

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

Étude phytochimique, activité antioxydante et toxicité aiguë du *Marrubium vulgare*

Présenté par : BOUARAB Djaffer

Soutenu le : 03 juillet 2017

Devant le jury composé de :

- Président : BEN-MAHDI M.H. Professeur à ENSV / ESSAIA
- Promoteur : YAHIAOUI F. Maitre Assistante A à ENSV
- Examineur 1 : ZAOUANI M. Maitre Assistant A à ENSV
- Examineur 2 : MOHAMMEDI S. Maitre Assistante à ESSAIA

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Madame **YAHIAOUI F.**, maître assistante A à l'ENSV d'Alger pour avoir accepté de diriger et de suivre ce travail.

Je tiens à remercier Madame **BEN-MAHDI M.H.**, professeur à l'ENSV d'Alger / ESSAIA, directrice du laboratoire de recherche SPA, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur **ZAOUANI M.**, maître assistant A à l'ENSV d'Alger, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

J'exprime également mes sincères remerciements à **MOHAMMEDI S.**, maître Assistante à l'ESSAIA d'Alger, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

Je voudrais aussi remercier toutes personnes ayant contribuées à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail,

À mes parents, je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant le chemin de vos enfants.

À ma sœur Samira, qui sans elle je n'aurais pu arriver là. Puisse Dieu tout puissant jouir votre vie, vous combler d'avantage, vous apporter bonheur, et vous aider à réaliser tous tes vœux.

À ma sœur Lynda qui m'a précédé dans l'exercice dans le domaine de la recherche. Pour toute son aide et pour ses nombreux conseils, son écoute et tous les bons moments passés en sa compagnie.

À mon frère Zazak, en souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent. Ta générosité, ton soutien ont été pour moi une source de courage et de confiance.

À ma sœur Aldjia, pour ton soutien et les meilleurs moments passés ensemble, j'implore Dieu qu'il t'apporte bonheur, et t'aide à réaliser tous tes vœux.

À mon beau-frère Khaled, veuillez percevoir à travers ce travail, l'expression de ma profonde affection et énorme respect.

À ma belle-sœur Nadine, pour toute son aide et sa gentillesse exceptionnelle.

À mes neveux adorés Minou et Massil ainsi qu'à ma nièce Ilyana.

À mon oncle Madjid. Avec tout mon estime, affection et respect, je vous souhaite santé, bonheur et prospérité.

À Cylia. Tu étais toujours là pour me soutenir, m'aider et m'écouter. Que Dieu te protège et te procure joie et bonheur. Puissent l'amitié et l'amour nous unissent à jamais.

À Moumou, qui fait partie de ces personnes rares par sa gentillesse et son grand cœur.

À l'ensemble de mes amis, qu'ils soient assurés de ma plus profonde sympathie.

Liste des Figures

Figure 1 : Marrube Blanc « <i>Marrubium vulgare</i> »	11
Figure 2 : Source cellulaire de radicaux libres	20
Figure 3 : Réaction de test DPPH	25
Figure 4 : HPLC Principe et appareillage	29
Figure 5 : Localisation géographique de la zone d'étude	33
Figure 6 : Les différentes étapes de l'extraction	34
Figure 7 : Dosage des polyphénols totaux	36
Figure 8 : Test au DPPH	38
Figure 9 : Test de la toxicité aiguë	39
Figure 10 : Extrait acétonique du <i>Marrubium vulgare</i>	40
Figure 11 : Courbe de calibration de la gamme étalon	42
Figure 12 : Chromatogramme HPLC de l'extrait brut acétonique de <i>Marrubium vulgare</i>	43
Figure 13 : Chromatogramme Etalons HPLC	43

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Formes galéniques utilisées en phytothérapie	5
Tableau 2 : Utilisations de la phytothérapie en médecine des animaux de compagnies	7
Tableau 3 : Place du taxon dans la classification APG III	9
Tableau 4 : Facteurs influençant la production des ERO	22
Tableau 5 : Rendements obtenus par différentes méthodes d'extractions	41
Tableau 6 : Résultats de l'effet antioxydant du <i>Marrubium vulgare</i>	44
Tableau 7 : Résultats de l'effet antioxydant de la quercétine	45
Tableau 8 : Concentration inhibitrice 50 du DPPH	45
Tableau 9 : L'évolution du poids des souris	46

Liste des Abréviations

Å : Ångström.

ABTS : 2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6- sulphonate.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

Al : Aluminium.

APG : Angiosperm Phylogeny Group.

C° : Degré Celsius.

Cm : Centimètre.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité optique.

DL 50 : Dose Létale 50

DPPH : α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle

e⁻ : Electron.

ENSV : Ecole Nationale Supérieur Vétérinaire.

ERN : Espèces Réactives de l'Azote.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

ESSAIA : Ecole Supérieur des Science de l'Aliment et des Industries Agroalimentaire

Fe : Fer.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power.

FRSA : Free radical Scavenging Activity.

FDA : Food and Drug Administration.

G : Gramme.

GAE : Equivalents d'acide gallique.

Liste des Abréviations

GC-MS : Chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse.

h : Heure.

H : Hydrogène.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HOCl : Acide hypochlorique.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

JC : Jésus christ.

LDL : Low Density Lipoprotein.

Kg : Kilogramme.

Mg : Milligramme.

Min : Minute.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen.

nm : Nanomètre.

NO : Monoxyde d'Azote.

NO₂ : Dioxyde d'azote.

•OH : Radical hydroxyl.

O : Oxygène.

¹O₂ : Oxygène Singulet.

O₂^{•-} : Radical Superoxyde.

pH : potentiel d'hydrogène.

PUFA : Poly Unsaturated Fatty Acids.

Liste des Abréviations

RO[•] : Radical secondaire alkoxyles.

RO₂[•] : Radical peroxy.

Rt : temps de rétention.

S : seconde.

SPA : Santé Production Animal.

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

Tr : Tour.

µl : Microlitre.

V : Volume.

Sommaire

Introduction	1
Partie bibliographique	
I. La Phytothérapie	3
I.1 Définition	3
I.2 Historique	3
I.3 Différents types de phytothérapie	4
I.3.1 Aromathérapie	4
I.3.2 Gemmothérapie	4
I.3.3 Herboristerie	4
I.3.3.1 Décoction	4
I.3.3.2 Macération	4
I.3.3.3 Infusion	4
I.3.4 Phytothérapie pharmaceutique	4
I.4 Les plantes médicinales	6
I.4.1 Propriétés des plantes médicinales	6
I.5 Phytothérapie en médecine vétérinaire	6
I.5.1 Spécialités vétérinaires à base de plantes	7
II. <i>Marrubium vulgare</i>	9
II.1 Définition	9
II.2 Taxonomie	9
II.3 Description botanique	10
II.4 Répartition géographique	12
II.5 Aspect historique	12
II.6 Usages traditionnels	14
II.7 Composition moléculaire et importance	14
II.7.1 Lactones diterpéniques labdaniques	14

Sommaire

II.7.2 Les Flavonoïdes	14
II.7.3 Les Tanins	14
II.7.4 Huile essentielle	15
II.7.5 Mucilages	15
II.7.6 Composés azotés	15
II.7.7 Dérivés de l'acide hydroxycinnamique	15
II.8 Propriétés de <i>Marrubium vulgare</i>	15
III. Radicaux libre et stress oxydatif	17
III.1 Stress Oxydatif	17
III.2 Les radicaux libres.	17
III.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	17
III.2.1.1 Les espèces oxygénées réactives radicalaires	18
III.2.1.2 Les espèces oxygénées réactives non-radicalaires	19
III.3 La production de radicaux libres par l'organisme biologique	19
III.4 Facteurs influençant la production des ERO	21
III.5 Mécanismes de défense contre le stress oxydatif	23
III.5.1 Systèmes antioxydants endogènes	23
III.5.1.1 Le glutathion	23
III.5.1.2 Acide lipoïque	23
III.5.1.3 La bilirubine	23
III.5.1.4 Acide urique	23
III.5.2 Systèmes antioxydants exogènes	23
III.5.2.1 Les vitamines	24
III.5.2.2 Les caroténoïdes	24
III.5.2.3 Polyphénols	24
III.5.2.4 Les Oligoéléments	24
III.6 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire	24
III.6.1 Test au DPPH	25

Sommaire

IV. Méthodes d'analyses physico-chimiques des composés phénoliques	26
IV.1 Les composés phénoliques	26
IV.1.1 Classification des composés phénoliques	26
IV.1.1.1 Les non flavonoïdes	26
IV.1.1.2 Les flavonoïdes	26
IV.2 Méthodes d'analyses	26
IV.2.1 Teneur en phénols totaux	26
IV.2.1.1 Teneur en flavonoïdes totaux	27
IV.2.2 Analyses chromatographiques	27
IV.2.2.1 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)	28
IV.2.2.1.1 Appareillage	28
IV.2.2.1.2 Analyse	29

Partie expérimentale

I. Objectif de l'étude	31
II. Matériels et méthodes	31
II.1 Matériels	31
II.1.1 Matériels de laboratoire	31
II.1.2 Appareillage	32
II.1.3 Réactifs	32
II.1.4 Animaux de laboratoire	32
II.1.4 Matière végétale	32
II.2 Méthodes	33
II.2.1 Préparation de l'extrait brut acétonique	33
II.2.2 Phyto-chimie	35
II.2.2.1 Dosage des polyphénols totaux	35
II.2.2.2 HPLC	37
II.2.3 Etude de l'activité antioxydante	37
II.2.4 Toxicité aiguë	39

Sommaire

III. Résultats et discussions	40
III.1 Rendement de l'extraction	40
III.2 Phyto-chimie	42
III.2.1 Polyphénols totaux	42
III.2.2 Résultat de l'analyse par HPLC	43
III.3 Activité antioxydante	44
III.4 Toxicité aiguë	46
Conclusion et Perspectives	47

Introduction

Introduction

Les plantes occupent depuis des millénaires une place privilégiée dans la médecine traditionnelle pour leurs effets thérapeutiques exceptionnels aussi bien chez l'Homme que chez l'animal, sans pour autant connaître leurs principes actifs, encore moins leurs mécanismes d'action. De nos jours, la phytothérapie et l'aromathérapie connaissent un regain d'intérêt, avec un désir de revenir aux moyens naturels et efficaces que sont les plantes comme substance biologique médicale tant pour l'Homme lui-même que pour ses animaux de rente et de compagnie (**Hallé F, 1999**).

Les recherches modernes ne font que redécouvrir ce savoir acquis au cours des siècles. En effet, de nombreux travaux ont pu démontrer l'activité et les modes d'action thérapeutiques des plantes médicinales (**Schawenberg P et Ferdinand P, 1977**).

Les molécules issues des plantes dites naturelles sont considérées comme une source très importante de médicaments, sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel (**Bérubé-Gagnon J, 2006**).

Les plantes possèdent des milliers de substances actives contenant dans leurs organes (feuilles, fleurs, fruits, racines,...) et nous pouvons, selon divers techniques les extraire et de les exploiter pour soigner diverses maladies. Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires que les médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Bougandoura N et Bendimerad N, 2013**).

Actuellement l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'environ 80% des habitants du monde ont recours à la médecine traditionnelle à base de plante en tant que soins de santé primaire (**OMS, 2012**).

Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de la filière des plantes aromatiques et médicinales est devenue indispensable, nous nous sommes donc intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités biologiques d'une plante du nord Algérien, Il s'agit de *Marrubium vulgare*, plante dont les usages sont très anciens, et qui a été le sujet de nombreuses études ces dernières années.

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'étudier *in vitro* l'activité antioxydante de l'extrait acetonique du *Marrubium vulgare* et d'évaluer la toxicité aiguë de la plante sur un modèle murin.

Notre étude se divise en deux parties :

Dans la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à citer quelques connaissances bibliographiques concernant l'espèce *Marrubium vulgare*, et les processus d'évaluation de la composition phytochimique de la plante, et enfin une brève revue sur le stress oxydatif et l'importance des antioxydants.

La deuxième partie, a été consacrée à une étude *in vitro* de la teneur en polyphénols totaux et individuels, l'évaluation des activités antioxydantes totales en utilisant une méthode classique, qui est la méthode du test DPPH, ainsi qu'une l'évaluation de la toxicité de la plante sur des souris.

Partie Bibliographique

Chapitre I

La Phytothérapie

I. La Phytothérapie

I.1 Définition

Étymologiquement, du grec « *phyton* » qui signifie plante et « *therapein* » qui signifie soigner. La phytothérapie est l'utilisation de plantes à des fins thérapeutiques (**Sophia J, 2015**).

La Phytothérapie peut donc se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et / ou à traiter certains troubles fonctionnels et /ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes (décoction, infusion, cataplasme...) (**Wichtl M et Anton R, 2003**).

La phytothérapie est cependant souvent confondue avec l'homéopathie ou du moins sans faire ressortir les différences. La phytothérapie existe depuis la nuit des temps et tire ses ressources exclusivement des plantes en utilisant des posologies courantes et classiques.

L'homéopathie, par contre, est une discipline d'apparition récente, introduite par Hahnemann, il y a deux siècles environ ; qui consiste à traiter les maladies par l'administration de produits issus du règne animal, végétal ou minéral, qui produisent sur l'homme sain des symptômes semblables à ceux que l'on veut combattre chez l'homme malade et cela à doses infinitésimales (**Moatti R et al., 1983**).

Et aussi important de ne pas confondre cette discipline avec la phytopharmacie qui, quant à elle, désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes, à savoir les pesticides, fongicides, herbicides, ou encore insecticides (**Prescrire, 2007**).

I.2 Historique

Les origines de la phytothérapie remontent à la plus haute Antiquité, puisqu'on a retrouvé une tablette d'argile datant de 3000 ans avant Jésus-Christ, portant le premier texte connu sur les propriétés médicinales des plantes. On sait ainsi que les Sumériens utilisaient déjà le myrte, le chanvre, le thym et le saule en décoctions filtrées.

Les civilisations de l'Égypte ancienne, les Grecs et les Romains se soignaient également avec des plantes (**Audrey, 2007**).

I.3 Différents types de phytothérapie

I.3.1 Aromathérapie

Est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau (**Strang C, 2006**).

I.3.2 Gemmothérapie

Se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les racicelles (**Strang C, 2006**).

I.3.3 Herboristerie

Correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée, elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération (**Strang C, 2006**).

