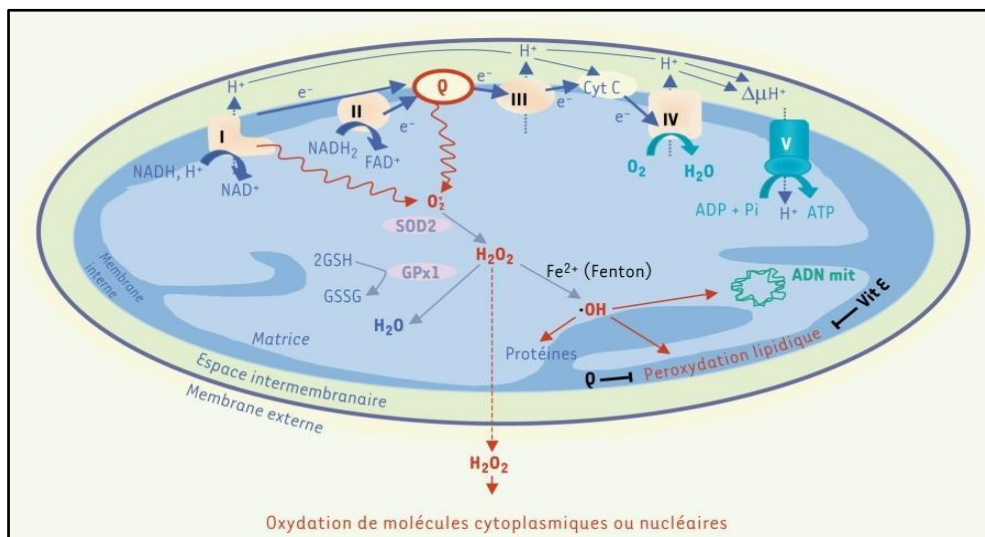


Figure 7 : Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde (Carrière *et al.*, 2006).

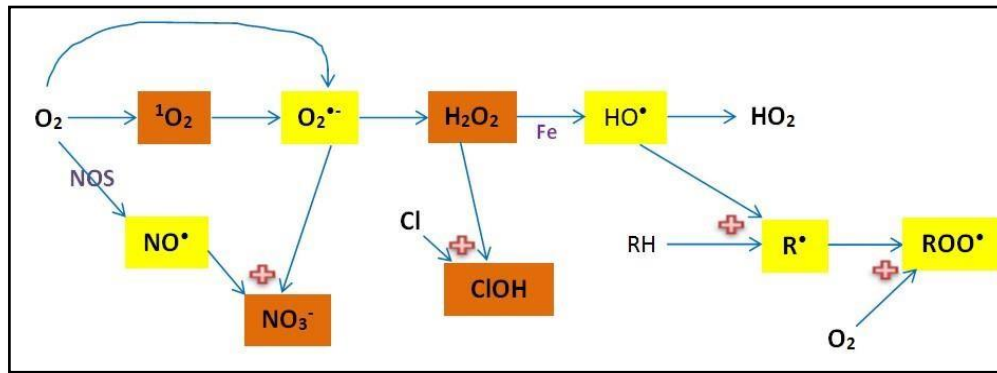


Figure 8 : Cascade de production des principales ERO : en orange ERO non radicalaires et en jaune ERO radicalaires (Favier., 1997).

II.5. Principales cibles biologiques des ERO

Lors d'un stress oxydant, les ERO non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules (fig.), notamment les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Menon., 2007). Ces espèces provoquent également des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxiques et mutagènes des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier., 2003).

II.5.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une molécule très sensible au stress oxydant. La plupart des ERO sont, en effet, capables de réagir avec l'ADN, aussi bien sur les bases azotées (puriques et pyrimidiques) que sur le ribose et le désoxyribose (Cadet., 2013).

Cependant, l'ADN mitochondrial représente la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son faible potentiel de séparation comparativement à celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources d'ERO cellulaire qui est la chaîne respiratoire mitochondriale. Le taux de bases azotées oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADNmt par rapport à l'ADNn et le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (Richter *et al.*, 1988 ; Wang *et al.*, 2005).

L'attaque radicalaire de la molécule d'ADN (fig.) peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant ainsi, un grand nombre de bases modifiées, également le stress oxydant peut attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant ainsi une coupure de chaîne simple brin (Burton et Jauniaux., 2011 ; Charbon *et al.*, 2014).

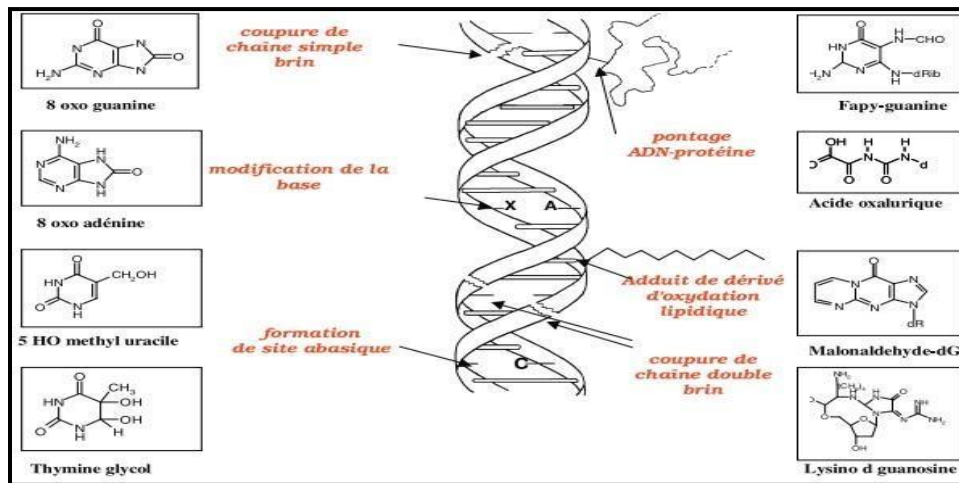


Figure 9 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier., 2003)

Ces modifications sur la molécule d'ADN peuvent avoir des conséquences telles qu'une altération de la fonction mitochondriale, la formation d'espèces mutagènes, l'activation des systèmes de réparation (Bensakhria *et al.*, 2018)

Il existe plusieurs systèmes de réparation de l'ADN. Certaines enzymes permettent la réparation directe de l'ADN. Cependant, l'efficacité de ces systèmes dépendra de plusieurs facteurs à savoir l'âge ou la typologie cellulaire. Si les dommages sont trop importants, la cellule peut entrer en apoptose et dans le cas d'un cycle de division cellulaire non contrôlée, aboutir à la formation de tumeurs cancéreuses (Lopez., 2008; Florence *et al.*, 2016).

II.5.2. Les protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des ERO. Les modifications oxydatives des protéines provoquent l'introduction d'un groupement carbonyle dans la protéine (formation de protéines carbonylées « PC ») (Levine., 2002).

Ces réactions d'oxydation sont fréquemment influencées par les métaux de transition (Bloomer *et al.*, 2004).

Il s'ensuit plusieurs types de modifications : fragmentation de la protéine, oxydation des chaînes latérales des acides aminés et formation de liaisons croisées entre deux protéines (Bonnefont Rousselot *et al.*, 2001).

Le rôle des protéines dans la cellule est tel que leur dysfonctionnement peut bouleverser le fonctionnement cellulaire (enzymes et protéines structurales) (Delattre *et al.*, 2005).

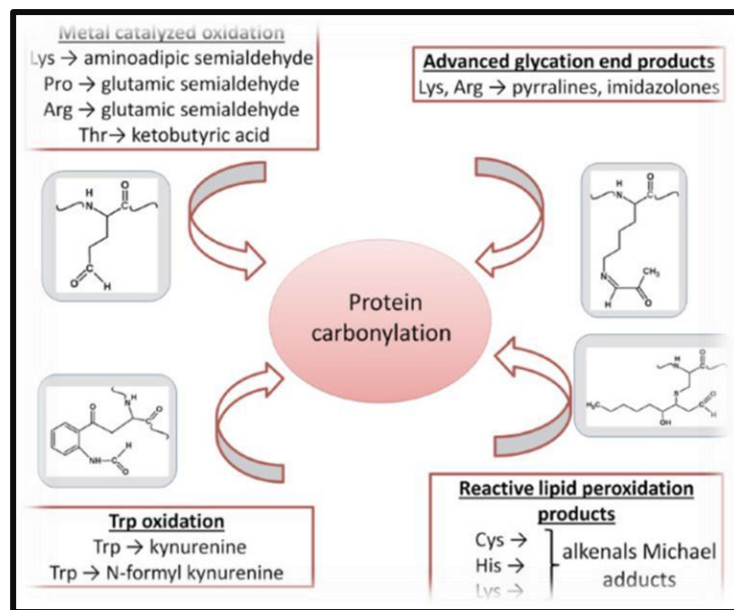


Figure 10 : les réactions d'oxydations des protéines (Ouznadji *et al.*, 2020).

II.5.3. Les lipides membranaires

Les lipides membranaires sont les cibles les plus susceptibles à l'action des ERO et des radicaux libres à cause de la présence des lipides insaturés ; l'acide linoléique et l'acide arachidonique (Zielinski et Pratt., 2017).

L'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir d'une molécule d'acide gras polyinsaturé initie le processus de la peroxydation lipidique (Figure 11). Un atome d'hydrogène est pris d'une deuxième molécule d'acide gras polyinsaturé résultant en un nouveau radical libre (Taso *et al.*, 2019).

Ces radicaux peuvent déclencher une chaîne de réactions de peroxydation au niveau des acides gras des phospholipides membranaires, conduisant à l'altération de la membrane et la perte de l'organisation de sa structure de bicouche lipidique qui est nécessaire à la fonction des enzymes liées et des récepteurs (Gavric *et al.*, 2017).

Les ERO ainsi que la MDA et le HNE peuvent aussi oxyder les lipoprotéines de faible densité (LDL), riches en acides gras polyinsaturés causant un grand nombre de changements structuraux et fonctionnels. (Favier., 2003)

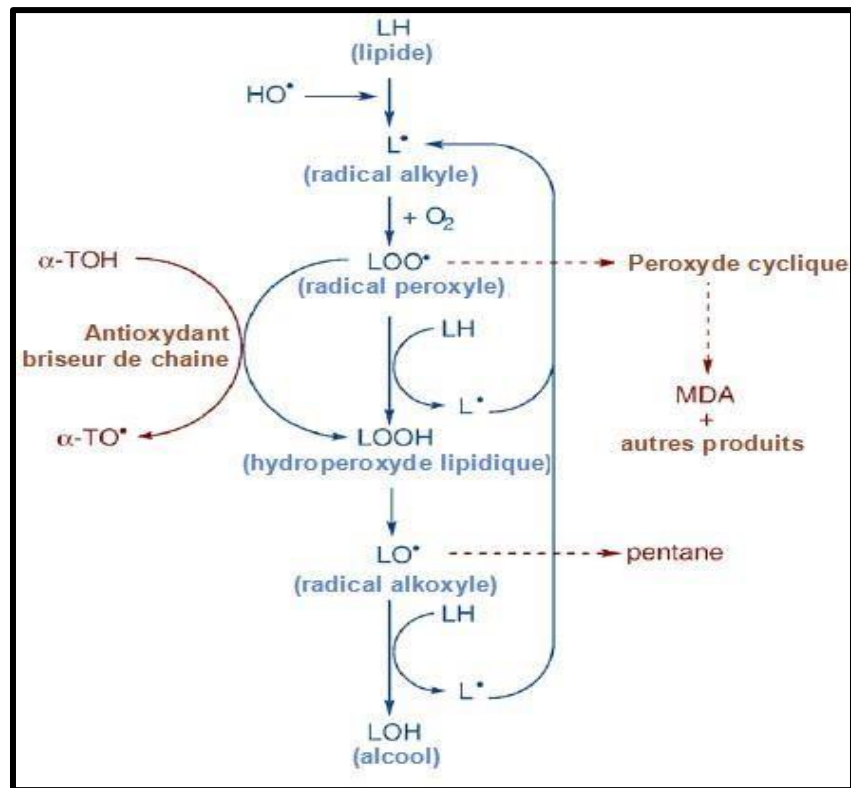


Figure 11 : Processus de la peroxydation lipidique (Gavric *et al.*, 2017).

II.5.4. Oxydation des glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycane du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles (**figure 12**) (Halliwell et Gutteridge., 2007) :

Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG (AGEs en anglais pour « *advanced glycation end-products* ») ;

Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que HO• ou NO₃⁻ pour former des PFG.

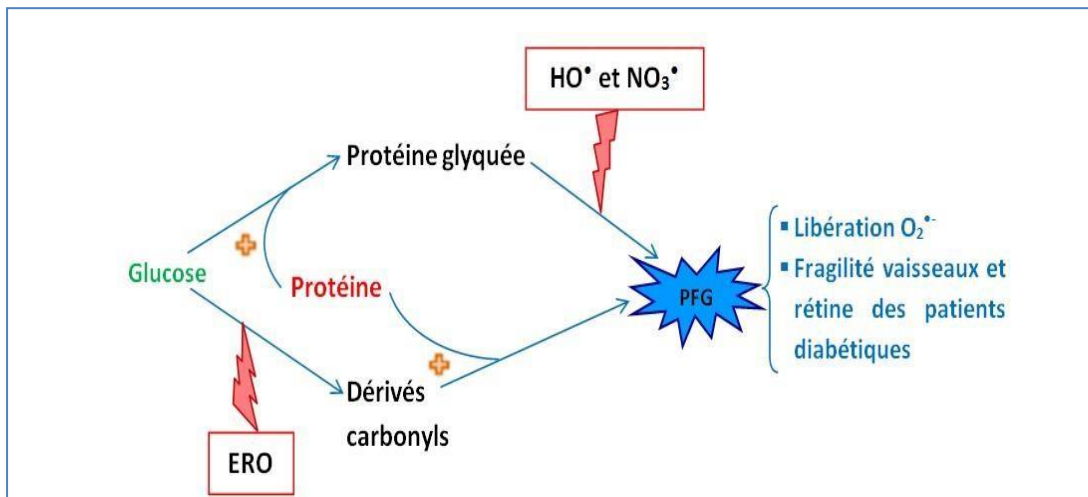


Figure 12 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation (**Halliwell et Gutteridge., 2007**).

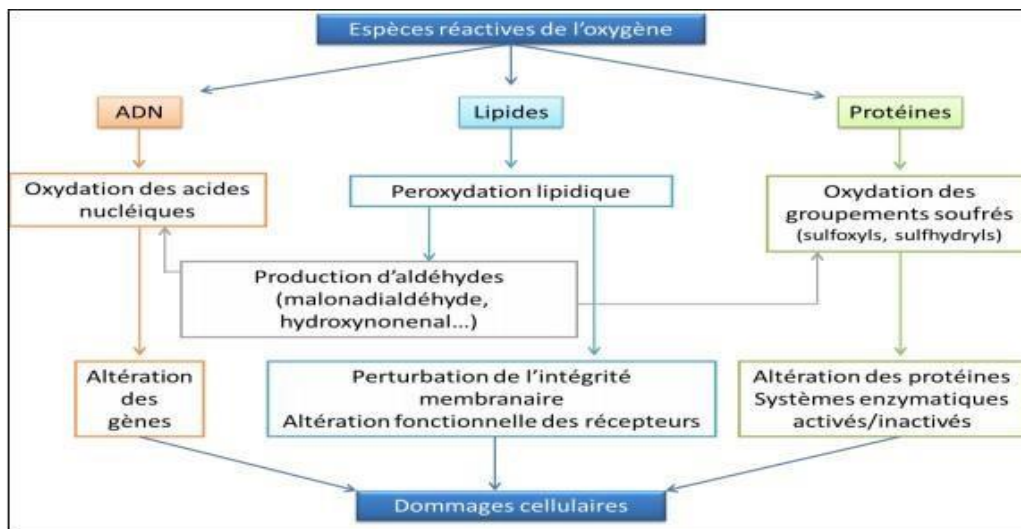


Figure 13 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (**Monteil., 2004**)

II.6. Les systèmes de défense antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (**Halliwell., 1990**). Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine (**Delattre *et al.*, 2005**).

On distingue classiquement 2 catégories d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques ; comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques et les antioxydants non enzymatiques pour lesquels nous différencierons ceux qui sont liposolubles et donc répartis dans les membranes biologiques de ceux qui sont hydrosolubles et donc plutôt répartis dans le cytosol, le milieu extracellulaire et le plasma. Les stratégies de défense vis-à-vis du stress oxydant sont variées (**figure 14**).

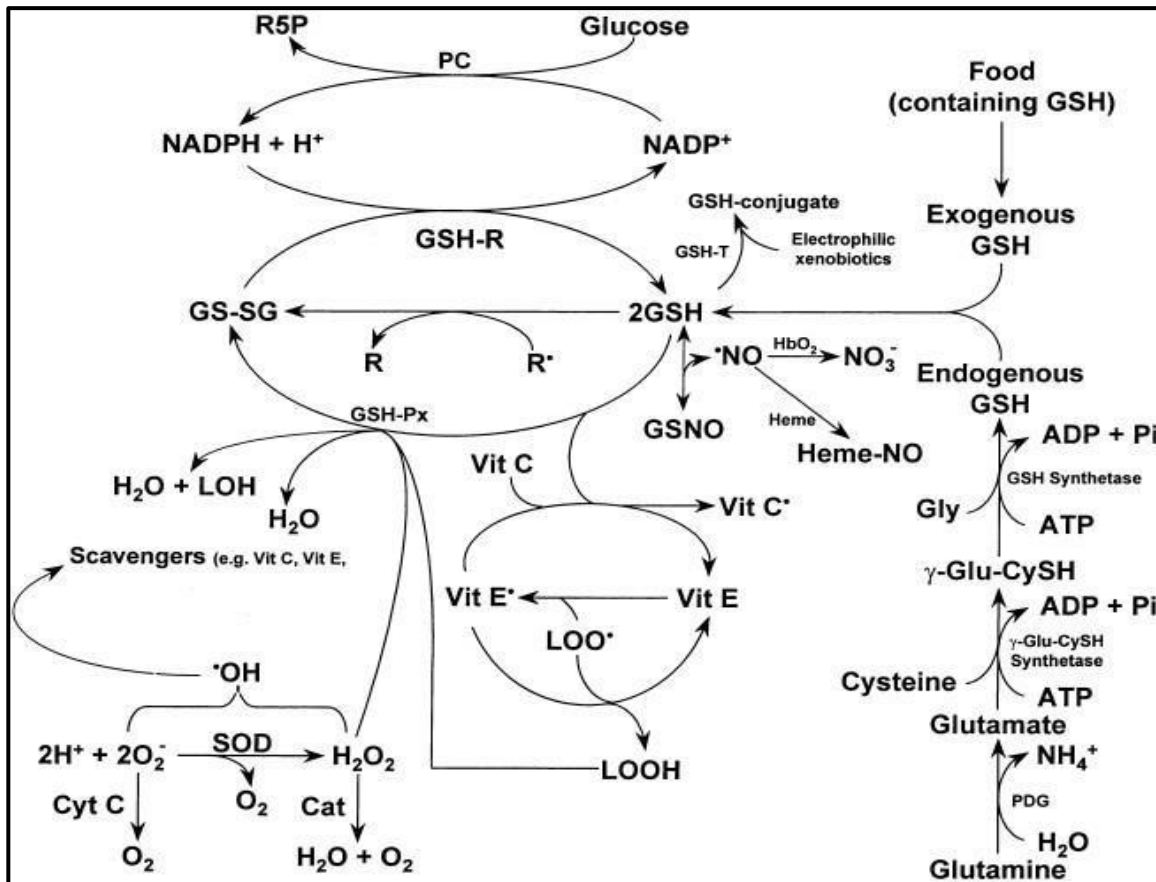


Figure 14 : Système de défense antioxydant (Enzymatique et non-enzymatique), (**Mazzetti et al., 2015**).

II.6.1. Système antioxydant enzymatique

Il s'agit des antioxydants primaires. Ce sont des enzymes antioxydantes essentielles, naturellement produites par notre organisme. Ces enzymes antioxydantes endogènes constituent notre plus puissante défense contre les radicaux libres et les réactions inflammatoires associées. (**Leverve., 2009**)

Il existe seulement 3 antioxydants primaires enzymatiques : la Superoxyde Dismutase (SOD), la Catalase (CAT), et la Glutathion Peroxydase (GPx). (**Pincemail., 2002 ; Bonnefont., 2003**)

II.6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Ils représentent une des premières lignes de défense antioxydante. Ce sont des métalloprotéines qui catalyse la dismutation mono-électronique du $O_2 \cdot^-$ en H_2O_2 selon la formule : (Afonso *et al.*, 2007).



Chez l'homme, il existe trois isoformes qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. Les trois isoformes sont les suivants :

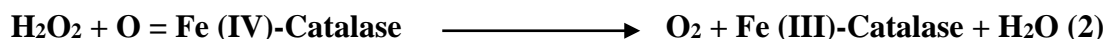
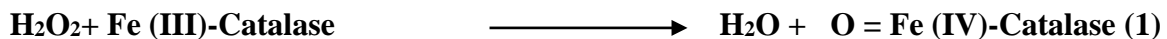
- La Cu/Zn-SOD ou SOD1 cytosolique,
- La SOD2, mitochondriale qui utilise le manganèse comme cofacteur nécessaire à l'activité enzymatique et le Zinc jouant le rôle structural et
- La EC-SOD ou SOD3 extracellulaire, utilise le cuivre comme cofacteur nécessaire à l'activité enzymatique. (Afonso *et al.*, 2007 ; Miao *et al.*, 2009 ; Leopold *et al.*, 2009).

II.6.1.2. Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène moléculaire (Ighodaro et Akinloye., 2018). Elle est présente dans de nombreux tissus et particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. Les catalases sont localisées dans les peroxysomes, cette compartimentation l'empêche d'être un accepteur pour l' H_2O_2 formé dans le cytosol et les mitochondries (Awad *et al.*, 2018).

La catalase est une enzyme hémique essentiellement présente dans les peroxysomes

(Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003) et dans les hématies. Elle catalyse la dissolution d' H_2O_2 .



II.6.1.3. Glutathion Peroxydase (GPx)

La glutathion peroxydase (GSH-Px) est une enzyme à sélénium ayant la propriété de pouvoir catalyser la réduction des hydroxy peroxydes. Elle se retrouve dans les liquides extracellulaires

ainsi que dans les cellules, au sein du cytosol et des mitochondries. Elle est constituée de 4 sous-unités contenant chacune un atome de sélénium. Il existe 5 isoformes de cette enzyme variant suivant leur localisation dans l'organisme (**Desmier., 2016**).