I.3.3.1 Décoction

Cette méthode d'extraction de principes actifs consiste à fractionner les parties de la plante, généralement les plus dures (racines, graines, écorces), puis les mettre dans une eau froide et porter l'ensemble à ébullition quelques minutes (**Morel J. M, 2008**).

I.3.3.2 Macération

C'est un procédé qui consiste à laisser séjourner les parties de la plante dans un liquide à froid pendant plusieurs heures à fin d'obtenir les principes actifs solubles dans l'eau. La macération peut se faire dans de l'eau, de l'alcool ou des huiles (**Morel J. M, 2008**).

I.3.3.3 Infusion

Une opération qui consiste à verser une eau préalablement chauffée sur la plantes en la laissant infuser quelques minutes libérant ainsi leurs substances. Aujourd'hui l'infusion gagne un grand intérêt grâce à la phytothérapie, l'aromathérapie et la gemmothérapie (**Morel J. M, 2008**).

I.3.4 Phytothérapie pharmaceutique

Utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide (**Strang C, 2006**).

Les plantes médicinales et leurs extraits peuvent être utilisés sous les formes répertoriées dans le Tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1 : Formes galéniques utilisées en phytothérapie (Chabrier J. Y, 2010 ; Morel J. M, 2008 ; Wichtl M et al., 1999).

Présentation	Formes Galéniques
Formes solides	<ul style="list-style-type: none"> - Gélules - Comprimés - Capsules
Formes liquides	<ul style="list-style-type: none"> - Extraits Fluides - Teintures, Alcoolatures, Alcoolats - Teinture Mère - SIPF (Suspensions Intégrales De Plantes Fraiches) - Macérats Glycérines - Digestes Huileux Et Huiles Infusées - Sirops, Eau Distillée, Elixirs Floraux - Huiles Essentielles
Formes destinées à l'usage externe	<ul style="list-style-type: none"> - Pommades - Liniments - Gel - Décoction, Tisane - Huile Essentielle - Cataplasme

I.4 Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des espèces végétales actives sur la santé, et présentent un risque toxique faible dans les conditions normales d'utilisation. L'isolement de leurs constituants actifs n'est apparu qu'au XIX^{ème} siècle (**Fleurentin J *et al.*, 2008**).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (**Elqaj M *et al.*, 2007**).

Toute fois la plante nécessite une vérification rigoureuse de la garantie d'identité botanique, c'est-à-dire que la plante soit botaniquement et biochimiquement définie (**Laurain Mattar D, 2014**).

I.4.1 Propriétés des plantes médicinales

La phytothérapie à une action comparable aux et les molécules de synthèse, agissent sur les mêmes récepteurs pharmacologiques (**Fleurentin J, 2013**). Cependant il existe des différences concernant les points suivants :

Les plantes sont sources de substances naturelles tandis que les médicaments d'allopathie sont en grande partie issus de la chimie de synthèse, le médicament allopathique peut être rapide d'action et efficace ce qui est indiqué dans les cas aigus, le renouvellement des prises est fréquent en phytothérapie car il n'existe pas de formes à libération prolongée, et l'action des plantes est polyvalente car elles renferment plusieurs principes actifs (**Hallé F, 1999**).

D'une manière générale, il est fortement conseillé d'utiliser précocement la phytothérapie pour une action plus rapide et plus efficace (**Labre P, 2012**).

I.5 Phytothérapie en médecine vétérinaire

Les plantes médicinales occupent une place privilégiée dans le soin des animaux, en particulier pour leur rôle dans le soutien des fonctions métaboliques, leur action sur les fonctions biologiques et les mécanismes de régulation, mais aussi par leur propriétés vastes et variées : anti-infectieuses, anti-inflammatoires, antiparasitaires, action sur les troubles digestifs, cutanés, immunitaires, comportementaux. Dans les pathologies graves et aiguës, la phytothérapie n'est cependant pas utilisée seule, mais représente un excellent adjuvant aux médicaments chimiques (**Labre P, 2012 ; Marsden S et Wynn S, 2002 ; Morel J. M, 2008**).

I.5.1 Spécialités vétérinaires à base de plantes**Tableau 2** : Utilisations de la phytothérapie en médecine des animaux de compagnies.

Indication	Plante	Partie/ extrait utilisé	Utilisation	Référence
Parasitoses externes	Litsée citronnée Lavande Vraie Giroflier	Huile essentielle	Usage externe (Shampooing)	Dudok van Heel M, 2001
Parasitoses internes	Cannelle de chine Origan compact Clou de girofle	Huile essentielle	Voie orale	May P, 2014
Drainage hépatique	Menthe poivrée Citron Céleri Romarin	Teinture mère	Voie orale/ capsule molle	Lippert G, 2009
Coryza aigu du chat	Eucalyptus radié Inule odorante Niaouli	Huile essentielle	Voie respiratoire / huiles infusées (nébulisation)	May P, 2014
	Cyprès Réglisse Echinacée	Huile essentielle	Voie orale	
Stimulation de la fonction hépatobiliaire	Artichaut Chardon marie Pissenlit Romarin	Teinture mère	Voie orale	Delbecque V et Heitz, F, 2007
Constipation	Graines de lin	Décoction	Voie orale	Labre P, 2012
Coliques du cheval	Estragon Basilic exotique	Huile essentielle	Usage externe	Baudoux D et al., 2014
Mammite	Palmarosa Tea-tree Eucalyptus citronné Laurier noble	Huile essentielle	Usage topique mélangé avec huile de sésame Huile de noisette	Baudoux D et al., 2014

	Cyprès Thym à thymol		Huile de tournesol	
Stimulation des contractions	Giroflier Palmarosa	Huile essentielle	Voie orale/ sirop	Labre P, 2012

Chapitre II

Marrubium vulgare

II. *Marrubium vulgare***II.1 Définition**

Marrubium vulgare est une plante herbacée vivace de la famille des *Lamiaceae* originaire d'Afrique du nord, d'Europe et d'Asie (**Guinet A, 2011**).

II.2 Taxonomie**Tableau 3** : Place du taxon dans la classification (**APG III, 2009**).

Règne	Végétale
Sous règne	Plantes vasculaire
Embranchement	Spermatophytes
Division	Magnoliophytes
Classe	Magnolipsides
Sous classe	Asteridees
Ordre	Lamiales
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Vulgare</i>
Nom binomial	<i>Marrubium vulgare</i>

II.3 Description botanique

C'est une plante herbacée, vivace à odeur de thym au froissement, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles. Sa hauteur varie de 40 à 60 cm.

Les feuilles sont ovales arrondies, souvent un peu cordées à la base, gaufrées et crénelées, feutrées à la face intérieure. Les fleurs sont petites et blanches (12-15 mm de long), organisées en corolle à 2 lèvres, l'inférieure trilobée, la supérieure à 2 lobes et en calice à 10 dents courtes, crochues, et placées en verticilles denses à l'aisselle des feuilles supérieures. (**Schlempher V et al., 1996**).



Figure 1 : Marrube Blanc « *Marrubium vulgare* » (Heit A, 2011).

II.4 Répartition géographique

Originnaire d'Afrique du nord, d'Europe et d'Asie, la plante se trouve surtout en région méditerranéenne et a été introduite en Amérique (**Bonnier G, 1990**).

On la trouve surtout sur les bords des chemins, dans des prés secs, des lieux incultes, des décombres et des terrains vagues. Assez commun à assez rare dans les régions siliceuses et assez rare à rare sur les sols calcaire (**De Souza M. M et al., 1998**).

II.5 Aspect historique

La saveur amère de la plante donne l'explication du nom, en effet, « marrube » trouve son origine dans le mot hébreux « marrob », *mar* signifiant amer et *rob* signifiant suc (**Delaveau P et Michelle L, 1985**).

Selon d'autres auteurs, le nom latin « *Marrubium* » serait dérivé de *Maria urbs*, une ville antique Romaine.

Dans l'Égypte Ancienne, *Marrubium vulgare* était déjà reconnue pour ses propriétés apaisantes contre la toux (propriétés expectorantes et mucolytiques). Les prêtres Égyptiens l'utilisaient également comme insectifuge et comme antidote contre plusieurs poisons, et lui donnaient le nom de « graine de Horus » (en référence au Dieu Égyptien du ciel et de la lumière), « sang du taureau » ou encore « œil de l'étoile ». Le nom anglais de cette plante, « White Horehound », est dérivé du Dieu Égyptien Horus (**Guiet A, 2011**).

Les Grecs de l'Antiquité l'utilisaient contre les morsures de chiens enragés. Le médecin grec Dioscoride (40-90 apr. J.C.) la préconisait en décoction pour soigner la tuberculose, l'asthme et la toux. Elle était déjà considérée comme le traitement spécifique des affections de l'appareil respiratoire dans l'Égypte ancienne et la Grèce antique (**Koscielny J et al., 1999**).

Au premier siècle, le médecin romain Aulus Cornelius Celsus indique que les propriétés antiseptiques de cette plante peuvent être utilisées pour traiter les affections respiratoires. Il recommande l'utilisation du « jus de marrube ». Lucius Iunius Moderatus Columella, agronome romain du milieu du premier siècle expliquait comment utiliser cette plante chez des animaux de ferme pour traiter les ulcères, vers et croûtes.

En médecine ayurvédique (Inde), chez les aborigènes d'Australie et les Amérindiens d'Amérique du Nord, *Marrubium vulgare*, servait à traiter les infections des voies respiratoires (**Guiet A, 2011**).

Au deuxième siècle, Galien recommandait son utilisation pour traiter la toux et les maladies respiratoires.

John Gerard, herboriste élisabéthain anglais du XVIème siècle, recommandait dans son ouvrage paru en 1597 sur l'histoire des plantes et de leurs utilisations « Herbal or General History of Plants », son usage sous la forme de sirop pour traiter les « sifflements respiratoires » et comme antidote de certains poisons (**Lhoste J, 1989**).

Nicholas Culpepper, médecin herboriste anglais du XVIIème siècle, préconisait son utilisation, dans son ouvrage de 1652 intitulé « The English Physitian », pour évacuer la « toux muqueuse », traiter le rhume chez les personnes âgées, et plus particulièrement les asthmatiques et les personnes ayant le « souffle court » (**Lhoste J, 1989**).

Jean-Emmanuel Gilibert (1741-1814), homme politique et botaniste Français, disait du marrube blanc qu'il s'agissait « d'une des meilleures plantes d'Europe » (**Lhoste J, 1989**).

Jusqu'en 1900, la Pharmacopée des Etats-Unis reconnaissait l'usage de *Marrubium vulgare* pour traiter les affections des voies respiratoires. Cependant, l'apparition des antibiotiques pour traiter ce type d'affections fait que la plante n'est aujourd'hui plus utilisée dans cette indication en Amérique du Nord. Par ailleurs, en 1989, la Food and Drug Administration (FDA) a même interdit l'utilisation de la plante pour le traitement de la toux compte tenu de l'absence d'essais cliniques chez l'homme. Cependant, la plante est toujours inscrite dans les Pharmacopées Nationales en Europe. Ainsi, un grand nombre de pastilles et de sirops en renferment. Par ailleurs, la plante sert encore de nos jours à aromatiser certaines confiseries (**Guiet A, 2011**).

En Juillet 1999, des études ont été effectuées à l'université de Eskishir en Turquie pour identifier les composants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* où 46 constituants ont été identifiés représentant 91,3 % de l'huile essentielle. Les composés majoritaires sont β -Caryophyllène (23,2 %), Z - β - Farnessène (13,5 %) et Germacrène D (10,3 %) (**Sahpaz S et al., 2002**).

En juin 2002, des chercheurs français isolaient d'ailleurs dans la plante un glucoside jusqu'alors inconnu, le marruboside (**Sahpaz S et al., 2002**).

II.6 Usages traditionnels

Les usages traditionnels de *Marrubium vulgare*, qui en découlent sont nombreux :

- ✓ La décoction de la plante est employée comme antidiabétique, elle est prescrite également comme anti-typhoïdique, anti-diarrhéique, fébrifuge, anti-ictérique, expectorant, tonique et stimulant (pour les malades alités) (**Bellakhdar J, 1997**).
- ✓ En usage externe, la plante hachée et couramment utilisée en cataplasmes sur le front et les tempes contre les fièvres, et sur les abcès (**Bellakhdar J, 1997**).

II.7 Composition moléculaire et importance

Marrubium vulgare est une plante riche en principes actifs dont voici la liste et les principales structures moléculaires (**Alkhatib R et al., 2010**).

II.7.1 Lactones diterpéniques labdaniques

Les lactones diterpéniques sont des dérivés des diterpènes (20 atomes de carbone) avec une fonction lactone. Le *Marrubium vulgare* présente la Marrubiine et Marrubénol. La Marrubiine, majoritaire, est présente sous en partie sous sa forme de son précurseur préfuranique, la pré-marrubiine (**Jean B. M, 2009 ; Guet A, 2011**).

II.7.2 Les Flavonoïdes

Le *Marrubium vulgare* est caractérisé par sa richesse en flavonoïdes notamment les hétérosides flavoniques (*O*- et *C*- hétérosides de flavones), lactate de flavones glycosylées et flavonoliques du quercétol, de la lutéoline et de l'apigénine, lactoylflavones, dérivés de l'acide ursolique (**Jean B. M, 2009 ; Alkhatib R et al., 2010**).

II.7.3 Les Tanins

Les tanins sont également des polyphénols mais de structure plus complexe que celle des flavonoïdes, ayant la capacité de précipiter les protéines. Ils sont présents essentiellement dans les écorces (**Paris M et Hurabielle M, 1981**). Les tanins spécifiques des lamiacées sont les dérivés de l'acide hydroxycinnamique : acide chlorogénique, acide caféique, acide caféylquinique. (**Guet A, 2011**).

II.7.4 Huile essentielle

Une huile essentielle est un produit odorant, volatile, non gras, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie par distillation ou par expression à froid. Composé pour le *Marrubium vulgare* de monoterpènes (<0,1%) : α -pinène, camphène, limonène, sabinène, para-cymène, para-fenchène... (**Laurain-Mattar, 2014**).

II.7.5 Mucilages

Les mucilages sont des polysaccharides c'est à dire des polymères de glucides ou polyosides. Ces derniers entrent dans la composition du *Marrubium vulgare* (**Guiet A, 2011**).

II.7.6 Composés azotés

Caractéristiques de la famille des *Lamiaceae* sont la choline, stachydrine et bétonicine (**Guiet A, 2011**).