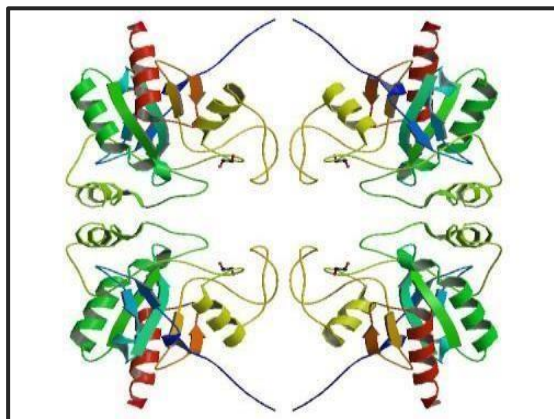


Figure 15 : Structure tridimensionnelle de la glutathion peroxydase (**Kavanag., et al., 2006**)

II.6.2. Système de défense non enzymatique

Parmi les systèmes antioxydants non enzymatiques certains sont soluble dans l'eau ce qui leur permet d'agir dans la fraction soluble de la cellule ou dans le plasma, d'autres étant liposolubles agissent au sein des membranes, tandis que les molécules amphipathiques peuvent agir dans les deux environnements (**Lenaz., 2006**)

II.6.2.1. Vitamine E ou tocophérol

La vitamine E possède quatre isomères de tocophérol, α , β , γ et δ avec une activité antioxydante variable. Elle est un antioxydant soluble dans l'eau (**Luciano et al., 2017**). Un groupe de substances connues sous le nom de vitamine E sont solubles dans les céréales et agissent comme antioxydants dans l'organisme. L'alpha-tocophérol est le nom du composé de la vitamine E le plus actif. Les principales fonctions de la vitamine E sont liées à son activité antioxydante. La vitamine E fonctionne comme un antioxydant en piégeant les radicaux libres. Elle défend contre les dommages oxydatifs les lipides (graisses) présents dans les membranes cellulaires. Les radicaux libres d'un électron sont rendus par la vitamine E, qui abaisse leur potentiel et leur réactivité (**Guillouty., 2016**).

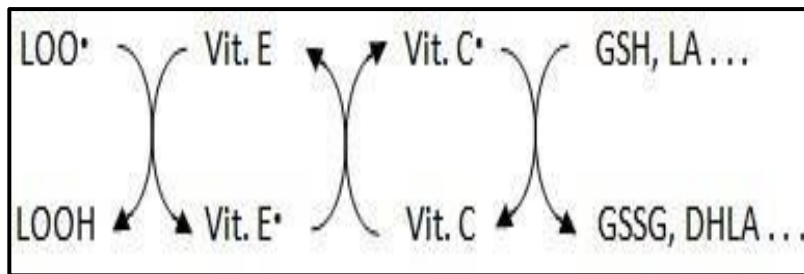


Figure 16 : Elimination des radicaux libres par la vitamine E, la vitamine C et le glutathion (Ashor *et al.*, 2016).

II.6.2.2. Vitamine C

La vitamine C ou acide L'ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman et Röhm., 2004).

La Vitamine C est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés aussi bien hautement réactifs tels que les radicaux $d'OH^\bullet$ et $d'O_2^{\bullet-}$ (Smirnoff., 2018). Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs de radicaux libres. Elle peut aussi réduire le radical α tocophérol (Xiong *et al.*, 2017). Ce qui lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (Ashor *et al.*, 2016).

II.6.2.3. Les caroténoïdes (Vitamine A)

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles jaunes, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont généralement de bons capteurs des radicaux hydroxyles et peroxydes ce qui les rend susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique (Zuluaga *et al.*, 2017).

II.6.2.4. Le glutathion (GSH)

Le glutathion, sous sa forme réduite, est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : -L-glutamyl-cystéinyl-glycine. C'est le thiol intracellulaire ubiquiste le plus abondant. Sous l'action de la GPx, il désintoxique les ERO (H_2O_2 , peroxydites, peroxydes lipidiques,) en formant du GSSG (glutathion oxydé) composé de deux molécules de GSH (Douris *et al.*, 2009). Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (mercure, arsenic, plomb,) (Meister., 1991 ; Clarkson et Thompson., 2000 ; Lyn., 2006).

Le glutathion exprimé souvent en ratio GSH/GSSH représente le tampon redox cellulaire majeure et par conséquent il constitue l'indicateur du statut redox de l'environnement cellulaire (Buonocore

et al., 2010). Le GSH est capable de régénérer la Vitamine E et la Vitamine C dans leurs formes actives (Lenaz., 2006).

II.6.2.5. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres 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

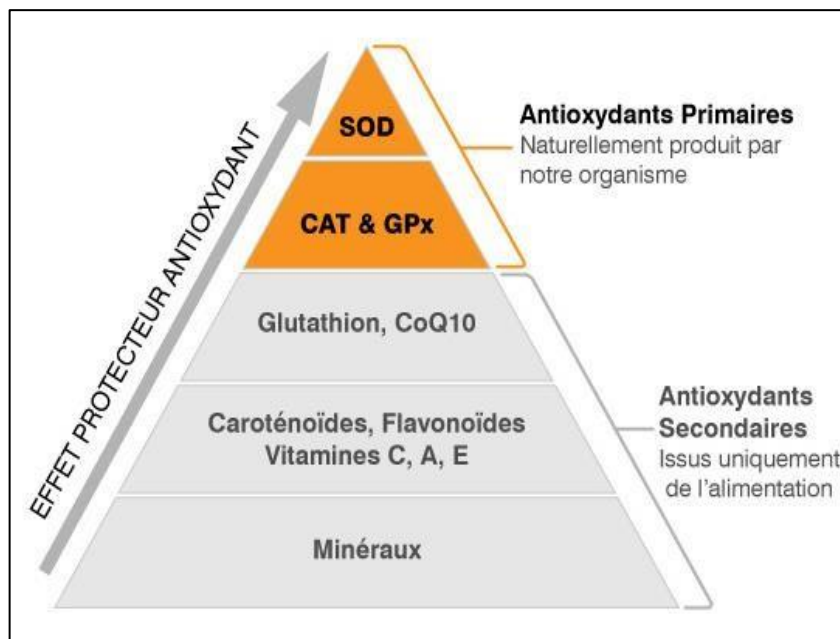


Figure 17 : les antioxydants primaires et secondaires

II.7. Stress oxydatif et pathologies humaines

De nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de différentes pathologies humaines, allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (**figure 18**). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement. De plus, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Poprac *et al.*, 2017 ; Liguori *et al.*, 2018).

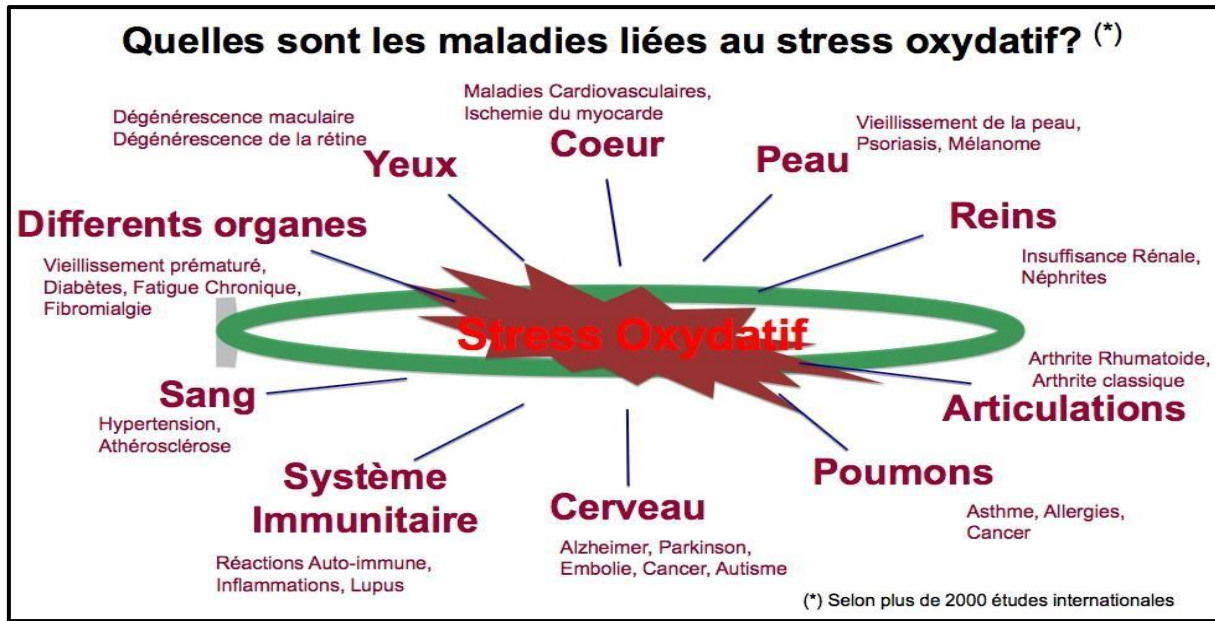


Figure 18 : Les maladies humaines liées au stress oxydatif (Charrade.,2016)

Chapitre III

Matériel et méthodes

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel biologique

III.1.1.1. Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur la partie aérienne de l'espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées : le *Marrubium vulgare*, sa taxonomie et toutes les données le concernant ont été détaillées précédemment (Cf page 3-12).

L'organe végétal choisi pour la réalisation des expérimentations de cette étude est la feuille puisque c'est à son niveau que se trouve la majorité des principales substances actives (**Hamel *et al.*, 2018; Dembélé *et al.*, 2021**).

La récolte s'est effectuée durant le mois de février 2023 dans la région de Guelma au nord-est de l'Algérie. L'échantillon a été séché à l'ombre dans un endroit sec et légèrement aéré pendant 15 jours, couvert pour éviter le développement des micro-organismes et à l'abri de la lumière et de l'humidité afin de garder l'aspect biochimique des molécules. Les feuilles ont été au préalable coupé en petits morceaux dans le but d'accélérer leur séchage.

Le matériel végétal préparé est soumis à une extraction afin d'extraire les différentes classes de composés chimiques contenues dans la plante, pour des tests phytochimiques et biologiques.



Figure 19 : Les feuilles du *Marrubium vulgare*.

III.1.1.2. Les animaux

La présente étude a été réalisée sur des rats mâles qui sont au nombre de 10 âgés de 6 à 8 semaines et dont les poids sont compris dans l'intervalle ($150 \leq P \leq 200$) g provenant tous de L'institut Pasteur d'Alger.

Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs largement utilisés dans divers domaines de la recherche expérimentale. Ces animaux ont été élevés au sein de l'animalerie de l'Université 08 mai 1945 de Guelma, Les rats étaient logés dans des cages métalliques avec un accès libre à la nourriture, à l'eau et à une température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité.



Figure 20 : Le rat de laboratoire utilisé.

III.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé comprend l'ensemble des réactifs et des produits chimiques, ainsi que des équipements, appareillages et verreries.

III.2. Méthodes

III.2.1. Méthodes d'extraction

III.2.1.1. Préparation des extraits hydro-méthanoliques

III.2.1.1.1. Broyage et conservation

Les feuilles du *Marrubium vulgare* ont été broyées, à l'aide d'un broyeur de laboratoire. Le broyat obtenu a été conservé soigneusement dans des bocaux en verre hermétiquement fermés afin de protéger les métabolites contre d'éventuelles réactions pouvant résulter à leur altération. Les bocaux ont été placés dans un endroit sec jusqu'à l'utilisation du broyat.

III.2.1.1.2. La macération

Il s'agit d'une technique qui consiste à laisser un solide dans un liquide (eau, solvant, ou mélange des solvants) pour en extraire les composés solubles.

La macération peut être considérée comme une méthode simple, rapide et efficace. Elle permet d'obtenir un rendement élevé en extrait, avec une durée d'extraction prédéfinie et raisonnable. (Pérez., 2019 ; Melecchi et al., 2002).

L'extrait hydro-méthanolique est préparé par macération (mise en contact) de 1 g de la poudre végétale dans 10 ml d'extrait hydro-méthanolique, méthanol/eau (70% : 30%) pendant 15 jours.

III.2.1.1.3. Filtration

Le macérat est récupéré dans un premier temps puis filtré dans un erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir à travers un papier filtre wattman.