II.7.7 Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Acides chlorogénique, caféique, caféylquinique (**Sevenet T, 1994**).

II.8 Propriétés de *Marrubium vulgare*

Un grand nombre des propriétés traditionnellement attribué à *Marrubium vulgare*, ont été confirmées par une intensive recherche moderne couplée à différents essais cliniques, tels que les effets :

- ✓ **Anti-pyrétique** : L'infusion chaude aide à faire tomber la fièvre, lorsque la quinine est inefficace, elle est proposée contre la malaria (**Weel K. G. C et al., 1999**).
- ✓ **Anti-athérogènes** : L'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* augmenterait le transport inverse du cholestérol médié par les HDL, ceci de façon dose-dépendante dans les macrophages (**Berrougui H et al., 2006**).
- ✓ **Anti-oxydantes** : la propriété antioxydante du *Marrubium vulgare* a été mise en évidence par les travaux de recherche mené par (**Berrougui H et al., 2006**). En effet La consommation d'aliments riches en phénols et polyphénols peut réduire le risque de maladie cardiovasculaire en diminuant la progression de l'athérosclérose principalement en protégeant les LDL de l'oxydation (**Duffy S. J et Vita J. A, 2003**).
- ✓ **Anti-inflammatoire** : La propriétés anti-inflammatoires (en particulier inflammation des voies respiratoires), ont été mises en évidence par (**Sahpaz S et al., 2002**).

- ✓ **Cholérétique** : Augmentation de la sécrétion biliaire. Cette propriété est due à l'acide marrubique qui est obtenue par ouverture de la fonction lactonique de la marrubiine en milieu alcalin (**Bellakhdar J, 1997**).
- ✓ **Hypoglycémiant** : Cet effet a été démontré par un extrait hydroalcoolique de *Marrubium vulgare* sur des lapins, les résultats obtenus montrent une réduction de la glycémie de l'ordre de 25,8% (**Román R.R et al., 1991**).
- ✓ **Analgésique** : Une activité antinociceptive est démontrée par les travaux de (**Otuki M. F et al., 2005 ; Ribeiro de Jesus A et al., 2000**).
- ✓ **Anti-oedémogène** : Des extraits organiques de cette plante présentent un effet diurétique (**Stulzer H. K et al., 2006**).
- ✓ **Anti-hypertensive** : Il a été rapporté un effet anti-hypertensif de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* sur des rats, et cela par une action vaso-relaxante (**El Bardai S. et al., 2003**).
- ✓ **Insecticide et Vermifuge** : Cette dernière propriété est démontrée par (**Pavela R et al., 2004**).
- ✓ **Anti-spasmodiques** : Sur les fibres musculaires lisses, contre les désordres intestinaux, activité démontrée par (**Schlemper V et al., 1996**).
- ✓ **Anti-arythmique** : La plante est présentée pour avoir des effets chronotrope négatif, bathmotrope négatif et des propriétés parasympholytiques (**Duffy S. J et Vita J. A, 2003 ; Vigneau C, 1985**).
- ✓ **Anti-tumorale** : Des extraits organiques de cette plante ont également montré une activité anti-tumorale (**Belayachi L, 2015**).

Chapitre III

Radicaux libres et stress oxydatif

III. Radicaux libres et stress oxydatif

III.1 Stress Oxydatif

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Un stress oxydatif survient lorsque l'équilibre est rompu en faveur des radicaux libres. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydants / antioxydants (**Christophe P et Christophe S, 2011 ; Papazian L et Roch A, 2008**).

III.2 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, contenant un ou plusieurs électrons libres « électron non apparié sur une orbitale », ce qui lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**Goudable J et FavierA, 1997**).

Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres partagent pour caractéristique d'avoir un électron libre sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERN) (**Smirnoff N, 2005**).

Nous abordons dans ce chapitre les ERO uniquement.

III.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2% de molécules d'oxygène (**Edeas M, 2005**). L'oxygène peut s'avérer délétère en raison de son caractère oxydant, il est à l'origine de la formation de dérivés plus réactifs appelés espèces réactives de l'oxygène (**Ichai C et al., 2011**).

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires (**Delattre J et al., 2005**).

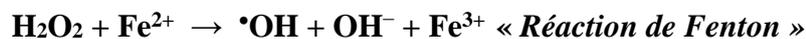
III.2.1.1 Les espèces oxygénées réactives radicalaires

✓ Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$) (**Koechlin-Ramonatxo C, 2006 ; Al-Mamun M et al., 2007**).

✓ Radical hydroxyl ($\bullet OH$)

Il est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours de la réaction d'Haber-Weiss : (**Koppenol W. H, 2001 ; Haber F, 1932**).



Réaction net :



Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques. Il est capable de réagir avec presque tous les composants cellulaires par échange d'électron, addition sur les doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène, c'est un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique en biologie et serait à l'origine de la production des radicaux libres secondaires, suite à sa réaction avec différents composés cellulaires (**Lacolley P, 2007**).

Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (**Hennebelle T, 2006**).

✓ Radical peroxyde (RO_2^{\bullet})

C'est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical R \bullet . Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle (**Rezaire A, 2012**).

✓ Radical secondaire alkoxyde (RO^{\bullet})

Est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO $_2$ H, issu de l'oxydation de substrat RH, par des cations métalliques (**Rezaire A, 2012**).

III.2.1.2 Les espèces oxygénées réactives non-radicalaires

✓ Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

Qui est la forme diamagnétique de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Choe E Min D. B, 2005 ; Hennebelle, 2006).

✓ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui n'est pas un radical libre peut être formé secondairement à la dismutation de ($\text{O}_2^{\bullet -}$) par la superoxyde-dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment l'acyl CoA déshydrogénase, la NADH déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'uricase, la mono-amine-oxydase...etc (Jadot G, 1994).



✓ Acide hypochlorique (HOCl)

Issu de la conversion du peroxyde d'hydrogène à des concentrations physiologiques par la myéloperoxydase. L'HOCl peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines (Sumaya M et M. T, 2004).

III.3 La production de radicaux libres par l'organisme biologique

La production des EOR dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles mais est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NADPH oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (Rezaire A, 2012).

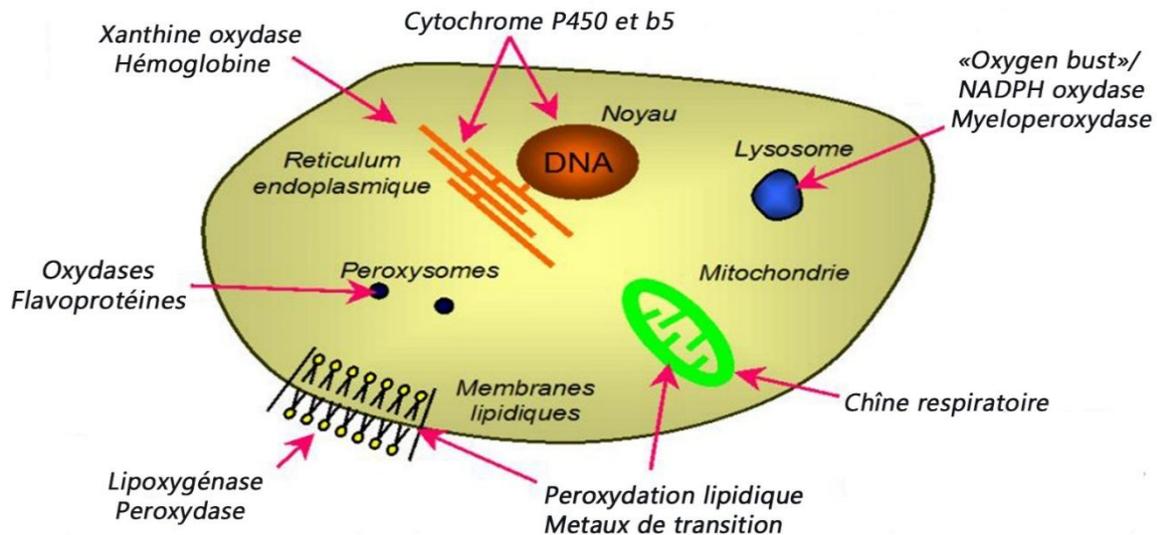


Figure 2 : Source cellulaire de radicaux libres (Prost M, 2013).

La mitochondrie est le siège majoritaire de la synthèse des radicaux superoxydes (Turrens J. F, 1997 ; Guidot D. M *et al.*, 1995).

Durant la respiration, quatre électrons sont ajoutés à l'oxygène par le complexe IV de la chaîne respiratoire, cependant l'oxygène peut être réduit en formant des espèces réactives de l'oxygène telles que $O_2^{\bullet-}$ et HO^{\bullet} . La production de ces espèces réactives est nettement accélérée lors de la réduction du flux respiratoires notamment au cours de maladies génétiques (Lacolley P, 2007).

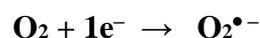
- ✓ La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon :



- ✓ Les cytochromes P450, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde :



D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde, les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène et les lipo-oxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique qui permettent notamment la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydroperoxydes d'acide gras insaturés (**Delattre J *et al.*, 2005d**).

Par ailleurs, au cours de la défense antibactérienne, les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire vont produire un grand nombre d'ERO. De plus, il y a production massive d'anion superoxyde par le mécanisme leucocytaire. C'est la flambée respiratoire, les NO synthases, à l'origine du radical NO•, peuvent sous certaines conditions produire également des anions superoxydes (**Delattre J *et al.*, 2005b ; Valko M *et al.*, 2006**).

III.4 Facteurs influençant la production des ERO

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Tableau 4 : Facteurs influençant la production des ERO (**Haleng J et al., 2007**).

<p>Mode de vie</p> <ul style="list-style-type: none"> Tabagisme Faible consommation en fruits et légumes Alcool Médicaments Pilule contraceptive Exposition au soleil Exercice intense ou mal géré
<p>Environnement</p> <ul style="list-style-type: none"> Pollution Ozone Amiante Radiations Contacts avec des substances cancérogènes
<p>Mécanismes biochimiques</p> <ul style="list-style-type: none"> Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) Inflammation Altération de la fonction endothéliale Surcharge en fer Oxydation de l'hémoglobine Altérations mitochondriales Biosynthèse des prostaglandines Interventions chirurgicales (Circulation extra-corporelle, transplantations)

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérogènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes...). Les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, 1O_2 et d' H_2O_2 l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (**Sumaya M. et M. T, 2004**).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels...), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (**Mena S *et al.*, 2009**).

Le seul facteur commun favorisant le stress oxydant est l'âge, dans la mesure où le vieillissement affaiblit les réponses antioxydantes et perturbe la respiration mitochondriale (**Sohal R. S *et al.*, 2002**).

III.5 Mécanismes de défense contre le stress oxydatif

III.5.1 Systèmes antioxydants endogènes

III.5.1.1 Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine), majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) (**Haleng J *et al.*, 2007**). Il est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO•, RO₂•, RO•, ¹O₂, ONOO•, des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl (**Rezaire A, 2012b**).

III.5.1.2 Acide lipoïque

Présente des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant les HO•, RO₂•, l'HOCl et l'¹O₂. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (**Packer L *et al.*, 2001; Panfili G *et al.*, 2003; Smith A. R *et al.*, 2004**).

III.5.1.3 La bilirubine

Capable de piéger RO₂• et l'oxygène singulet. Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Haleng J *et al.*, 2007**).

III.5.1.4 Acide urique

Piégeur puissant de radicaux (•OH, RO₂•, NO₂•...). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (**Haleng J *et al.*, 2007**).

III.5.2 Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (**McCall M. R et Frei B, 1999**).

III.5.2.1 Les vitamines

Les vitamines antioxydants sont notamment les vitamines A, C et E et les précurseurs de la vitamine A « bêta-carotènes » (Retsky K. L *et al.*, 1999 ; Kaiser S *et al.*, 1990).

III.5.2.2 Les caroténoïdes

Sont des pigments issus des plantes et microorganismes, leurs activité antioxydante leur permet de réagir avec les radicaux ROO[•], HO[•], O₂^{•-}, R[•] par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (Valko *et al.*, 2006).

III.5.2.3 Polyphénols

Les composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Schroeter H *et al.*, 2002; Leopoldini M *et al.*, 2011).

III.5.2.4 Les Oligoéléments

Le cuivre, le zinc et le sélénium ne sont pas des antioxydants en tant que tels, car ils ne peuvent piéger les radicaux libres, mais ils jouent un rôle primordial comme cofacteurs des réactions de défense de l'organisme contre le stress oxydatif (Haleng J *et al.*, 2007).

III.6 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, nommées d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres, par exemple : FRAP (Ferric reducing antioxidant power), TEAC (Trolox équivalent antioxidant capacity) ou ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6- sulphonate) et DPPH (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) etc... Il est à indiquer que différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devraient être appliquées préférentiellement pour la comparaison de produits similaires (Georgieva S *et al.*, 2010).

Nous abordons dans ce présent chapitre uniquement le test au DPPH.

III.6.1 Test au DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois M. S, 1958 ; Brand-Williams W *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 21) (Popovici C *et al.*, 2009).

✓ Le principe

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux P et Songklanakarin J, 2004).

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazine) de couleur jaune (Figure 6) (Maataoui B. S *et al.*, 2006).

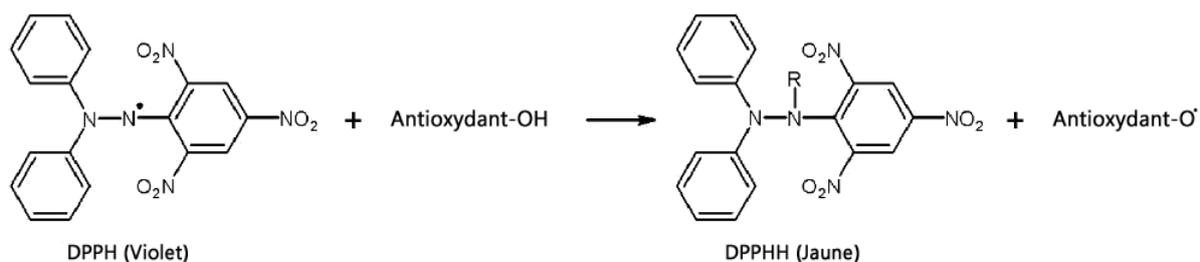


Figure 3 : Réaction de test DPPH (Djahra A. B, 2014).