III.2.1.1.4. Evaporation

Le filtrat obtenu a subi une étape de concentration sous pression réduite dans un rotavapeur de marque Buchi switzerland à 45°C. Après l'évaporation à sec, l'extrait obtenu a été conservé au congélateur à 4°C jusqu'à son utilisation.

III.2.1.1.5. Lyophilisation

Il s'agit d'une étape de déshydratation qui consiste à éliminer l'eau de l'extrait obtenu après évaporation du méthanol, laissant place à une poudre constituée de l'extrait brut du *Marrubium vulgare*.

III.2.1.1.6. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait obtenu, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.



Le broyat des feuilles du *Marrubium vulgare*



La macération du *Marrubium vulgare* dans des bocaux opaques



La filtration de l'extrait du *Marrubium vulgare*



L'évaporation du solvant à l'aide d'un rotavapeur

Figure21 : Les différentes étapes de la préparation de l'extrait brut du *Marrubium vulgare*

III.2.1.2 Extraction du foie des souris

Après sacrifice des rats, le prélèvement des organes a été fait au niveau de l'animalerie de L'université 08 mai 1945 de Guelma, Après la récupération des foies, ils ont été prélevés, lavés Dans du tampon phosphate à base de Kcl (pH=7,2 ;0.1M), pesés et puis stockés au niveau du congélateur pour les dosages des différents paramètres biochimiques et enzymatiques.

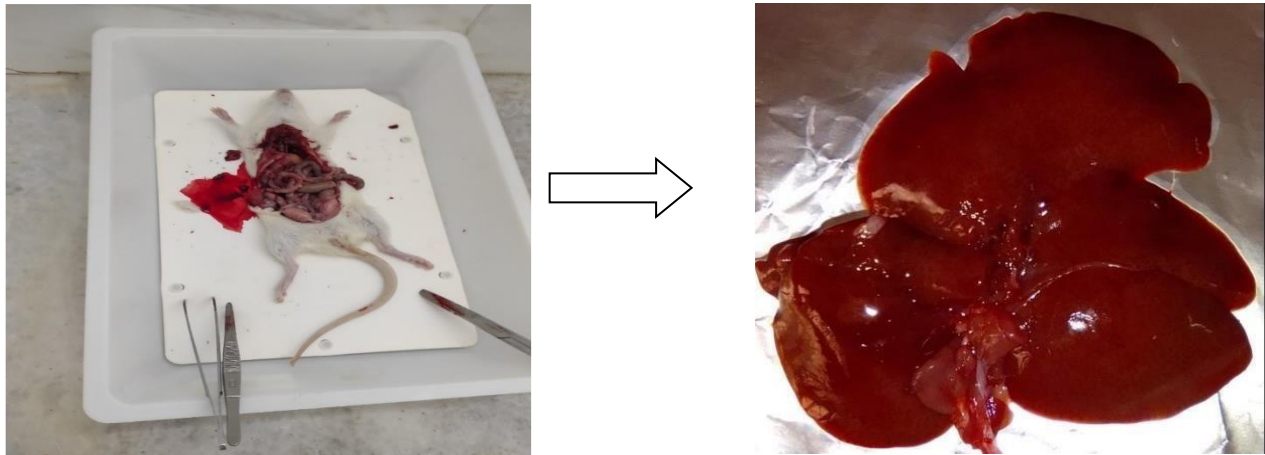


Figure 22 : Extraction du foie de rats

III.3.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de méthodes, de techniques de préparation et d'analyses des substances organiques naturelles de la plante. Ces techniques permettent de détecter la présence des produits appartenant à des classes de composés ordinairement et physiologiquement actifs qui sont les composés phénoliques.

III.3.1.1. Alcaloïdes

10 g de poudre végétale séchée ont été introduits dans un erlenmeyer de 250 ml, il a été ajouté 50 ml de H₂SO₄ à 10 %. Après agitation pendant 30 minutes, une macération fut réalisée pendant 24 heures à la température du laboratoire, puis passage à la filtration sur papier filtre. Ensuite, le filtrat est complété à 50 ml avec de l'eau distillée.

Il a été introduit 1 ml de filtrat dans un tube à essais puis on ajoute 5 gouttes de réactif de Mayer.

La présence d'alcaloïdes est indiquée par la formation d'un précipité blanc jaunâtre (**Edeoga et al., 2005**).

III.3.1.2. Tanin

Dans un Erlenmeyer, 5 g de poudre ont été dispersés dans 100 ml d'eau bouillante. Après infusion pendant 15 mn, une filtration fut réalisée, puis le filtrat fut complété à 100 ml avec de l'eau distillée. Après 5 ml d'infusé à 5 % a été introduit dans un tube à essais, puis 1 ml de solution aqueuse de FeCl_3 à 1 % fut ajouté.

En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu noir (**Edeoga et al., 2005**).

III.3.1.3. Flavonoïdes

10g de la poudre sèche ont été macérés dans 150 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, une filtration a été réalisée et le test suivant fut réalisé : Prélèvement de 10 ml du filtrat, qui a été rendu basique par l'ajout du NH_4OH à (10%) en utilisant le pH mètre.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai (**Edeoga et al., 2005**).

III.3.1.4. Saponosides

Il a été porté à ébullition 100 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 250 ml puis 1g de la poudre fut ajouté ensuite, une ébullition modérée fut maintenue pendant 15 mn. Après filtration, le filtrat a été ajusté à 100 ml. 1ml du décocté à 1 % préparé a été ajouté dans un tube à essais, le volume fut ajusté à 10ml avec de l'eau distillée. Ensuite, une agitation du tube fut réalisée.

Pour confirmer la présence de saponosides, il faudrait qu'une mousse apparaisse après avoir laissé au repos pendant 15 minutes le tube à essais (**Karumi et al., 2004**).

III.3.1.5. Composés réducteurs

5 ml de décocté aqueux à 10% a été introduit dans un bécher de 100ml, une évaporation à sec fut réalisée au bain-marie, puis ajout de 1 ml de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A et 0,5 ml de réactif B)

La présence de composés réducteurs est indiquée par la formation d'un précipité rouge brique (**Karumi et al., 2004**).

III.3.1.6. Oses et holosides

Il a été introduit 5 ml de décocté aqueux à 10% obtenu dans un bécher de 100ml, une évaporation à sec au bain-marie fut réalisée, il fut ajouté 2 à 3 gouttes de H_2SO_4 (99%) concentré et après 5 minutes, il fut additionné 03 à 04 gouttes d'éthanol.

Le développement d'une coloration rouge révèle la présence d'oses et holosides (**Karumi et al., 2004**).

III.3.1.7. Mucilages

1 ml de décocté à 10 % a été introduit dans un tube à essai et il fut ajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages (**Karumi et al., 2004**)

III.3.2. Dosage calorimétrique

III.3.2.1. Dosage des polyphénols

La teneur en composés phénoliques est estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon (**Li et al., 2007**). 1 ml de réactif de Folin (dilué 10 fois) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou de standard (préparés dans l'éthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesuré 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 µg/ml) et est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.

III.3.2.2. Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes est réalisée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**). Les échantillons sont préparés par la dissolution de 1mg (Extrait) / ml (éthanol). 1 ml de chaque échantillon est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2%, dans l'éthanol). Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la quercitrine (0-40 µg/ml) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans l'extrait. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de lyophilisat.

III.3.3. Préparation de la fraction cytosolique des cellules hépatique

Quand les foies sont prélevés, on les jette rapidement dans le tampon phosphate contenant du kcl, ils sont pesés, puis coupé en petits morceaux, avant d'être postérisé dans 9 ml du tampon phosphate (0,1M, PH=7,2). La postérisation est faite par un homogénéiseur de type Ultraturax.

L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 3700 t/mn pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant ainsi obtenu est centrifugé à 3700 t/mn pendant 45 minutes à 4°C. Le surnageant issu de cette dernière centrifugation est le cytosol qui est utilisé pour les différents dosages. (**Bruneton., 1993**)

III.3.3.1. Dosage des protéines cytosoliques par la méthode de Bradford

Le bleu de Commassie G250 se complexe avec les chaînes latérales des acides aminés basiques (Lysine, arginine, histidine) et sur les fonctions amines libres de la chaîne polypeptidique en formant

un complexe chromogène présentant un maximum d'absorption à 595nm. Il y a donc une corrélation entre la quantité de colorant formé dans une solution et la concentration en protéine.

Il s'agit d'une méthode relative puisque l'on réalise d'abord une gamme d'étalon à partir de quelques tubes de concentrations connues. On utilise généralement de la BSA (Bovine Serum Albumin) comme protéine standard. Cette gamme permet d'établir une courbe d'étalonnage de la concentration en fonction de l'absorbance mesurée (**Bradford, 1976**).

III.3.3.2. Mesure du taux du Malon dialdéhyde mitochondrial (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médié par les radicaux libres. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

Le MDA est l'un des biomarqueurs fiables de l'oxydation des membranes cellulaire et mitochondriale car c'est l'un des produits terminaux de la lipoperoxydation.

Le principe de la méthode repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un complexe chromogène de couleur rose absorbant la lumière à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

(**Ohkawa H et al., 1979**).

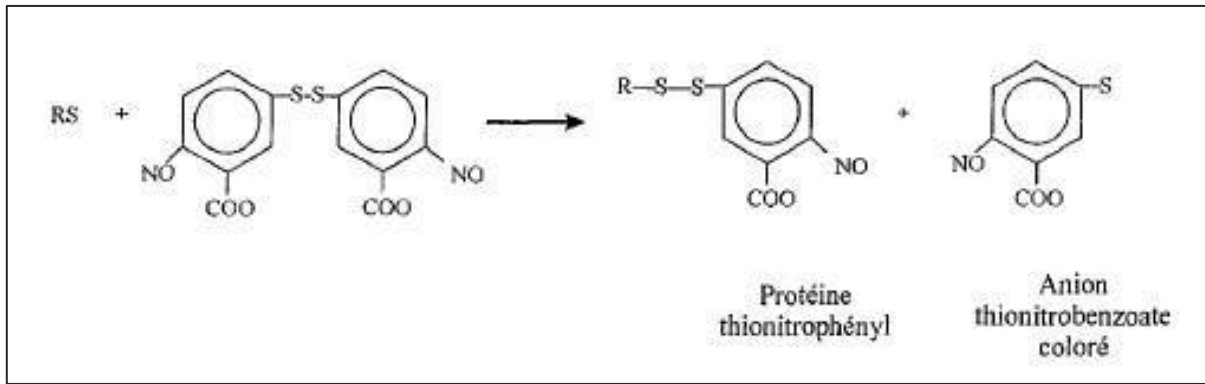
À 0,5 ml de la fraction cytosolique du foie, 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage réalisé à partir du

1,1,3,3-tétraéthoxypropane qui lors de son hydrolyse acide libère du MDA. L'activité du MDA est exprimée en nmole/gramme de tissu hépatique.

III.3.3.3. Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH)

Le niveau de glutathion a été estimé dans le cytosol des foies spectrophotométriquement par le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) réduit par les groupements -SH en libérant l'acide thionitrobenzoïque (TNB), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à $\lambda = 412$ nm (Ellman, 1959)

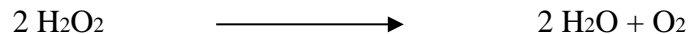


50 μ l du cytosol sont additionnés à 10 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH=8. Prélever 3 ml du mélange à qui on a ajouté 20 μ l d'une solution de DTNB 0,01 M (dissoudre dans le méthanol absolu). Après 15 min d'incubation à la température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue contre un blanc de réactif à 412 nm dans un spectrophotomètre. Les concentrations du GSH sont exprimées en nmol/g du foie. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de GSH préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

III.3.3.4. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

Le cytosol (source enzymatique) est récupéré afin de doser l'activité enzymatique de la catalase.

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de « Clairbone, 1985 ». Le dosage spectrophotométrique est basé sur la disparition de l' H_2O_2 à 240 nm pendant 2 min.



La quantité d' H_2O_2 décomposé est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme.

1ml de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH=7,2 est additionné à 0,95 ml de peroxyde d'hydrogène 0,019 M et 25 μ l de la source enzymatique, puis l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au model Michaelien, on n'a pas utilisé la loi de BeerLambert. La constante de vitesse de la catalase est définie par la relation :

$$K = 2.3 / \Delta t \times \log_{10} (\text{DO}_0 / \text{DO}_t)$$

L'activité enzymatique est exprimée en unités UI/g de protéines.

DO_0 : absorbance à 0 min

DO_t : absorbance au moment « t »

Δt : intervalle de temps

Analyse statistique

Les analyses ont été faites à l'aide du test de dunnett's pour les comparaisons entre les échantillons. Une différence entre les résultats a été considérée comme significative pour une valeur de $p < 0.005$. Ces analyses ont été réalisées par le logiciel XLSTAT. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type.

Pour le seuil de signification, nous avons noté :

(ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.005$),

(*) désigne un effet significatif ($p < 0.005$),

(**) désigne un effet très significatif ($p < 0.001$),

(***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Rendement de l'extraction

L'extraction hydro-méthanolique du *Marrubium vulgare* par macération, permet de déterminer le rendement qui est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \text{Mext}/\text{Méch} \times 100$$

Mext : masse de l'extrait après extraction

Méch : masse totale de la poudre après broyage

L'extrait hydro-méthanolique du *Marrubium vulgare* nous a permis d'obtenir une poudre verdâtre après lyophilisation avec un rendement de l'ordre de **10.04%**

Rendement d'extraction du *Marrubium vulgare*

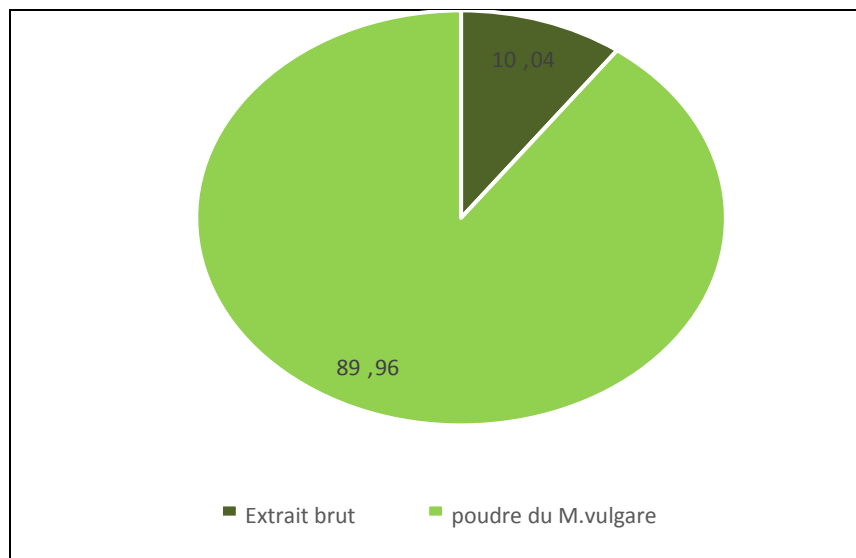


Figure 23 : Rendement de l'extraction du *Marrubium vulgare*

Notre résultat concorde avec ceux de (**Ghedadba., 2018**), et (**Hambaba et al., 2014**) qui ont enregistré des rendements respectivement de (**9.90 % et 10,9 %**). Par contre, on a remarqué une infériorité de notre résultat en comparaison à celui de (**Boutelis., 2013**) qui a obtenu un rendement de l'ordre de **24,34 %**, la même chose pour (**Pukalskas et al., 2012**) qui soulignent un rendement de l'extrait méthanolique de l'ordre de **20,1%**, avec la même espèce. Un rendement de **39,2%** a été également obtenu à partir de la même espèce lors d'une étude entreprise par (**Kanyonga et al., 2011**).

En effet, ces chercheurs ont montré que les extraits méthanoliques du *Marrubium vulgare* sont très riches en métabolites secondaires.

En comparant notre résultat avec celui de (**Bourahla et Chaa., 2019**) qui ont trouvé un rendement d'extraction plus faible avec l'acétone (**2.6 %**) et celui de (**Hambaba et al., 2014**) qui ont obtenu aussi un rendement faible de **2,1 %** avec l'extraction à éther de pétrole.


Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux des autres études, car le rendement n'est que relatif, et en plus des différences obtenues à cause des méthodes d'extraction appliquées, il semble aussi être lié aux propriétés génétiques de la plante, de son origine géographique et aux conditions de la récolte (**Lee et al., 2003**).





IV.2. Analyse qualitative



IV.2.1. Screening phytochimique

La technique du screening phytochimique permet d'identifier la présence des métabolites et leur degré de présence dans le tissu végétal du *Marrubium vulgare*, Il s'agit d'un dosage Qualitatif. On a utilisé des composés chimiques qui interagissent avec le groupe de composés chimiques, propre à notre broyat (poudre) du *Marrubium vulgare* mettant en évidence leur présence ou absence. Les résultats sont visibles suite à un changement de couleur spécifique ou un examen. Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé du *Marrubium vulgare* sont susmentionnés dans le tableau :

Tableau 3 : Résultats du screening phytochimique de l'extrait du *Marrubium vulgare*

Métabolites secondaires	Observation	Résultats
Alcaloïdes		++

Tanins		+++
Flavonoïdes		+++
Saponosides		+++
Composés réducteurs		+

Oses et holosides		+
Mucilages		+++

(+++)= **Réaction fortement positive**

(++) = **Réaction moyennement positive**

(+) = **Réaction très faiblement positive**

IV.3. Analyse Quantitative

IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures.

L'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode. Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage ayant l'équation : $y = 0.0026x$ et $R^2 = 0.9816$.

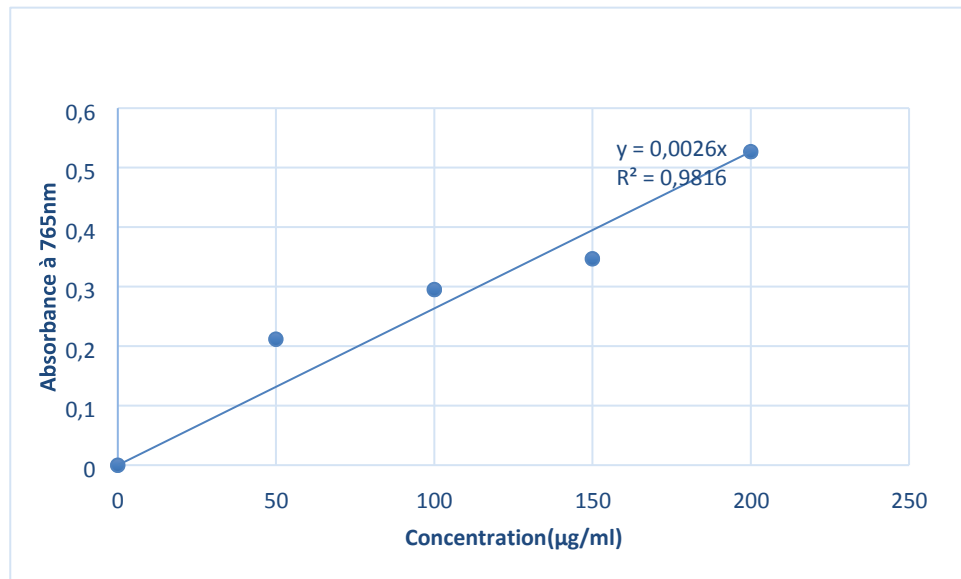


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols sont exprimées en µg EAG/mg d'extrait et les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm son écart type.

Les concentrations moyennes en phénols totaux enregistrées sur les feuilles du *Marrubium vulgare* de la région de Guelma spécifiquement de la commune de Guelma est estimé au cours de notre analyse à $120,128 \pm 1,350557$ µg EAG/ mg d'extrait hydro-méthanolique.

Suite à une comparaison de notre résultat à ceux des autres chercheurs sur la même variété, mais de régions différentes.

Les travaux rapportés par (Larbi *et al.*, 2017) et (Hambaba *et al.*, 2014) montrent que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* possède une forte concentration en composés phénoliques totaux avec respectivement $168,606 \pm 5,19$ µg EAG/mg et $195 \pm 0,00$ µg EAG/mg MS, comparés au résultat de nos analyses.

(Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014), (Aouadhi *et al.*, 2014) et (Wojdylo *et al.*, 2007) ont présenté des résultats montrant une faible concentration en composés phénoliques totaux avec $40,57 \pm 1,9$ mg EAG/g MS, $26,8 \pm 0,01$ mg EAG/g MS et $3,86 \pm 0,05$ mg EAG/g MS durant la période de floraison. Cette variabilité dans les résultats pourrait être liée aux conditions climatiques du biotope de l'espèce ou aux différentes méthodes suivies lors de l'extraction. (Ebrahimi *et al.*, 2008). En effet, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques car des études montrent que les facteurs extrinsèques tels que les facteurs géographiques, climatiques et environnementaux, les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante et la période de

récolte ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (**Fiorucci., 2006 ; Ebrahimi et al.,2008**).

Une des caractéristiques des polyphénols, qu'ils partagent généralement avec l'ensemble des métabolites secondaires, est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales et, pour une même espèce, selon la variété et le stade d'évolution physiologique (**Macheix.,2005**).

IV.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) pour chaque extrait il a été rapporté en μg équivalent de Quercétine/mg d'extrait. Les résultats de la courbe d'étalonnage de Quercétine sont représentés dans la figure suivante.

Le taux des flavonoïdes a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0.0169x$ sachant que $R^2 = 0.9724$.

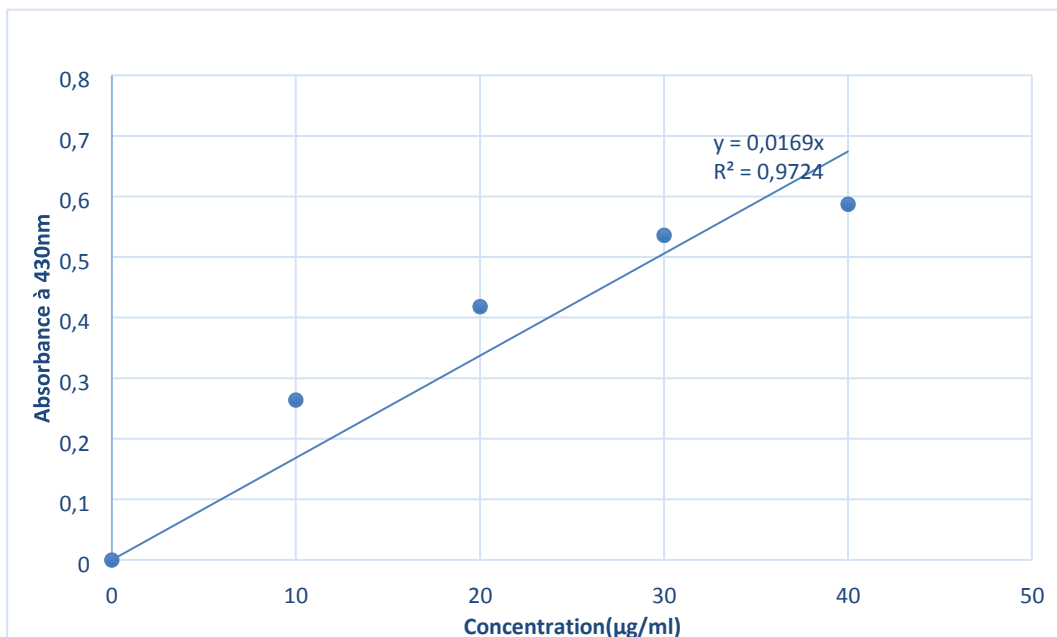


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Notre résultat est exprimé en μg d'équivalent en quercétine par mg d'extrait (μg EQ/mg d'extrait). Suite à notre analyse, la teneur en flavonoïdes totaux $3,047 \pm 0,042$. μg EQ /mg d'extrait du *Marrubium vulgare* de la région de Guelma est estimée à pour l'extrait hydro-méthanolique. Suite à une comparaison avec d'autres résultats, on remarque que notre résultat est supérieur à celui obtenu par (**Ghedadba., 2014**) estimé à $0,238 \pm 0,36$ mg EQ/g. La même chose pour (**Chediaa et al., 2014**) qui ont obtenu une teneur en flavonoïdes totaux de 0.61 mg EC/ ml pour l'extrait méthanolique des feuilles du *M. vulgare*.