Chapitre IV

Méthodes d'analyses des composés phénoliques

IV. Méthodes d'analyses des composés phénoliques

IV.1 Les composés phénoliques

Comme la majorité des métabolites secondaires, les polyphénols et essentiellement les flavonoïdes sont synthétisés pour accomplir certaines fonctions lors du développement de la plante. En terme de fonction protectrice, ils défendent la plante contre les pathogènes tels que les moisissures, les champignons et les bactéries. Ils assurent sa protection contre le rayonnement ultraviolet. Certains d'entre eux sont des répulsifs qui inhibent la croissance d'autres espèces. Les polyphénols jouent un rôle structural comme la lignine constituant la rigidité du bois (**Buchanan B *et al.*, 2000 ; Druyne T, 1999**). Ils participent à la coloration des fleurs et des fruits à fin d'attirer les insectes pollinisateurs qui transportent les graines dans les fruits (**Buchanan B *et al.*, 2000**).

IV.1.1 Classification des composés phénoliques

Les polyphénols peuvent être répartis en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes :

IV.1.1.1 Les non flavonoïdes

Cette classe contient plusieurs composés chimiques, parmi lesquels : les acides phénoliques, les stilbenes hydroxylés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones (**Ghnimi W, 2015**).

IV.1.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. A présent plus de 6000 composés ont été identifiés soit environ 50% des polyphénols. Ces composés ont une structure de base formé de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (**Lobstein A, 2010**).

IV.2 Méthodes d'analyses

IV.2.1 Teneur en phénols totaux

Le dosage des phénols totaux est basé sur l'oxydation des composés phénoliques et le développement d'une coloration. La méthode la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu, méthode spectrophotométrique basée sur la réduction d'un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

L'inconvénient de la méthode de Folin-Ciocalteu est qu'elle donne des teneurs surestimées en raison des interférences avec d'autres composés comme la vitamine C et les sucres, éventuellement, qui réduisent aussi le réactif de Folin (**Sanoner P, 2001 ; Neveu V et al., 2010 ; Ignat I et al., 2011**). Pour cette raison, on a proposé la purification de l'extrait brut avant la détermination de la teneur en phénols totaux afin d'éliminer les acides organiques et les sucres (**Li B. B et al., 2006 ; Gerorgé S et al., 2005**).

IV.2.1.1 Teneur en flavonoïdes totaux

Plusieurs méthodes sont à disposition pour mesurer la teneur en flavonoïdes totaux :

- ✓ Une méthode colorimétrique basée sur la complexation des composés phénoliques avec le trichlorure d'aluminium Al (III).
- ✓ la méthode au bleu de Prusse : méthode spectrophotométrique proche de la méthode de Folin, parfois utilisée pour la quantification des tanins. (**Pérez-Jiménez J et al., 2010**).

IV.2.2 Analyses chromatographiques

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation est basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, une phase stationnaire ou fixe et une phase mobile (**Lavallaz P et Déléroz R, 1994**).

✓ Le Principe

La chromatographie consiste à entraîner les différentes molécules contenues dans un mélange pour les séparer en fonction de leurs vitesses d'élutions. Les molécules sont adsorbées sur un support fixe qui est la phase stationnaire et désorbées par l'éluant. Il y a donc une distribution ou partition des composants du mélange plus ou moins rapide entre ces deux phases. Les différents constituants du mélange sont récupérés séparément dans plusieurs fractions (**Panaiva L, 2006**).

Deux types de chromatographies sont couramment utilisés dans des travaux de recherche, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Dans notre présent travail seule l'HPLC sera détaillé.

IV.2.2.1 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance consiste à exploiter les interactions des solutés avec deux phases l'une mobile et l'autre stationnaire sous haute pression. Les solutés sont séparés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'affinité du soluté dans l'éluant, la polarité ou la charge électrique. Après leur séparation, les solutés sont identifiés et dosés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique (**Panaiva L, 2006**).

Le mode de fonctionnement de la HPLC est largement décrit. Ainsi, à un instant donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne, et se trouve entraîné par la phase mobile. Les constituants du mélange sont ensuite recueillis et identifiés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption.

La chromatographie aboutit à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne : c'est un chromatogramme (**Panaiva L, 2006**).

IV.2.2.1.1 Appareillage

Selon Panaiva (2006), la HPLC est composée des éléments suivants :

- ✓ **La colonne** : généralement c'est un tube en acier de 5 à 15 cm de longueur et de diamètre de 5 mm qui contient une phase stationnaire. Il existe plusieurs types de phases stationnaires parmi lesquelles on trouve principalement :
 - Les silices non greffées
 - Les silices greffées par des groupements polaires pour lesquelles l'éluant utilisé est apolaire. On parle alors de chromatographie en phase normale.
 - Les silices greffées par des groupements apolaires (chaines carbonées linaires plus ou moins longues), pour lesquelles l'éluant utilisé est polaire, dans ce cas il s'agit de chromatographie en phase inverse.
- ✓ **Injecteur** : il est constitué d'une vanne haute pression appelé vanne rhéodyne et d'une boucle d'échantillonnage d'une capacité comprise entre 10 et 50 μ l. Cette boucle permet une fois remplie de déposer l'échantillon à l'entrée de la colonne sans perte de pression.
- ✓ **La pompe** : elle permet d'introduire la phase mobile dans l'appareil sous un débit constant et à forte pression.
- ✓ **Détecteur** : il existe plusieurs types de détecteurs. Parmi les quels, des détecteurs à absorptiométrie dans l'UV-Visible, des réfractomètres différentiels ou des détecteurs électrochimiques.

- ✓ **Intégrateur** : La chromatographie est une méthode de séparation utilisée en vue d'un dosage. Il faut donc avant tout chercher à séparer correctement les pics avant de les intégrer. Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic.

La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres :

- Largeur attendue des pics
- Le seuil d'intégration (sensibilité)

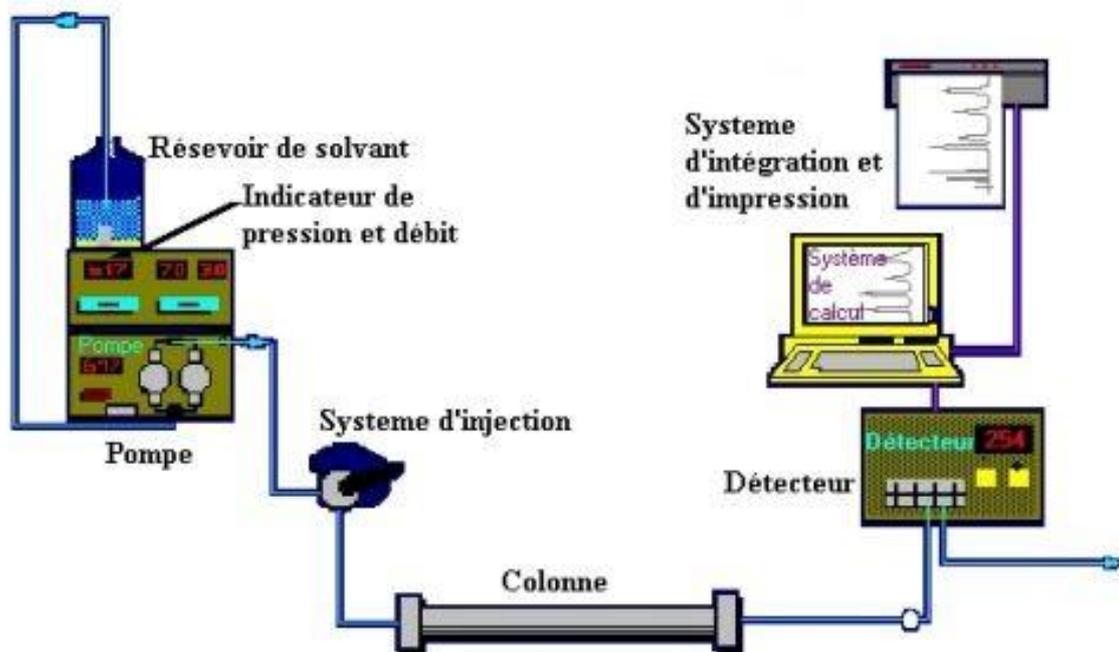


Figure 4 : HPLC Principe et appareillage (Anonyme, 2010).

IV.2.2.1.2 Analyse

- ✓ **L'analyse qualitative** : permet d'identifier les différents constituants d'un mélange. Elle est réalisée par comparaison des temps de rétentions (R_t en min) à ceux d'étalons commerciaux élues dans les mêmes conditions.

- ✓ **L'analyse quantitative** : est basée sur le calcul des aires des pics du chromatogramme. Ces aires sont proportionnelles aux concentrations des produits analysés. Pour un composé déterminé, la comparaison de l'aire à celle de l'étalon correspondant permet de le quantifier. A cet effet, une courbe d'étalonnage qui présente l'aire en fonction de la concentration est établie. L'injection ultérieure du même volume (v) de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de déterminer la masse ou la concentration de l'échantillon.

Partie Expérimentale

Objectif & Matériels et Méthodes

I. Objectif de l'étude

L'Homme a su acquérir la connaissance des plantes et de leurs propriétés thérapeutiques à travers les médecines traditionnelles riches d'une expérience accumulée depuis les temps les plus anciens et qui ont évolué avec les différentes civilisations.

Le but du présent travail est de valoriser une plante médicinale locale de la famille des lamiacées « *Marrubium vulgare* » et ce par l'analyse phyto-chimique, l'évaluation de l'activité antioxydante et étude de la toxicité aiguë sur souris.

Notre partie expérimentale a été principalement réalisée au niveau du laboratoire SPA « Santé et Production Animal » de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Matériels de laboratoire

- Tubes à essai
- Portoir tubes à essai
- Tubes coniques
- Portoir pour tubes conique
- Béchers
- Entonnoirs
- Erlenmeyers
- Eprouvette graduée
- Pipette graduée
- Micropipette et cônes
- Pipette type pip-lab
- Spatule
- Plateau en plastique
- Sécateur
- Passoire
- Cage pour souris
- biberons
- Sonde de gavage
- Papier filtre

II.1.2 Appareillage

- Broyeur
- Agitateur
- Centrifugeuse
- Balance de précision
- Vortex
- Spectrophotomètre

II.1.3 Réactifs

- Acétone
- TWEEN 80
- Eau physiologique
- Méthanol
- Solution DPPH (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) à 0.0004%
- Quercétine
- Réactif de Folin ciocalteu
- Carbonate de sodium, Na_2CO_3

II.1.4 Animaux de laboratoire

- Souris Balb/c obtenues de l'Institut Pasteur d'Alger, acclimatées dans des cages en polypropylène recouverte d'une grille en acier, maintenues à une température de 24°C et à un taux d'humidité de 50%, nourries avec des granulés spécialement dédiés aux rongeurs et de l'eau *ad-libitum*.

II.1.5 Matière végétale

Marrubium vulgare appartient à la famille des lamiacées et pousse à l'état spontané dans différentes régions d'Algérie.

Les parties aériennes *Marrubium vulgare* ont été récoltées à partir d'un site de la Daïra de Larbaa Nath Irathen situé à 36° 38' 12" Nord, 4° 12' 24" Est. Le site fait partie de la wilaya de Tizi Ouzou qui appartient à un milieu tempéré avec un climat méditerranéen caractérisé par une saison humide et une saison sèche.

La matière végétale a été séchée à l'ombre pendant 7 à 15 jours et préservée à l'abri de l'humidité jusqu'à extraction.

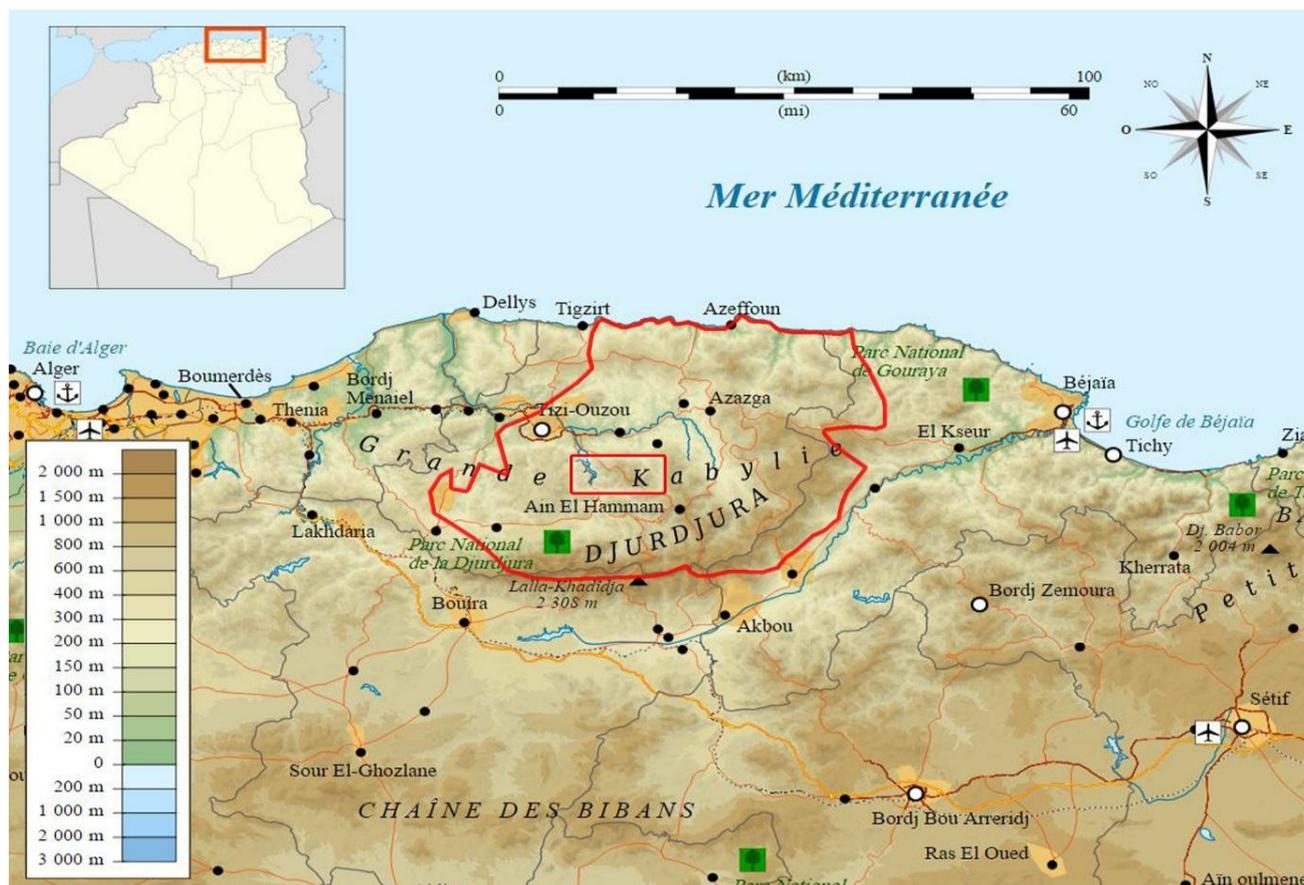


Figure 5 : Localisation géographique de la zone d'étude NASA Shuttle Radar Topography Mission (SRTM3 v.2) (domaine public).

L'identification de la plante a été réalisée au niveau du Département de Botanique de l'école Nationale supérieure d'Agronomie.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation de l'extrait brut acétonique

Les parties aériennes de la plantes sont soumises à un broyage manuel afin d'obtenir une poudre prête à l'emploi. 1.5 g de cette dernière sont macérés dans un tube conique avec 15 mL d'acétone sous agitation douce pendant 5 minutes à température ambiante puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 minutes. L'extrait hydro alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide de papier filtre. Le mélange acétone/eau est éliminé du filtrat par évaporation dans une étuve, permettant ainsi d'obtenir un résidu caractérisé par une couleur verte foncée. Le résidu obtenu est conservé à l'obscurité à une température de 4°C.



1 : Matière végétale séchée



2 : Matière végétale broyée



3 : Matière végétale tamisée



4 : Macération acétonique



5 : Agitation



6 : Centrifugation



7 : Récupération du surnageant et filtration



8 : Extrait brute après évaporation

Figure 6 : Les différentes étapes de l'extraction.

II.2.2 Phyto-chimie

II.2.2.1 Dosage des polyphénols totaux

Les phénols totaux de l'extrait acétonique de *Marrubium vulgare* ont été quantifiés au niveau du laboratoire SPA par la méthode de folin ciocalteu.

✓ Le protocole

– Préparation de la gamme étalon d'acide gallique et de l'extrait à doser

Une gamme étalon d'acide gallique a été générée, 1 mg d'acide gallique a été dissous dans 1 ml d'méthanol et des dilutions en demi en ensuite été effectuée.

Une solution de 10 mg/ml à partir de l'extrait acétonique dissous dans du méthanol a été préparée.

– Procédure opératoire

Pour cela 100 µl de la gamme étalon ainsi que de la solution de l'extrait acétonique de *Marrubium vulgare* précédemment préparée sont mélangés à 6 ml d'eau dans le quels 500 µl du réactif de Folin sont ajouté. Ensuite 1.5 ml de la solution carbonate de sodium (Na_2CO_3) sont ajoutés au mélange, enfin on complète jusqu'au trait de jauge de 10 ml avec de l' H_2O .

Les tubes sont ensuite incubés 90 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La densité optique est ensuite mesurée à une longueur d'onde de 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique par ml d'extrait.



1 : Préparation des dillutions



2 : Préparation gamme étalon



3 : Rajout des reactifs



4 : Vortex



5 : Réaction



6 : Réaction après incubation



7 : Transfert dans une cuve



8 : Lecture au spectrophotomètre

Figure 7 : Dosage des polyphénols totaux.

II.2.2.2 HPLC

L'analyse HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) en phase inverse a été réalisée dans le cadre d'une prestation.

Le détecteur était un détecteur barrette de diodes (Shimadzu, Kyoto, Japon). La chaîne HPLC était contrôlée par un logiciel de LC solution.

✓ Le protocole

La concentration de l'extrait est de 10 g/l dans du DMSO à 10% (v/v, eau). 20 µL d'échantillon ont été directement injectés en HPLC à l'aide d'un passeur d'échantillons automatique. La colonne Omnispher C18 Chromsep, 110 Å (250 x 4,6 mm, 5 µm) (Agilent technologies, France) montée dans un four maintenu à 30 ° C, a été utilisée.

La phase mobile utilisée est l'eau acidifiée (pH 2,65) à l'acide acétique (éluant A) et l'acétonitrile (éluant B), à un débit d'écoulement de 1,2 ml /min-1, selon un gradient donné ; %B (0,1% de 0 à 35 min, 24% de 35 à 40 min, 40% de 40 à 45 min, 80% de 45 à 60 min, et 0,1% de 60-65 min).

Les différents composés phénoliques ont été quantifiés à une longueur d'onde de (190-600 nm) a fin de couvrir à la fois leurs différents spectres d'absorbance.

II.2.3 Etude de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait du *Marrubium vulgare* a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche SPA par la méthode « Free radical Scavenging Activity » FRSA.

✓ le protocole

– Préparation de la solution de DPPH

Une solution de DPPH à 0,0004 % est préparée soit 0,4 mg de DPPH sont dissous dans 100 ml de méthanol, la solution ainsi préparée est préservée à l'abri de la lumière.

– Préparation gamme quercétine

Une gamme de quercétine variant de 0.4 mg/ml à 0.0000078 mg/ml est préparée, 0.4 mg de quercétine sont dissous dans 1ml d'méthanol et des dilutions en demi ont ensuite été effectuée.

– Préparation gamme extrait

40 mg de l'extrait brute de *Marrubium vulgare* ont été dissous dans 1ml de méthanol et des dilutions en demi en ensuite été réalisées.

– **Procédure opératoire**

50 μl des solutions étalon et test préalablement préparée sont ajoutée à 1250 μl de solution de DPPH à 0,0004 %. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement au vortex et est ensuite incubé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant une durée de 30 minutes.

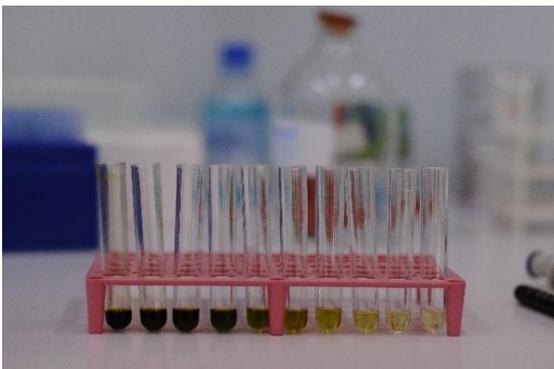
Les absorbances à 517 nm ont été enregistrées par spectrophotométrie.



1 : Préparation de la solution DPPH



2 : Préparation game extrait



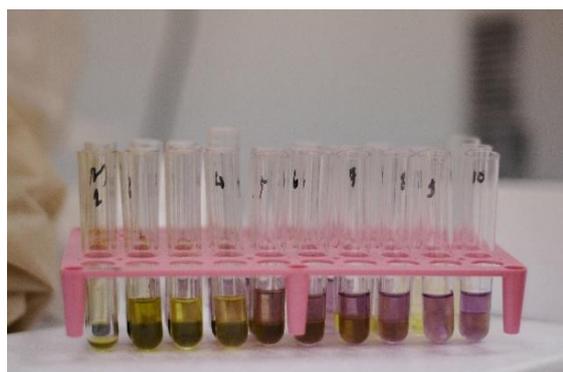
3 : Dillutions



4 : Rajout des reactifs



5 : Vortex



6 : Réaction après incubation

Figure 8 : Test au DPPH.

II.2.4 Toxicité aiguë

Au niveau du laboratoire SPA nous avons procédé à un gavage intra-gastrique des souris par une dose unique de l'extrait du *Marrubium vulgare* à une concentration décrite comme la dose qui risque à 50 % de tuer un être vivant dite dose létale 50 ou DL50.

✓ Le protocole

Les souris étaient déjà acclimatées puis séparées en deux lots l'un témoin composé de 5 individus et l'autre est composé de 10. L'extrait du *Marrubium vulgare* est solubilisé dans de l'eau physiologique/tween 80 à une concentration de 0,1%.

Le lot témoin a été traité avec une solution d'eau physiologique/tween 80, Les souris de l'autre lot ont subi un gavage de 0.5 cc de la solution de *Marrubium vulgare* à raison de 2000 mg/kg de poids vif.



1 : Souris acclimatées



2 : Sonde intragastrique



3 : Solution de gavage



3 : Gavage

Figure 9 : Test de la toxicité aiguë.

Résultats et Discussions

III. Résultats et discussions

III.1.1 Rendement de l'extraction

L'extrait a été obtenu par extraction à l'acétone selon la méthode d'Eloff (2000).

12 g de poudre de matière végétale sèche de *Marrubium vulgare* ont permis l'obtention de 1.029 g d'extrait soit un rendement de 8.57%, cette valeur reste acceptable par rapport à d'autres méthodes d'extraction utilisant d'autres solvants et des temps variables. Le (Tableau 5) résume les rendements obtenus pour le *Marrubium vulgare* par différentes méthodes d'extractions.



Figure 10 : Extrait acétonique du *Marrubium vulgare*.

Tableau 5 : Rendements obtenus par différentes méthodes d'extractions.

Solvant utilisé	Méthode d'extraction	Quantité de la matière sèche extraite	Rendement obtenu	Références
Acétone	Macération 5 min	12g	8.57%	Notre échantillon
Méthanol	Macération 24 h	14.98g	3.60%	Ouchemoukh N et al., 2014
Méthanol 99%	Macération 1 semaine	29.44g	22.50%	Khodja N et al., 2014
Ethanol	Macération 24h	50g	11.44%	Djahra et al., 2013

A l'analyse des différentes informations que fournit ce tableau, il s'avère que notre rendement soit légèrement inférieur aux autres, ceci pourrait s'expliquer par la différence dans la méthode d'extraction (macération sur des durées plus longue et utilisation d'autre solvant).

Le méthanol et l'éthanol semblent engendrer de meilleurs rendements.

I.1 Phyto-chimie

I.1.1 Polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été estimés comme équivalents d'acide gallique (GAE) et exprimés en mg GAE / g de matière sèche.

Les données ont été obtenues à partir des densités optiques obtenues pour la gamme étalon de l'acide gallique utilisé comme produits de référence et qui ont permis de tracer une courbe de calibration : $y = 1,1264x - 0,0009$ (y correspond à la DO, et x à la concentration).

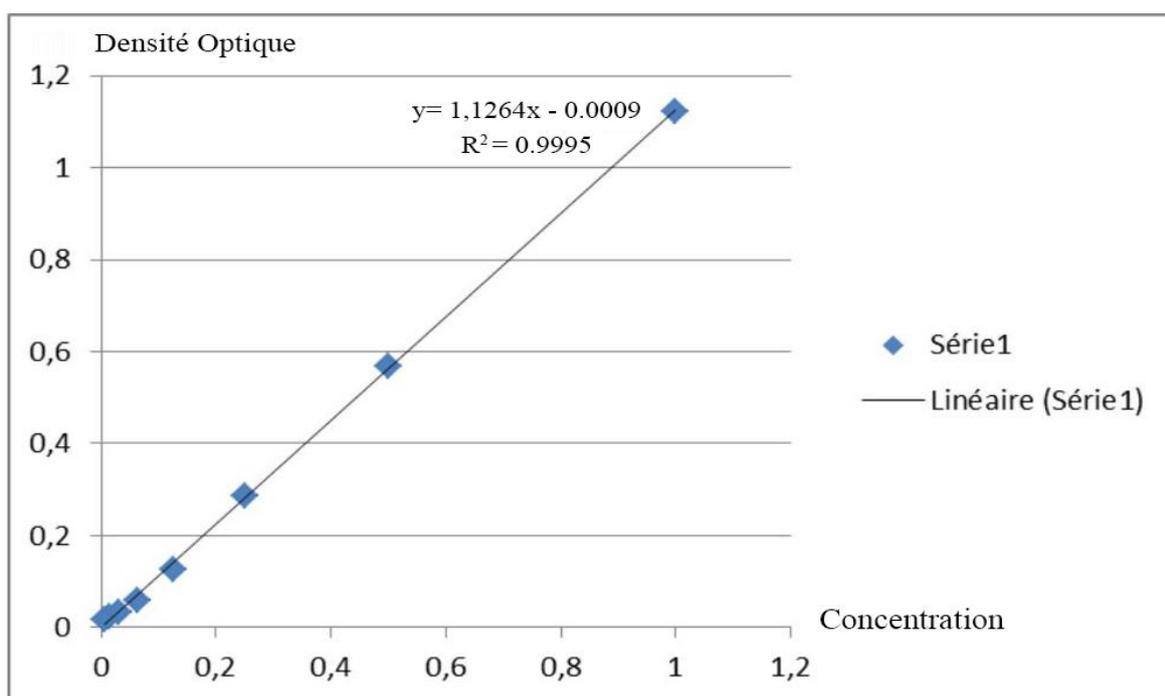


Figure 11 : Courbe de de calibration de la gamme étalon.

La densité optique de l'extrait du Marrube d'une concentration de 10mg / ml est de 1,091

Soit une teneur de 8,23 mg GAE / g de matière sèche.

Plusieurs études ont rapporté la présence de composés phénoliques dans l'extrait de *Marrubium vulgare*, leur quantité peut varier en fonction des méthodes d'extraction, en effet, les extraits méthanoliques semblent être plus riches que les extraits obtenus par un autre solvant. De plus, il peut être affecté par le génotype, les conditions de développement et de croissance, la maturité et les conditions de stockage des plantes. (Ghedadba N *et al.*, 2014 ; Meyre-Silva et Cechinel-Filho V 2010 ; Khodja N *et al.*, 2014 ; Ouchemoukha N *et al.*, 2014).