En revanche, notre rendement est inférieur en comparaison au résultat obtenu par (**Khodja et al., 2014**) qui estima la teneur en flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique à 7.03 mg EQ/g. Pareillement pour (**Djahra et al., 2011**) estimé à 0.059g pour 1g de matière sèche du *M. vulgare*. La même chose pour les résultats présentés par (**Mssillou., 2021**) pour les extraits acétone/eau et éthanol/eau respectivement estimés à 21.08 et 17.65 µg EQ/mg.

La variation de résultats pour la même espèce du *M. vulgare* s'expliquerait par l'utilisation de différents solvants, les différences dans le protocole de manipulation du matériel biologique (Temps de macération, de séchage...) et autres facteurs tels que les conditions climatiques (**Podsdek., 2007**).

Notre étude a révélé une importante quantité de polyphénols dans l'extrait du *Marrubium vulgare* suivi des tanins et des flavonoïdes qui sont présents en Quantité non négligeable.

IV.3.3. Dosage des protéines totales

Le taux de protéines est évalué à l'aide d'une gamme d'étalon selon la méthode de Bradford en utilisant Bovin sérum Albumine (BSA) comme le standard.

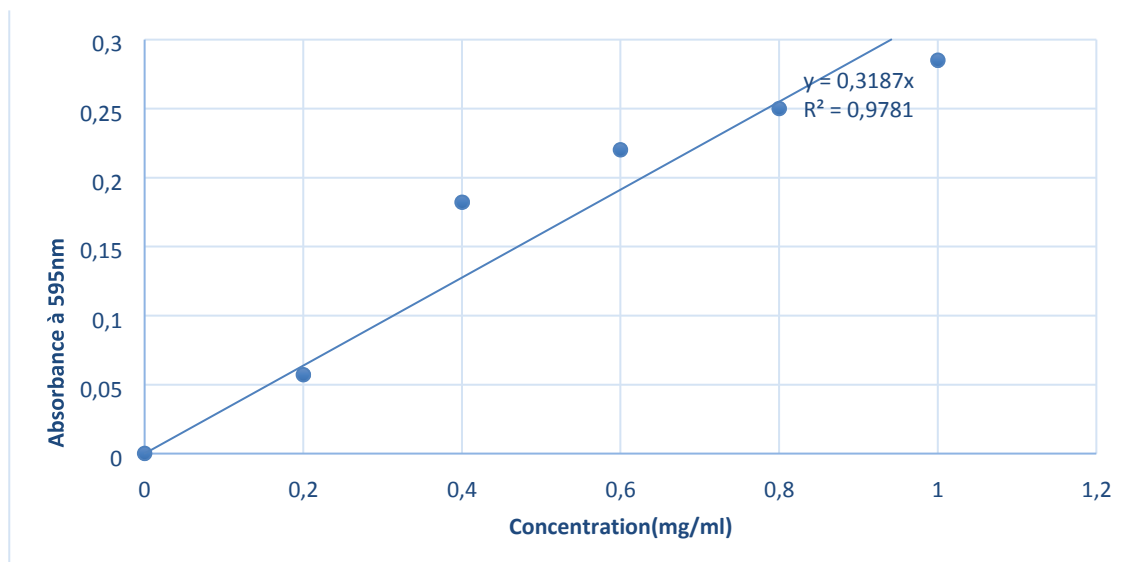


Figure 26 : Courbe d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines totales.

Suite à l'utilisation de la gamme d'étalon de BSA, les protéines totales sont mesurées dans les fractions cytosoliques de 5 foies de rats. Ensuite on a déduit la moyenne des protéines totales issues des 5 foies \pm l'écart type.

Notre résultat est estimé à **0.0912 \pm 0.146 mg/ml** dans les cytosols.

Force est de constater que peu de recherches ont été réalisées sur l'effet pro-oxydant du *Marrubium vulgare* surtout concernant les paramètres marqueurs du stress oxydatif à l'instar du MDA, du GSH et de la Catalase. Dans notre étude, il a été réalisé un dosage quantitatif des métabolites, puis des marqueurs du stress oxydatifs, une comparaison, puis l'interprétation des résultats.

IV.3.4. Dosage du MDA (Malondialdéhyde)

Le MDA est un biomarqueur fiable de l'oxydation de la membrane cellulaire et mitochondriale car il s'agit d'un des produits terminaux de la lipopéoxydation.

Les résultats obtenus après la mesure du taux de MDA sont représentés sous forme d'histogramme

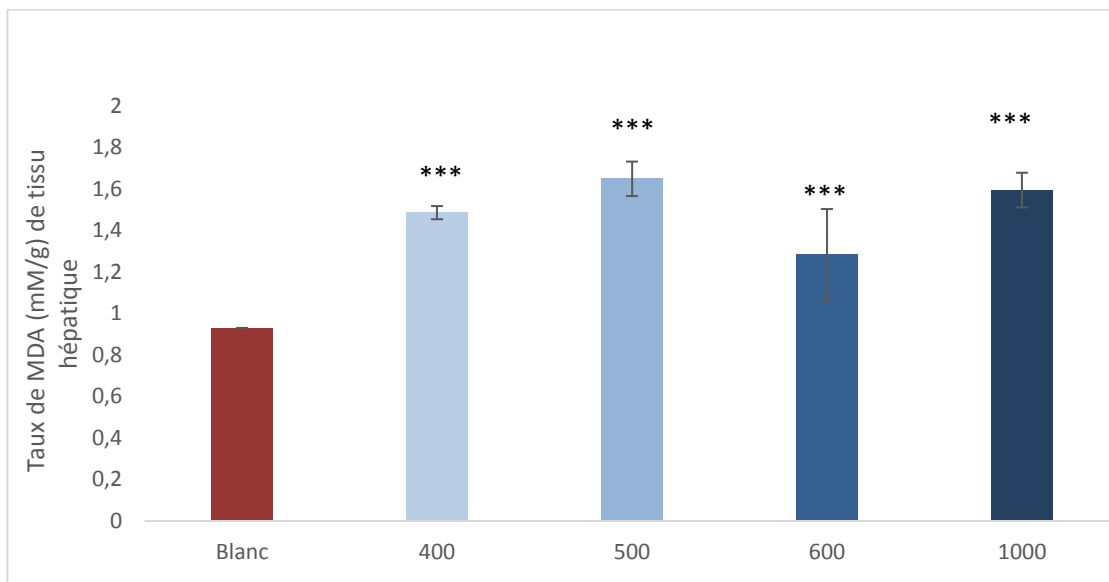


Figure 27 : Variation du taux de MDA dans le cytosol après l'ajout de différente concentration de l'extrait du *M. vulgare* et ceux des blancs sans l'extrait du *M vulgare*

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (n=5).test de dunnett's:(ns) désigne un effet non significatif ($p>0.005$). *désigne un effet significatif ($p<0.005$), (***) désigne un effet très significatif ($p<0.001$), (***) **désigne un effet hautement significatif ($p<0.001$)**.

L'ajout de différentes concentrations d'extrait brut du *Marrubium vulgare* à savoir : (400, 500, 600, 1000) $\mu\text{g/g}$ a été accompagné d'une augmentation du taux de MDA ce qui traduit une augmentation de la peroxydation lipidique.

On a constaté que le plus grand taux de MDA est noté au niveau de la concentration de 500 $\mu\text{g/g}$ d'extrait.

Le dosage du taux de MDA en général, permet la mise en évidence des stress environnementaux pouvant induire une variation au niveau de l'oxydation des lipides (**Pincemail., 1995**)

Dans notre étude, l'ajout de l'extrait du *Marrubium vulgare* a été suivi d'une augmentation du taux de MDA ce qui traduit l'effet pro-oxydant du *M. vulgare* qui serait dû à la présence de polyphénols dans notre extrait hydro-méthanolique.

La peroxydation des lipides, présente une perspective d'avenir pour la lutte contre le cancer (Lachaier., 2014). En effet, la peroxydation des lipides de la membrane plasmique, représente l'étape biochimique de la ferroptose, décrite comme une forme de mort cellulaire nécrotique ayant la capacité de tuer les cellules cancéreuses. Mais jusque-là il est espéré un plus grand nombre d'études sur cette perspective (Birsen., 2021)

IV.3.5. Dosage du GSH

La mesure de la concentration du GSH a été réalisé à partir d'une gamme étalon de GSH préparée dans les mêmes conditions que le dosage de GSH dans le cytosol.

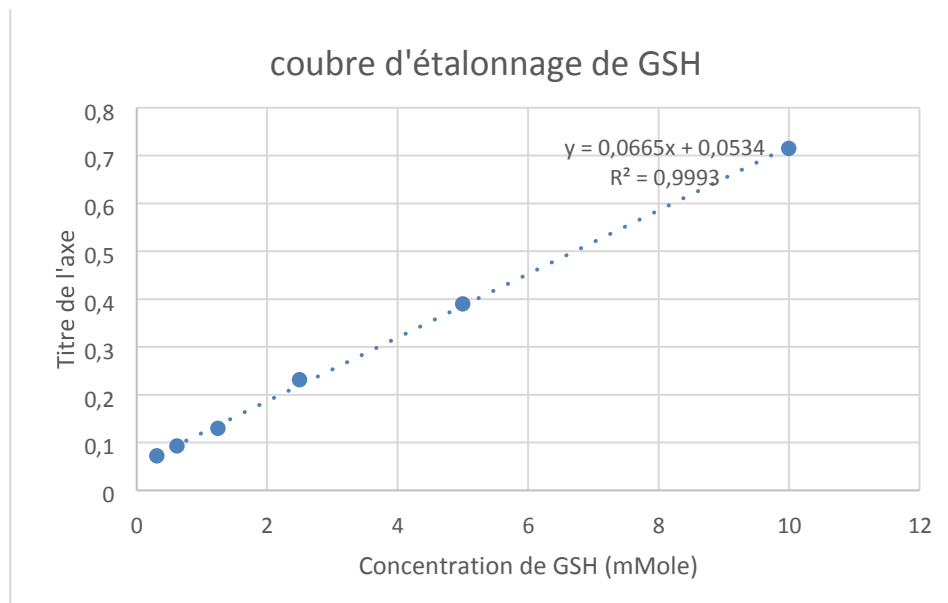


Figure 28 : Courbe d'étalonnage de la GSH

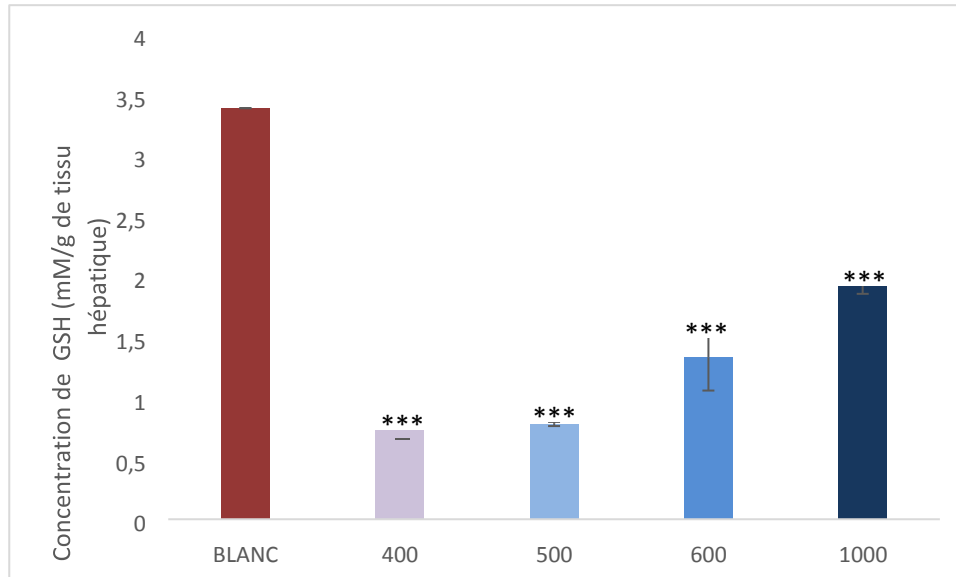


Figure 29 : Variation des taux de GSH dans le cytosol après l'ajout de différentes concentrations de l'extrait du *Marrubium*.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (n=5). test de dunnett's: (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.005$). (*) désigne un effet significatif ($p < 0.005$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.001$), (***) **désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$)**.