III.2.2 Résultat de l'analyse par HPLC

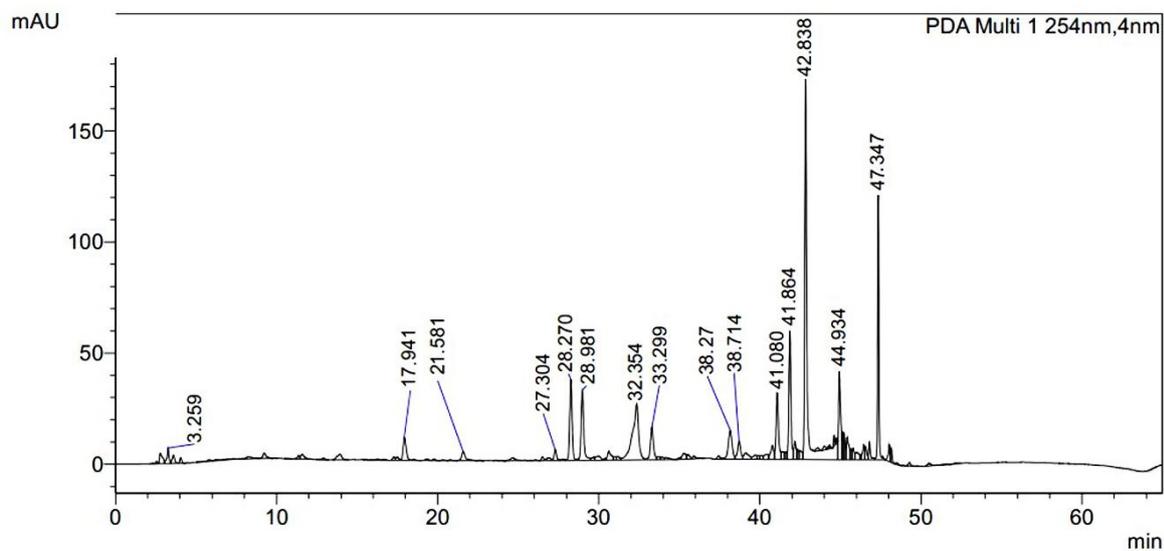


Figure 12 : Chromatogramme HPLC de l'extrait brut acétonique de *Marrubium vulgare*.

Le chromatogramme obtenu par HPLC est représenté dans la (figure 12) et présente la séparation des différents composés présents dans l'extrait, ainsi plus de 120 pics en été mise en évidence représentant chacun, un composé différent. Les résultats détaillés sont présentés en annexe.

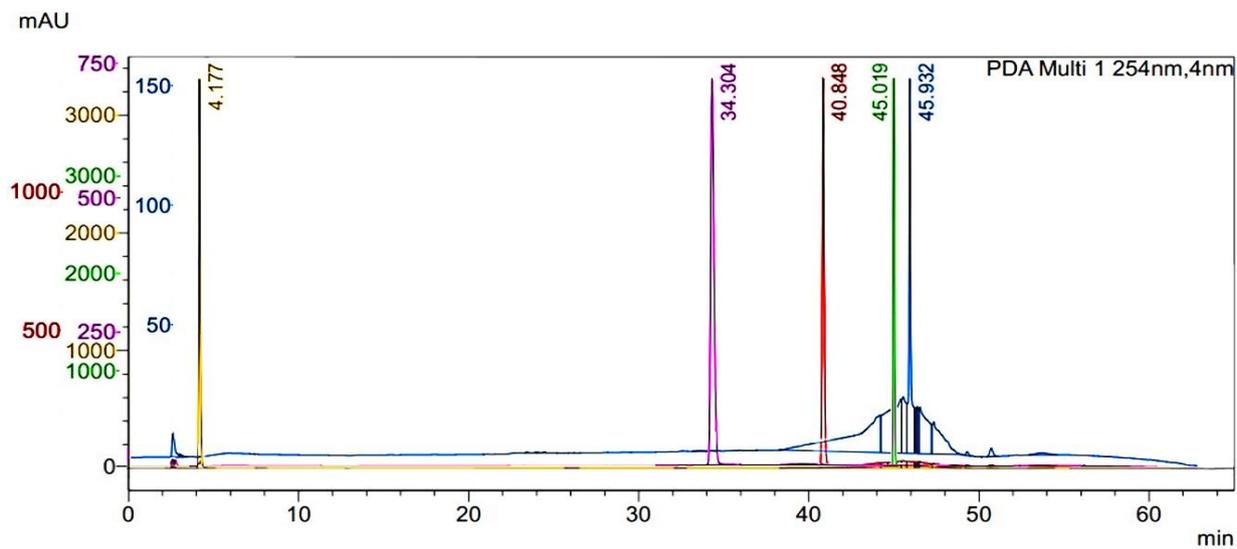


Figure 13 : Chromatogramme Etalons HPLC.

Les étalons utilisés parallèlement à cette analyse étant Acide gallique, Butyl gallate, Crysin, Pinosylvin et le Resveratrol. Illustré via le chromatogramme sur la (figure 13), ne correspondent pas aux pics obtenus dans l'extrait, cependant, la comparaison avec l'analyse HPLC des chromatogrammes obtenu au cours des différents travaux précédemment réalisés par (Boulila A *et al.*, 2015 ; Ouchemoukh *et al.*, 2014 ; Boudjelal *et al.*, 2011), montre des temps de rétention similaires notamment au : Rt 21.85 correspondant aux Verbascoside, Rt 41.86 correspondant au Ladanein, Rt 42.83 à l'acide Coumarinique et Rt 44.93 au Marrubinol, nous laisse supposer à la correspondance de nos pics et donc à leurs présences dans notre extrait. Les résultats détaillés sont présentés en annexe.

III.3 Activité antioxydante

L'effet du piégeage du DPPH a été calculé comme pourcentage de la décoloration de DPPH en utilisant l'équation suivante :

$$I(\%) = \left[\frac{(A_{\text{blanc}} - A_{\text{echant}})}{A_{\text{blanc}}} \right] \times 100$$

- $I(\%)$: est le pourcentage d'inhibition des radicaux libre du DPPH.
- A_{blanc} : est l'absorbance du DPPH à blanc.
- A_{echant} : est l'absorbance de la réaction (DPPH X échantillon) – absorbance de la solution méthanolique du *Marrubium vulgare*.

Les résultats obtenus sont répertoriés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 6 : Résultats de l'effet antioxydant du *Marrubium vulgare*.

Concentration (mg/ml)	Inhibition des radicaux libre du DPPH (%)
40	94.32
20	93.04
10	92
5	91.65
2.5	48.43
1.25	14.94
0.625	12.63
0.312	9.03
0.156	5.9
0.078	3.47

Tableau 7 : Résultats de l'effet antioxydant de la quercétine.

Concentration (mg/ml)	Inhibition des radicaux libre du DPPH (%)
0.4	95.59
0.2	94.9
0.1	92
0.05	84.82
0.025	52.25
0.0125	29
0.00625	14.38
0.003125	6.14
0.000156	1.5
0.0000078	0.81

L'IC₅₀ (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC₅₀ (*Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres du DPPH (**Torres et al., 2006**).

Le tableau ci-dessous exprime IC 50 marrube et quercétine.

Tableau 8 : Concentration inhibitrice 50 du DPPH.

Solution	IC 50
Marrube	2.7 mg/ml
Quercétine	0.022 mg/ml

Nos résultats indiquent que l'extrait brut Acétonique de *Marrubium vulgare* présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH avec un IC₅₀ de 2.7 mg/ml, notamment du fait de sa richesse en polyphénols totaux, connu pour leur effets antioxydant notables, aussi, la complexité des extraits bruts en substances polyphénoliques y compris les tanins et les flavonoides et la synergie entre eux peut expliquer une meilleure activité antioxydante (**Vermerris W et al., 2006**).

les travaux réalisés par (**Orhan et al., 2010**), affirment que l'extrait méthanolique est moins actif que l'extrait acétonique de la même espèce.

III.4 Toxicité aiguë

Après gavage intra gastrique les souris sont observées pendant 4 heures pour toutes modification comportementale ou signe clinique, puis pendant 30 min chaque jours, et soumises à des contrôles pondéraux réguliers d'un intervalle de 3 jours durant une période de 15 jours. Les souris ont été nourries par des granulés formulés pour rongeurs et de l'eau *ad-libitum*.

Les résultats obtenus présentant l'évolution du poids des souris sont noté sur le (tableau 9).

Tableau 9 : l'évolution du poids des souris.

jours	Lot marrube	Lot témoin
0	25.9 g	24.2 g
3	26.4 g	25.1 g
6	25.8 g	22.5 g
9	26.6 g	23.6 g
12	26.5 g	23.6 g
15	26.1 g	23.5 g

On remarque que le poids des souris du lot marrube n'a pas subis de variation négative, et aucune mortalité n'a été relevé, aucun signe clinique de neuro-toxicité ou autre n'a été observé.

Les propriétés attribuées à cette plante n'ont, semble-t-il, fait l'objet d'aucun essai clinique publié. On ne dispose d'aucune donnée toxicologique sur cette plante. La présence de diterpène furanique incite à une grande prudence dans son utilisation (**Jean B, 2009**).

Cette études nous a permis d'arreter une DL50 supérieure à 2 g/kg. D'aprèr le système de classification globalement harmonisé des substance chimique, notre extrait ce situe dans la categorie des substances peu ou pas toxiques.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Les plantes médicinales n'ont pas encore totalement levé le secret sur leurs nombreuses richesses moléculaire, et leurs activités thérapeutiques.

Les analyses quantitatives, du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin ciocalteu révèlent la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols.

Le potentiel antiradicalaire de l'extrait de *Marrubium vulgare* a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces composants possèdent une bonne activité, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydants et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques. Ainsi, les récentes études portant sur *Marrubium vulgare*, tendent à prouver que cette plante pourrait être une solution supplémentaire dans la prévention du stress oxydatif.

Aucun rapport bibliographique n'a porté un effet toxique de la plante.

Nous concluons à travers notre étude préliminaire de toxicité aigüe que le *Marrubium vulgare* a peu d'effet toxique. Cependant d'autre évaluation de la toxicité à long terme devrait être effectuée.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Alkhatib R., Joha S., Cheok M., Roumy V., Idziorek T., Preudhomme C., Quesnel B., Sahpaz S., Bailleul F., Hennebelle T, 2010 : Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare* ; *Planta Medica* 76 ; 86-87p .

Al-Mamun, M., Yamaki, K., Masumizu, T., Nakai, Y., Saito, K., Sano, H. & Tamura, Y. 2007 : Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern japan determined using electron spin resonance spectrometry. *Int. J. Biol. Sci.* 3, 349-355.

Anonyme, 2010 : *Biotechnologie & Biologie et Physiopathologie humaine* - Académie de Rouen.

APG III, 2009 : An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plantes : APG III. *Bot. J. Linn. Soc.* 105-121 p.

Audrey, 2007 : *La Phytothérapie.*"

<http://www.gralon.net/articles/santeetbeaute/medecinedouce/article-la-phytotherapie-429.htm>" Consulté le 18/03/2017 à 14h00.

B

Baudoux, D., Baudry, F. et Debauche, P. 2004 : *Les Cahiers Pratiques d'Aromathérapie selon l'Ecole Française.* Paris : Inspir Development. Vol. 3 Vétérinaire. 314 p.

Belayachi lamiae, 2015 : characterization of the anti-tumor activity of *inula viscosa*, *retama monosperma*, *marrubium vulgare* and *ormenis eriolepis* extracts from north africa: morocco.

Bellakhdar. J, 1997 : *Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires, La pharmacopée marocaine traditionnelle.* Ed. Le Fennecet Ibio Press, impression : Dunes France. 341 p.

Berrougui H., Isabelle M., Cherki M., Khalil A. 2006 : *Marrubium vulgare* extract inhibit human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage ; *Life Sciences* 80 : 105-112 p.

Bérubé-Gagnon Jérôme, 2006 : *Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de Picea mariana.* Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi.

Blois M.S, 1958 : Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181,1199-1200 p.

Références bibliographiques

Bonnier G, 1990 : La grande Flore française Ed.Bllin ; Complète. Tome : 09. 25-26. La Végétation de la France, Suisse et Belgique.

Bougandoura N., Bendimerad N., 2013 : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technologie. 15 p.

Boudjelal Amel, Cherifa HENCHIRI , Laura Siracusa , Madani Sari , Giuseppe Ruberto, 2011 : Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion.

Boulila Abdennacer, Adnen Sanaa, Issam Ben Salem, Nesrine Rokbeni, Yassine M'rabet, Karim Hosni, Xavier Fernandez. 2015 : Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae)

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995 : Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 25-30 p.

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R, 2000 : American Society of Plant Physiologists, chapitre, 1250-1318 p.

C

Chabrier Jean-Yves, 2010 : *Plantes Médicinales Et Formes D'utilisation En Phytothérapie*. 78-147 p.

Choe, E. et Min D. B. 2005 : Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science*, 142-159 p.

Christophe, P. & Christophe S. 2011 : *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*, 84 p.

D

De Souza M.M. et al., 1998 : analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium*, *Phytomedicine*, 103-107 p.

Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot 2005 : Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. 23p.

Références bibliographiques

Delaveau Pierre, Michelle Lorrain, 1985 : François Mortier. Secrets et vertus des plantes médicinales ; Editions Sélection du Reader's Digest, Livre de 463 pages.

Delbecque, V. et Heitz, F, 2007 : Soignez vos animaux par les plantes. Aubagne : Quintessence. 224 p.

Djahra A. B., Bordjiba. O., Benkherara., S, 2013 : Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L).

Druyne, T, 1999 : Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol*, 445-59 p.

Dudok van Heel, M, 2001 : Essentiële oïlen voor honden en paarden. Amsterdam : De Driehoek. 128 p.

Duffy S.J., Vita J.A. 2003 : Effects of phenolics on vascular endothelial function ; *Current Opinion in Lipidology*, 21-27 p.

E

Edeas, M. 2005 : Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé. Alpen Editions s.a.m, 18 p.

El Bardai S., Morel N., Wibo M., Fabre N., Llabres G., Lyoussi B. 2003 : The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare* ; *Planta Medica*, 75-77 p.

Eloff J. N. 2000 : a proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care in south Africa. 116-18 p.

Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D, 2007 : La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

Références bibliographiques

F

Fleurentin, J, 2013 : Du bon usage des plantes qui soignent. Rennes : Ouest France. 384 p.

Fleurentin, J., Hayon, J.C. et Pelt, J.M, 2008 : Plantes médicinales : Traditions et thérapeutiques. Rennes : Ouest France. 192 p.

G

Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, 2014 : Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12 15 p.

Georgé, S., Brat, P., Alterand, P., Amio, M.J. 2005 : Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food*

Georgieva S, Boyadzhiev L., Angelov G, 2010 : Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydant. *Revue de génie industriel*. 124-132 p.

Ghimi Wafa, 2015 : Etude phytochimique des extraits de deux euphorbiacées : ricinus communis et jatropha curcas evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acetylcholinestérase, 26-42 p.