L'ajout de différentes concentrations de l'extrait du *Marrubium vulgare* à savoir : (400, 500, 600, 1000) $\mu\text{g/g}$ est suivi d'une diminution hautement significative de la concentration en GSH.

La plus basse concentration de GSH est enregistrée pour la dose contenant 400 $\mu\text{g/g}$ d'extrait du *Marrubium*.

Le GSH est souvent utilisé comme marqueur pour évaluer le stress oxydatif. Il s'agit d'un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique (Glu), de Cystéine (Cys) et de Glycine (Gly). (Shekhar., 2004) Principal antioxydant présent dans la cellule, sa déplétion signifie un état de stress oxydant augmenté. (Koechlin., 2006).

En effet, Durant notre étude, suite à l'ajout de différentes concentrations de l'extrait du *Marrubium vulgare*, on constate une diminution hautement significative du taux de GSH depuis la dose 400 $\mu\text{g/g}$ mettant en évidence l'effet pro-oxydant du *Marrubium* exercé sur le cytosol hépatique. Cette diminution serait forcément accompagnée de la formation du GSSG qui représente la forme active du GSH et la plus à même d'inhiber l'effet des ERO.

En effet, le rapport GSH/GSSG (forme oxydée du GSH) est considéré comme un excellent marqueur de l'importance du stress oxydant. (Haleng., 2007) Puisqu' une fois en contact avec les EROs (état de stress oxydatif), le ratio GSH/ GSSG diminue avec une augmentation du taux de

GSSG qui joue un rôle d'antioxydant. (Zitka., 2012)

IV.3.6. Dosage de l'activité de la catalase

La catalase est une enzyme responsable de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et en oxygène (O₂) suivant l'équation :

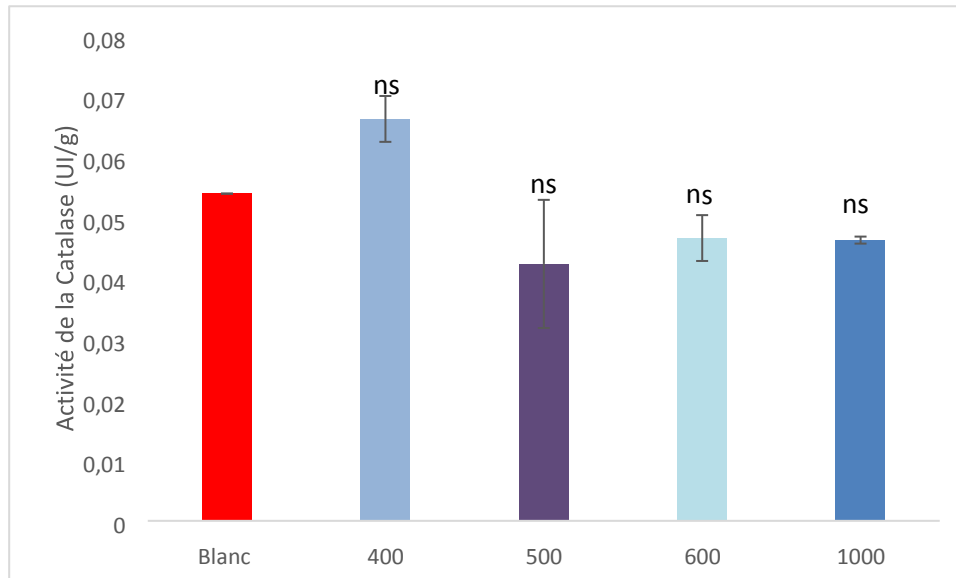
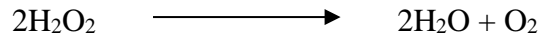


Figure 30 : Variation de l'activité de la catalase moyenne dans le cytosol après ajout des différentes concentrations de l'extrait

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type (n=5).test de dunnett's:(**ns**) désigne un effet **non significatif** ($p>0.005$). *désigne un effet significatif ($p<0.005$), (**) désigne un effet très significatif ($p<0.001$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p<0.001$).

La dose de 400 $\mu\text{g/g}$ est suivi d'une augmentation de l'activité de la catalase ce qui traduit l'effet pro-oxydant de l'extrait.

Les doses de 500, 600 et 1000 $\mu\text{g/g}$ sont suivies d'une diminution non significative de l'activité de la catalase par rapport au blanc

La catalase est une enzyme héminique ubiquitaire essentiellement présente à l'intérieur des globules rouges (hématies) et dans les peroxysomes, elle élimine le H₂O₂ par dismutation. Du coup elle entraînera une diminution du stress oxydatif. (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003 ;Bensakhria., 2018).

A la fin de notre discussion, il en découle que le *Marrubium* par sa composition en polyphénols et flavonoïdes a eu un effet pro-oxydant remarquable, mis en évidence par l'augmentation du taux de

MDA, la diminution du taux de GSH. Ce qui a été confirmé par les études d'autres chercheurs. Des études similaires ont montré un effet positif de différentes classes de polyphénols sur les activités enzymatiques des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) (**Feng *et al.*, 2010 ; Srivastava et Shivanandappa., 2010 ; Kim *et al.*, 2013, Avila-Nava *et al.*, 2014).**

Conclusion

CONCLUSION

En conclusion, cette étude sur l'effet prooxydant *in vitro* du *M. vulgare* a permis de fournir des informations importantes sur les propriétés de cette plante médicinale.

Nos résultats suggèrent que le *Marrubium vulgare* peut potentiellement exercer des effets bénéfiques en induisant un stress oxydant contrôlé.

A la lumière des résultats obtenus, nous avons conclu :

- La préparation de l'extrait brut des feuilles du *Marrubium vulgare* nous a permis d'obtenir un rendement de 10,04% et c'est un bon rendement.
- Le screening Phytochimique a révélé plusieurs métabolites secondaires tel que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, mucilage et les saponosides. C'est une plante riche en différents métabolites secondaires.
- L'effet prooxydant de notre extrait est prouvé par :
 - Diminution de l'activité catalytique de la catalase,
 - Diminution du taux de la GSH molécule antioxydante,
 - Augmentation de la peroxydation lipidique confirmé par l'augmentation du taux de son marqueur

le MDA.

Nos résultats sont satisfaisants mais des études complémentaires tels que des essais précliniques et des études cliniques, sont nécessaires pour évaluer les effets de cette plante sur la santé humaine et déterminer ses applications thérapeutiques potentielles.

Ainsi, une utilisation appropriée du *Marrubium vulgare* dans le domaine médical nécessiterait une compréhension approfondie de ses mécanismes d'action et de ses effets sur le stress oxydant *in vivo*.

En somme, cette recherche a contribué à élargir les connaissances sur l'effet prooxydant du *M. vulgare in vitro*, fournissant une base solide pour de futures investigations visant à exploiter son potentiel médicinal dans le contexte du stress oxydant. Ces découvertes pourraient éventuellement conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ou de compléments alimentaires à base de *Marrubium vulgare*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abreu IA et Cabelli DE. (2010). Superoxide dismutases-a review of the etal associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*.1804 : 263-274.

Akther N. ; Shawl AS. ; Sultana S. ; et al. (2013). Hepatoprotective activity of Marrubium vulgare against paracetamol induced toxicity. *Journal of Pharmacy Research*, 7(7), 565-570.

Al Ghouleh I. Khoo. ; N. K. ; Knaus. ; U. G. et al. (2011). Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease : new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1271-1288.

Amessis-Ouchemoukh N. ; khodir M. ; et al. (2014). “Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenas1 and acetylcholinesterase activités”, *Industrial Crops and Product*, 53,6-

Aouadhi C. ; Ghazghazi H. ; Hasnaoui B. et al. (2014) “Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of Marrubium vulgare methanolic extract”, *Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products*, 11(1) :

Aprioku JS. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil*.14 (4) : 158-172.

Ashor AW. ; Siervo M et Mathers JC. (2016). Vitamin C, antioxidant status, and cardiovascular aging. In *molecular basis of nutrition and aging* (pp. 609-619). Academic Press.

Atefeibu ESI. (2002). Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii*. Thèse de Doctorat. Université cheikh Anta Diop de Dakar, 33p.

B

Baraka-vidot J. (2014). Stress oxydant et pathologie diabétique à l'île de La Réunion Identification et caractérisation des propriétés structurales et fonctionnelles de l'albumine glyquée. Thèse de Doctorat de l'Université de la Réunion, Faculté de Biochimie 35p.

Barouki R. et Morel Y. (2001). Répression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol*. 61 : 511-516

Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on toxicology*, 9(1), 5-21

Bensakhria A. (2018). Le stress oxydatif. *Toxicologie générale*. 9 : 79-82.

Bielski BH. ; Arudi RL. ; Sutherland MW. (1983). A study of the reactivity of H₂O₂ - with unsaturated fatty acids. *J. Bioi. Chem*. 258 :4759-61

- Birsen R. ; Grignano E. ; Chapuis N. et al. Bouscary, D. (2021).** Ferroptose et cancer Implications physiopathologiques et thérapeutiques. *Médecine/sciences*, 37(8-9), 726-734.
- Bonnefont-Rousselot D. ; Théron P. ; Beaudoux JL. et al. (2001).** Aging and oxidative stress. Which potential markers ? *Ann. Biol. Clin.* **59(4)** : 453-459.
- Bonnefont-Rousselot D. ; Théron P. ; Delattre J. (2003)** Radicaux libres et antioxydant. In : Biochimie pathologie aspects moléculaires et cellulaires. P. 59-81
- Boutabia L. ; Telailia S. et Mena M. (2020).** Traditional therapeutic uses of *Marrubium vulgare* L. by local populations in the Haddada region (Souk Ahras, Algeria). *Ethnobotany Research and Applications*, 19, 1-11.
- Boutelis D A. (2013),** “Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* ”, thèse de doctorat en science, université Badji Mokhtar – Annaba, 73p
- Bouterfas K. ; Mehdadi Z. ; Latreche A et al. (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. ; Elaoufi MM et al. (2018).** In vitro antibacterial activity of flavonoids extracts from three Algerian horehound (*Marrubium vulgare* L.) leaves. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18, 59-66.
- Buonocore G. ; Perrone S. et Tataranno, ML. (2010).** Oxygen toxicity : chemistry and biology of reactive oxygen species. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 15, No. 4, pp. 186190). WB Saunders.
- Burton G. et Jauniaux E. (2011).** Oxidative stress. Best practice and research clinical obstetricsand gynaecology. 25 : 287-299.
- C
- Cadet J. et Wagner JR. (2013).** DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(2), a012559.
- Carrière A. ; Galinier A. ; Fernandez Y. et al. (2006)** Les espèces actives de l’oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *Med Sci (Paris)* 22 : 47-53.
- Charbon G. ; Bjørn L. ; Mendoza-Chamizo B. et al (2014).** Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*.42(21) : 13228-13241.