Goudable, J. & Favier, A. 1997 : Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 115-120 p.

Guidot, D. M., Repine, J. E., Kitlowski, A. D., Flores, S. C., Nelson, S. K., Wright, R. M. & McCord, J. M. 1995 : Mitochondrial respiration scavenges extramitochondrial superoxide anion via a nonenzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*, 1131-1136 p.

Guiet Antony, 2011 : L'apport De *Marrubium Vulgare* Dans La Prévention Du Risque Cardiovasculaire, Thèse Pour Le Diplôme D'état De Docteur En Pharmacie, Université De Nantes, Faculté De Pharmacie.

Références bibliographiques

H

Haleng J., J. Pincemail , J.O. Defraigne , c. cHarlier , J.P. Chapelle, 2007 : Le stress oxydant Rev Med Liege, 628-638 p.

Hallé, F., 1999 : Eloge de la plante. Paris : Editions du Seuil, 346 p.

Heit Alice, 2011 : aquarelle, botanique, dessin botanique, illustrations de prés marrube blanc, Marrubium vulgare.

Hennebelle Thierry, 2006 : Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants, thèse de doctorat en chimie organique et moléculaire, université des sciences et technologie de lille – lille 1.

I

Ichai, C., Quintard, H. & Orban, J.-C. 2011 : Désordres métaboliques et réanimation : de la physiopathologie au traitement, Edition Springer, 427 p.

Ignat Ioana, Irina Volf, Valentin I Popa, 2011 : critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables.

J

Jadot G, 1994 : Antioxydants et vieillissement, Edition John Libbey Eurotext, 35 p.

Jean Baptiste M, 2009 : Effets du Marrube blanc: Marrubium vulgare sur certains paramètres sériques.

Jean B, 2009 : Pharmacognosie 786-788 p.

K

Kaiser, S., P. Di Mascio, M. E. Murphy et H. Sies 1990 : Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. Archives of Biochemistry and Biophysics, 101-108 p.

Références bibliographiques

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*, 165–177 p.

Koppenol, W.H. 2001 : The Haber-Weiss cycle – 70 years later . *Redox Report*. 229–234 p.

Koscielny J., Klüssendorf D., Latza R., Schmitt R., Radtke H., Siegel G., Kieseewetter H, 1999 : The Antiatherosclerotic effect of *Allium sativum* ; *Atherosclerosis*, 237-249 p.

Khodja Nabyla, Lila Boulekbache-Makhlouf, Khodir Madani. 2014 : Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae.

L

Labre, P, 2012 : Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval Tome 2. Thônes : FEMENVET. Vol. 2. 352 p.

Lacolley, P. 2007 : Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, 312 p.

Laurain Mattar, D, 2014 : Phytothérapie Introduction. Nancy : Université de Lorraine. 2 p.

Laurain-Mattar, D. 2014 : Huiles essentielles et aromathérapie. Nancy : Université de Lorraine. 6 p.

Lavallaz, P., Déléroz, R, 1994 : Chromatographie, 1-14 p.

Leopoldini, M., N. Russo et M. Toscano 2011 : The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 288-306 p.

Lhoste J, 1989 : Le grand livre de la phytothérapie ; Editions Conseil +, Livre de 317 pages.

Li B. B., Smith B., Hossain Md. M. 2006 : Extraction of phenolics from citrus peels. I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*. 182-188 p.

Références bibliographiques

Lippert, G, 2009 : Médecine douce pour les animaux. Liège : Marco Pietteur Editions. 238 p.

Lobstein, A, 2010 : Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, 3-25 p.

M

Meyre-Silva C and Cechinel-Filho V, 2010 : A Review of the Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus Marrubium. 18 p.

Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S, 2006 : Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). Lebanese Science Journal. 3-8 p.

Marsden S. et Wynn S, 2002 : Manual of Natural Veterinary Medicine : Science and Tradition.

May P, 2014 : Guide Pratique de Phyto-Aromathérapie pour les animaux de compagnie. Paris Med'Com. 256 p.

McCall M. R. et B. Frei 1999 : Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? Free Radical Biology and Medicine, 1034-1053 p.

Mena S., A Ortega et J. M. Estrela, 2009 : Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 36-44 p.

Moatti R., Fouron R., Donadieu, Y, 1983 : La phytothérapie : thérapeutique différente. Paris, édition Librairie Maloine S.A., vol. 01, 245p.

Molyneux P., Songklanakarin J, 2004 : The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. SciencesTechnology, 211-219 p.

Morel, J. M, 2008 : Traité pratique de Phytothérapie. Paris : Grancher, 620 p.

Références bibliographiques

N

Neveu V1, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. 2010 : Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods.

O

Orhan E., Belhattab R., Senol F.S., Gülpinar A.R., Hosbas S., Kartal M., 2010 : Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia species*. *Industrial Crops and Products*, 566–571 p.

Ouchemoukh Nadia, Ibrahim Abu reidah, Rosa Quirantes-Piné, Antonio Segura Carretero. 2014 : Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria.

Otuki MF, Ferreira J, Lima FV, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos AR, Yunes RA, Calixto JB, 2005 : Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways.

P

Packer L., K. Kraemer et G. Rimbach 2001 : Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 888-895 p.

Panaiva, L, 2006 : Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. Conférence Eurocopter, 2-24 p.

Références bibliographiques

Panfili G., A. Fratianni et M. Irano 2003 : Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3940-3944 p.

Papazian, L. & Roch, A. 2008 : Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, 153 p.

Paris M. et Hurabielle M, 1980 : Abrégé de Matière Médicale (Pharmacognosie), Tome 1 Paris.

Pavela R. 2004 : Insecticidal activity of certain medicinal plants ; *Fitoterapia*, 745-749 p.

Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A., 2010 : Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols-An application of the Phenol-Explorer database. *Journal of Clinical Nutrition*, 112-120 p.

Popovici C. saykova i., tylkowski b, 2009 : Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 8 p.

Prescrire, 2007 : Bien utiliser les plantes en situations de soins, numéro spécial été, T. 27, n° 286.

Prost Michel, 2013 : Outils d'évaluation des effets écotoxicologiques directs et indirects des nanoparticules sur la santé.

R

Retsky, K. L., K. Chen, J. Zeind et B. Frei 1999 : Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 90-98 p.

Rezaire Aïra. 2012 : Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), Thèse pour le doctorat en Phytochimie, 48-50 p.

Ribeiro de Jesus A, Araújo I, Bacellar O, Magalhães A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM, 2000 : Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens.

Références bibliographiques

Román R.R., Alarcón A.F., Lara L.A., Flores S.J. 1991 : Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics ; Archives of Medical Research. 59-64 p.

S

Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F, 2002 : Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoids esters from Marrubium vulgare ; Journal of Ethnopharmacology. 389-392 p.

Sanoner Philippe, 2001 : Les polyphénols des pommes à cidre diversité variétales et oxydation.

Schauenberg Paul et Ferdinand Paris, 1977 : Guide des plantes médicinales.

Schlemper V., Ribias A., Nicolau M., Cechinel V. 1996 : Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of Marrubium vulgare on isolated tissues ; Phytomedicine 7. 103-107 p.

Schroeter H., C. Boyd, J. P. E. Spencer, R. J. Williams, E. Cadenas et C. Rice-Evans 2002 : MAPK signaling in neurodegeneration : Influences of flavonoids and of nitric oxide. Neurobiology of Aging, 861-880 p.

Sevenet T, 1994 : Plantes, molécules et médicaments. Nathan, CNRS éditions, paris.

Smirnoff, N. 2005 : Antioxidants and reactivities oxygen species in plants.

Smith A. R., S. V. Shenvi, M. Widlansky, J. H. Suh et T. M. Hagen, 2004 : Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. Current Medicinal Chemistry. 1135-1146 p.

Sohal R. S., Mockett R. J., Orr, W. C, 2002 : Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biology & Medicine, vol. 33, 575-586 p.

Sophia Jorite, 2015 : La phytothérapie, une discipline entre passé et futur : de l'herboristerie aux pharmacies d'éditées au naturel. 21-22 p.

Strang C, 2006 : Larousse médical. Ed Larousse.

Références bibliographiques

Stulzer HK, Tagliari MP, Zampirolo JA, Cechinel-Filho V, Schlemper V, 2006 : Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *Journal of Ethnopharmacology*. 379–384 p.

Sumaya Martinez, et M. T. 2004 : Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation. Doctorat en Microbiologie : 188 p.

T

Torres R., faini F., Modak B., Urbina F., Labbe´ C., Guerrero G., 2006 : antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*. 984–987 p.

Turrens, J. F. 1997 : Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*, 3-8 p.

V

Valko M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic et M. Mazur, 2006 : Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 1-40 p.

Vermerris W., Nicholson R., 2006 : Phenolic compound chemistry. Ed: SPRINGER. 1 – 70 p.

Vigneau C, 1985 : Plantes médicinales, Thérapeutique – Toxicité ; Editions Masson, Livre de 290 pages.

Références bibliographiques

W

Weel K.G.C. et al., 1999 : Antioxidant activity of Horehound (Marrubium vulgare L.) grown in Lithuania, 395 – 400 p.

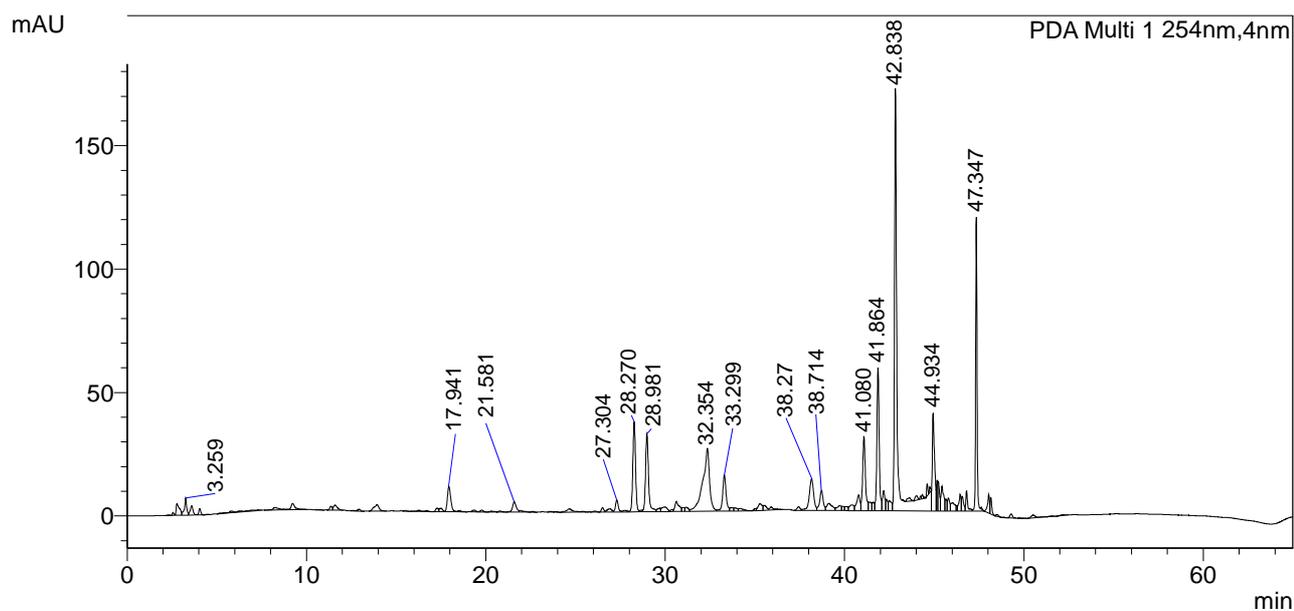
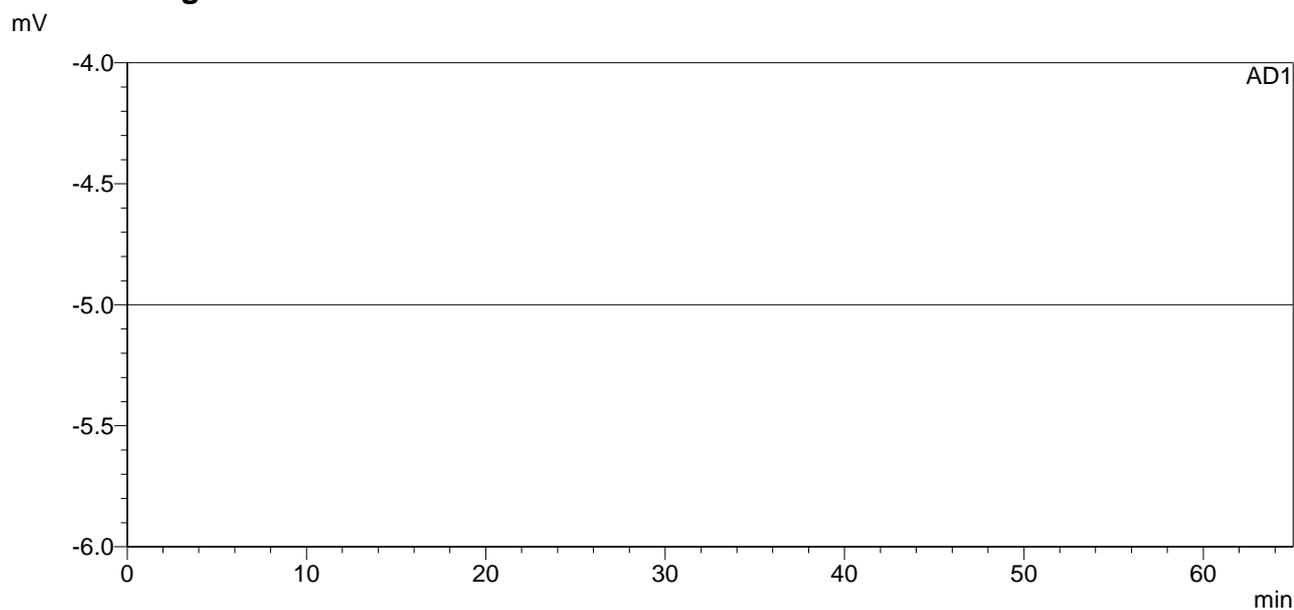
Wichtl M., Anton R, 2003 : Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Ed. TEC & DOC.