Chance B. et Oshino N. (1971). Kinetics and mechanisms of catalase in peroxisomes of the mitochondrial fraction. *Biochemical Journal*, 122(2), 225-233.

Chediaa A. ; Ghazghazib H. ; Brahim H. et al. (2014). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of Marrubium vulgare methanolic extract, *Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products*, 11(1) :

Clarkson PM. et Thompson HS. (2000). Antioxidants : what role do they play in physical activity and health ? *American Journal of Clinical Nutrition*. 72(2) : 637-646.

Comhair SAA. et Erzurum SC. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 283 (2) : 246-55.

D

Démarchez M. (2012). Le stress oxydant cutané.

Dembélé F. ; Samaké S. ; Togola I. et al (2021). Etudes ethnobotanique et phytochimique d'espèces ornementales utilisées au Mali : cas de Terminalia catappa (L.) dans le district de Bamako. *IJAR*, 7(6), pp.01-07.

Delattre J. ; Beaudoux JL. et Bonnefont-Rousselot D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques* (pp. 87-108). Editions Tec & Doc.

Delattre J. ; Beaudoux J.L. ; Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.

Desmier T. (2016). Les antioxydants de nos jours : définition et applications, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie - université de limoges.

Djahra AB. ; Bordjiba O. et Benkherara S. (2013). Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins du marrube. *Phytothérapie*, 11, 348-352.

Djahra A B. ; Bordjiba O. et Benkherara S. (2015). Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare L.* de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). Synthèse : *Revue des Sciences et de la Technologie*, 24, 29-37.

Douris PC. ; Elokda AS. ; Handrakis JP. et al . (2009). Martial art training enhances the glutathione antioxidant system in middle-aged adults. *J. Strength Cond. Res.* 23(5) : 1518-23.

Durand K. (2018). Diabetes et stress oxydant. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille, Faculté de Pharmacie. 8p.

E

Ebrahimi NS. ; Hadian J. ; Mirjalili MH. et al. (2008) Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chem*, 110(4), 927-931

Ebrahimi N S. ; Hadian J. ; Mirjalili M H. et al. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chem.*, 110(4), 927-931

F

Favier A. (1997). Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann. Bio. Clin.* **55(1)** : 9-16.

Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique. 108-115.

Feng L. ; Jia X. ; Zhu M. et al. (2010). Antioxidant activities of total phenols of *Prunella vulgaris* L. in vitro and in tumor-bearing mice. *Molecules*, 15(12), 9145-9156.

Finkel T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species.) *J Cell Biol.* Jul 11 ;194(1) :7-15

Fiorucci S. (2006). Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse Doc. Nice, France, 211 p.

Florence B. (2016). Stress oxydant et pathologie diabétique. Thèse de Doctorat de l'Université De la Réunion, Faculté de Biochimie. P : 30-31.

G

Gardès-Albert M. et Jore D. (2005). Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier. 1-23p.

Gardes-Albert M. (2006). Physico-chemical aspects of reactive oxygen species. In *Annales Pharmaceutiques Françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 365-372).

Gavric J. ; Andelkovic M. ; Tomovic L. et al. (2017). Oxidative stress biomarkers, cholinesterase activity and biotransformation enzymes in the liver of dice snake (*Natrix tessellata* Laurenti) during pre-hibernation and post-hibernation. *Ecotoxicol Environ Saf.* **138** : 154-162.

Ghilaine C. (2016). Le stress oxydatif : Un assassin silencieux. 21 P.

Ghedadba N. (2018). Contribution à l'étude biologiques des deux espèces de *Marrubium Vulgare* L et *Marrubium deserti* Noé in vitro et in vivo P : 35

Goldstein S. ; Meyerstein D. ; Czapski G. (1993). The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med.* 15:435-45.

H

Haleng. ; Jeanine. ; Pincemail, Joël. ; Defraigne. ; Jean-Olivier et al. (2007) Le stress oxydant • In *Revue Médicale de Liège*, 62 (10), p. 628-638

Halliwell B. ; Gutteridge J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 246 : 501-514.

Halliwell B. ; Gutteridge J.M.C. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition. Oxford University Press, USA. 704p.

J

Jamdade. ; C. B. ; & Bodare, R. D. (2022). A mini review on free radicals-generated in biological system

K

Kanyonga PM. ; Faouzi MA. ; Meddah B. et al. (2011). “Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and antimicrobiologic activities”, *J Chem Pharm Res*, 3: 199 – 204.

Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.

Koolman J. et Röhm K-H. (2004). Atlas de Poche de Biochimie. 3^e édition. Flammarion, Paris. 478p.

L

Lachaier E. ; Louandre C. ; Ezzoukhry Z. et al. (2014). La ferroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire applicable au traitement médical des cancers. *Médecine/sciences*, 30(8-9), 779-783.

Lau A.T. ; Wang Y. et Chiu J.F. (2008). Reactive oxygen species : current knowledge and applications in cancer research and therapeutic. *J Cell Biochem.* 104 (2) : 657-667

Lee et al. (2003). Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J Agric Food chem.*, 51 : 7292-7295.

Lee K W. ; Kim Y J. ; Lee H J. et al. (2003). Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51 : 7292-7295.

Lefrançois P., Ruby F et Dionne J (2007). Le marrube dans le passeport santé

Lenaz G. (2006) Mitochondria and reactive oxygen species, Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol.* ; 942 :93-136.)

Leverve X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 44(5), 219-224.

- Levine R L. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation ; aging and disease. *Free radic. Biol. Med.* **32**: 790-796.
- Liguori I. ; Russo G. ; Curcio F. et al. (2018).** Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* **13**: 757-772.
- Lopez, B S. ; Saintigny Y. ; & Adam-Guillermin C. (2008).** Réponse cellulaire à l'exposition aux éléments chimiques stables ou radioactifs. *Biofutur*, (291), 26-29.
- Lykkesfeldt J. et Svendsen O. (2007).** Oxidants and antioxidants in disease : oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* **173**, 502–511
- Lyn Patrick ND. (2006).** Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern. Med. Rev.* **11**(2): 114-127.
- M
- Macheix JJ. ; Fleuriet A. et Jaye-Allemand C. (2005)** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'une importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 185 p
- Mazat JP et Ransac S. (2010)** Le complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell. La preuve par une approche stochastique ? *Med Sci (Paris)* ; **26** : 1079-86
- Mazzetti A.P., Fiorile M.C., Primavera A. & Lo, B.M. (2015).** Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* **82** : 10-18.
- Meister R.T. (1991).** Farm chemicals handbook 91. Meister Publishing Company, Willoughby, Ohio.
- Menon S G. et Goswami P C. (2007).** A redox cycle within the cell cycle : ring in the old with the new. *Oncogene.* **26**: 1101-1109.
- M.I. Melecchi. ; M.M. Martinez F.C. et Abad. (2002)** Chemical composition of Hibiscustiliaceus 1. Flowers : A study of extraction methods. *J. Sep.Sei.* **25**, 86-90,
- Migdal C. et Serres, M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine sciences,* **27**(4), 405-412.
- Miller J.K., Brzezinska-Slebodzinska E. et Madsen F C. (1993).** Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy. Sci.* **76**, 2812–2823.
- Monteil C. ; Mulder P. et Thuillez C. (2004).** Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique ? *Médecine thérapeutique Cardiologie.* **2** : 75-85
- Mssillou I. ; Agour A. ; Hamamouch. et al. (2021).** Chemical Composition and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Marrubium vulgare L. *The Scientific World Journal*, 2021.

P

Pérez-Lemus N. ; López-Serna R. ; Pérez-Elvira S I. et al. (2019). Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review. *Analytica chimica acta*, 1083, 19-40.

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.

Pincemail J. ; Meurisse M. ; Limet R. et al. (1995). Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Medi Sphere* :95.

Podsdek A. (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*. 40:1-11.

Poprac P. ; Jomova K. ; Simunkova M. et al. Kollar V. (2017). Targeting Free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 38(7) : 592-607.

Pukalskas A. ; Venskutonis P R. ; et al. (2012), "Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L) cultivated in Lithuania ", *Journal Food Chemistry*, V æ130, 695-701.

R

Richter B D. ; baumgartner JV. ; Wigington P. et al. (1988). How much water does ariver need ? *FreshwaterBiology*. 37: 231-249.

S

Schiavone S. ; Jaquet V. ; Trabace L. et al. (2013). Severe Life Stress and OxidativeStress in the Brain : From Animal Models to Human Pathology /*Antioxid Redox Signal*. 18(12) : 14751490.

Selye H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32–33,

Sheng Y. ; Abreu IA. ; Cabelli DE. et al. (2014) Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem Rev.* Apr 9;114(7):3854–918.

Slaughter M R. et O'Brien P J. (2000). Fully-automated spectrophotometric method for measurement of antioxidant activity of catalase. *Clinical biochemistry*, 33(7), 525-534.

Smirnoff N. (2018). Ascorbic acid metabolism and functions : a comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med*. 122: 116-129.

Srivastava A. et Shivanandappa T. (2010). Hepatoprotective effect of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats. *Food chemistry*, 118(2), 411-417

Stulzer H K. ; Tagliari M P. ; Zampirolo J A. et al. (2006). Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*, **108(3)**, pp 379-384.

Szabó C. ; Ischiropoulos H. et Radi R. (2007) Peroxynitrite : biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 662–680.

T

Taso O V. ; Philippou A. ; Moustogiannis A. et al. (2019). Lipid peroxidation products and their role in neurodegenerative diseases. *Ann Res Hosp* **3** : 1-10.

Tessier F. et Marconnet P. (1995) : "Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice." *Science & sports* 10.1 1-13.

Thomas M. ; Nelson G. ; Patonay G. et Warner I. (1988) Analysis of drug binding sites on human serum albumin using multidimensional fluorescence measurements *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy* **43**, 651-660

V

Valery A. ; Champy R. ; Mitrovic D. et al (2007) Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales Paris P : 636-643.

W

Wang J. ; Xiong S. ; Xie C. et al. (2005). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, **93(4)**, 953-962.

Weiss J. et Sagliocco J L. (2012). *Marrubium vulgare L.*—horehound. *Biological Control of Weeds in Australia*, 360-367.

Wojdyło A. ; Oszmianski J. et Czemerys R. (2007). “Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs”, *Food Chemistry*, **105** : 940- 949.

X

Xiong Y. ; Zhou S. ; Sun Y. et al. (2017). Vitamin C and Ee supplements enhance the antioxidant capacity of erythrocytes obtained from aged *Rats Rejuvenation Res.* **20** : 85-92.

Y

Yu B P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *PhysiolRev.***74** : 139-162.

Z

Zielinski Z A. et Pratt D A. (2017). Lipid peroxidation : Kinetics, mechanisms, and products. *J Org Chem.* **82(6)** : 2817-2825.

Zitka O. ; Skalickova S. ; Gumulec J. et al. (2012). Redox status expressed as GSH : GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters*, 4(6), 12471253.

Zuluaga M. ; Gueguen V. ; Pavon-Djavid G. et al. (2017). Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *Bioimpacts*. 7 : 1-3.