Annexes

<Sample Information>

Sample Name	: Extrait Marrube	Sample Type	: Standard
Sample ID	:	Level	: 1
Data Filename	: Marrubium vulgare	Acquired by	: Djaffer BOUARAB
Method Filename	: gradient polyphénols	Processed by	: Djaffer BOUARAB
Batch Filename	: essai 26 01 17.lcb		
Vial #	: 1-10		
Injection Volume	: 20 uL		
Date Acquired	: 26/01/2017 20:18:51		
Date Processed	: 27/01/2017 11:53:55		

<Chromatogram>



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	2.304	2456	270	0.000			
2	2.552	8497	1294	0.000		V	
3	2.779	60134	4714	0.000		V	
4	3.259	62007	7008	0.000		V	
5	3.599	41242	3851	0.000		V	
6	4.046	20987	2598	0.000		V	
7	4.478	1692	150	0.000			
8	5.206	3845	350	0.000			
9	5.408	3356	234	0.000		V	
10	5.803	11009	685	0.000		V	
11	6.208	3714	372	0.000		V	
12	6.370	4051	414	0.000		V	
13	7.017	9727	293	0.000		V	
14	7.310	2195	225	0.000		V	
15	7.733	1746	71	0.000			
16	8.245	22920	1047	0.000		V	
17	8.757	4334	343	0.000		V	
18	9.231	39878	2530	0.000		V	
19	9.835	1930	200	0.000		V	
20	10.657	2155	139	0.000			
21	11.367	14043	1482	0.000			
22	11.590	30219	1996	0.000		V	
23	12.576	1846	118	0.000			
24	12.931	8230	721	0.000		V	
25	13.932	52306	2611	0.000			
26	15.516	1726	178	0.000			
27	15.957	1351	109	0.000			
28	16.256	4682	424	0.000		V	
29	16.699	3235	291	0.000			
30	17.280	15478	1425	0.000			
31	17.485	18006	1435	0.000		V	
32	17.941	134430	10183	0.000		V	
33	18.521	7216	504	0.000		V	
34	19.334	9457	738	0.000			
35	19.775	8149	759	0.000		V	
36	20.295	3676	334	0.000			
37	20.459	2366	270	0.000		V	
38	20.771	5805	443	0.000		V	
39	21.581	60984	4131	0.000			
40	21.920	8271	663	0.000		V	
41	22.187	3574	355	0.000		V	
42	22.619	3178	280	0.000			
43	23.616	2349	217	0.000			
44	23.901	3002	248	0.000		V	
45	24.661	31981	1350	0.000			
46	25.099	2358	257	0.000		V	
47	25.402	3431	265	0.000		V	
48	26.061	5335	372	0.000			
49	26.505	17552	1872	0.000			
50	26.904	24442	1364	0.000		V	
51	27.304	53338	4931	0.000		V	
52	27.759	10383	613	0.000		V	
53	28.270	381725	36477	0.000		V	
54	28.661	6045	639	0.000		V	
55	28.981	364149	31468	0.000		V	
56	29.643	17294	1332	0.000		V	
57	29.965	41520	1862	0.000		V	
58	30.397	8556	890	0.000		V	

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
59	30.621	65206	4004	0.000		V	
60	30.987	17208	1621	0.000		V	
61	31.176	22007	1672	0.000		V	
62	32.354	668714	25449	0.000		V	
63	33.299	196611	14676	0.000		V	
64	33.702	17820	1439	0.000		V	
65	33.888	16953	1272	0.000		V	
66	34.187	20630	996	0.000		V	
67	35.008	7853	820	0.000			
68	35.287	45780	2763	0.000		V	
69	35.531	25466	1971	0.000		V	
70	35.908	14894	1206	0.000		V	
71	36.192	6167	414	0.000		V	
72	37.439	17930	1486	0.000			
73	38.161	217255	12791	0.000		V	
74	38.714	110930	8190	0.000		V	
75	39.123	62400	2928	0.000		V	
76	39.718	33535	1985	0.000		V	
77	39.893	15300	1796	0.000		V	
78	40.107	21184	1609	0.000		V	
79	40.426	41399	2326	0.000		V	
80	40.784	84527	6400	0.000		V	
81	41.080	318609	29975	0.000		V	
82	41.382	40661	3452	0.000		V	
83	41.603	29032	3435	0.000		V	
84	41.864	517705	57903	0.000		V	
85	42.177	74053	8203	0.000		V	
86	42.332	37762	4689	0.000		V	
87	42.493	50769	4102	0.000		V	
88	42.838	1892687	171084	0.000		SV	
89	43.237	1698	320	0.000		T	
90	43.621	19679	1416	0.000		T	
91	44.016	18548	1845	0.000		T	
92	44.238	7025	1297	0.000		TV	
93	44.340	9672	1780	0.000		TV	
94	44.463	2181	545	0.000		TV	
95	44.609	24920	4908	0.000		T	
96	44.757	10798	2237	0.000		TV	
97	44.934	358022	39572	0.000		V	
98	45.162	57753	12419	0.000		V	
99	45.227	78160	11924	0.000		V	
100	45.430	106834	10076	0.000		V	
101	45.654	31140	4844	0.000		V	
102	45.792	45827	5259	0.000		V	
103	45.996	55861	3395	0.000		V	
104	46.251	9667	2218	0.000		V	
105	46.445	56724	6820	0.000		V	
106	46.564	49844	5940	0.000		V	
107	46.801	59191	8206	0.000		SV	
108	47.347	642193	119117	0.000		SV	
109	47.618	4347	708	0.000		T	
110	48.040	59153	7588	0.000			
111	48.163	38936	6699	0.000		V	
112	48.493	7331	690	0.000			
113	48.866	1978	283	0.000			
114	49.286	14816	1628	0.000			
115	49.733	1556	228	0.000			
116	49.994	1137	125	0.000		V	
117	50.518	17814	1140	0.000			
118	50.976	3071	159	0.000		V	
119	51.541	4092	209	0.000		V	
120	52.182	5963	312	0.000			

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
Total		8176540	784957				

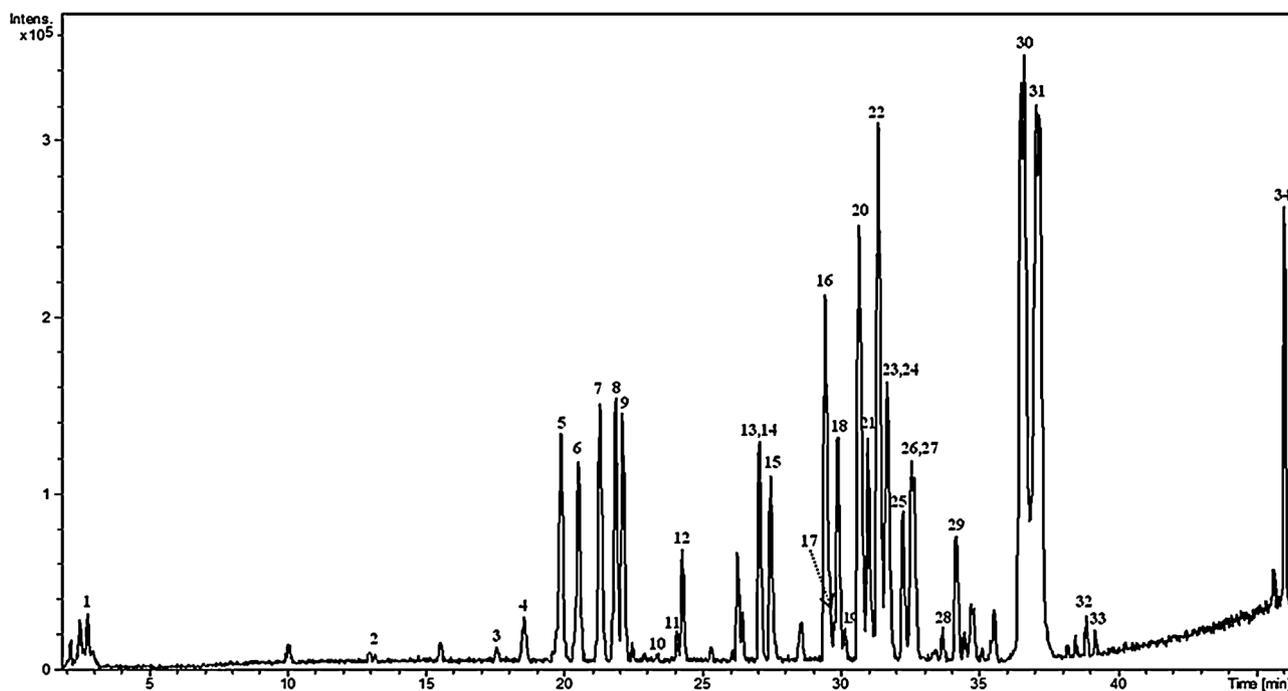
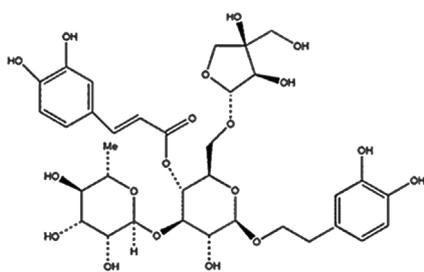
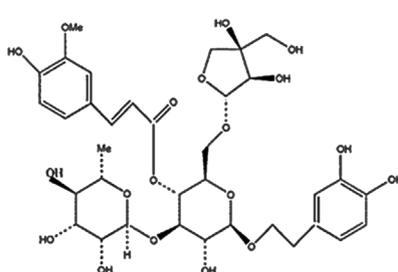


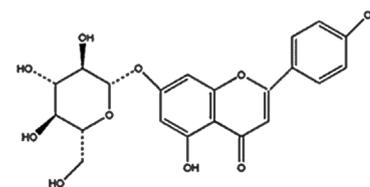
Figure : Base peak chromatogram (BPC) of *Marrubium vulgare* by UHPLC-ESI-QTOF-MS in the negative ion mode. Peak labeling represents the compounds identified.



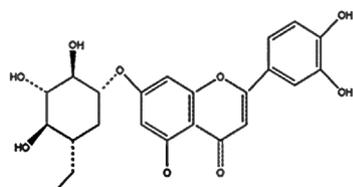
(a) (6,7) Fosythoside B



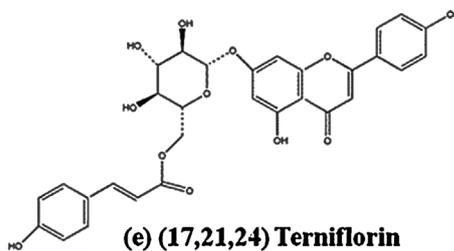
(b) (10) Alyssonoside



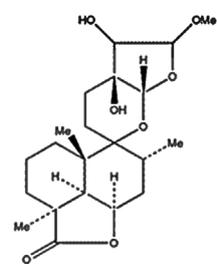
(c) (12) Apigenin-O-glucoside



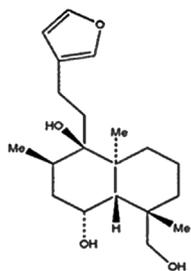
(d) (9) Luteolin-O-glucoside



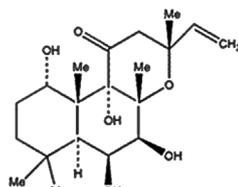
(e) (17,21,24) Terniflorin



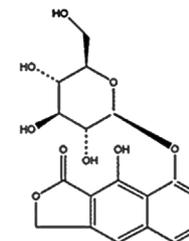
(f) (27,29) Marrulibacetal A



(g) (34) Marrubenol



(h) (13,15,23,25,26) Deacetylforskolin



(j) (1) Geshoidin

Figure : Chemical structures of several proposed compounds in *Marrubium vulgare* leaves.

Table
Proposed compounds detected in *Marrubium vulgare* extract obtained by UHPLC-ESI-QTOF-MS.

Peak ^a	t _R (min)	m/z Experimental	Molecular formula	m/z Calculated	Error (ppm)	mSigma value	Tolerance (ppm)	MS/MS fragments (% relative abundance)	Identification
1	2.85	377.0874	C ₁₈ H ₁₇ O ₉	377.0878	1	147.6	10	158.0800 (5), 176.0900 (56), 218.1000 (100)	Gesholdin
2	13.17	461.1677	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	461.1606	-15.4	18.4	20	113.0200 (8.6)	Decaffeoylverbascoside
3	4	445.2079	C ₂₁ H ₃₃ O ₁₀	445.2079	-0.3	75.1	15	223.1333 (68), 153.0915 (72), 385.1887 (100)	Sacranoside A
4	19.88	887.2861	C ₃₉ H ₇ O ₄	179.0350	-9.8	12.0	15	134.0373 (18), 135.0452 (100)	Caffeic acid
5	20.51	755.2444	C ₃₉ H ₅₁ O ₂₃	887.2827	-3.8	25.9	15	161.0235 (25.0), 179.0346 (100)	Marruboside
6			C ₃₄ H ₄₃ O ₁₉	577.2404	-5.2			135.0441 (29), 161.0215 (32), 377.1161 (36), 179.0349 (100)	Forsythoside B (isomer 1)
7			C ₃₄ H ₄₃ O ₁₉	577.2404	-11.2			161.0235 (25), 135.0434 (36), 377.1096 (48), 179.0346 (100)	Forsythoside B (isomer 2)
8	21.85	623.1981	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅	623.1981	-6.6	14.6	10	461.1635 (4), 161.0235 (8)	Verbascoside
9	22.08	447.0959	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447.0959	-5.8	8.8	15	285.0395 (33)	Luteolin-O-glucoside
10	24.04	637.2163	C ₃₅ H ₄₅ O ₁₉	769.2561	-0.7	14.8	15	593.2169 (8)	Alyssonoside
11	24.24	431.1001	C ₃₀ H ₃₇ O ₁₅	637.2138	-3.9			175.0400 (14), 461.1700 (13), 193.0479 (3)	Leukoceposide A
12			C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	431.0984	-4.1	5.4	10	269.04(9)	Apigenin-O-glucoside
13			C ₂₀ H ₃₁ O ₆	367.2126	-1.1			127.0403 (46), 239.1650 (100)	Deacetylforsskolin (isomer 1)
14	27.02	449.2157	C ₂₄ H ₃₃ O ₈	449.2181	5.3	26.0	10	239.1693 (30), 127.0384 (44), 367.2121 (100)	Preleobirin
15	27.42	367.2123	C ₂₀ H ₃₁ O ₆	367.2126	0.7	3.0	10	275.2023 (9), 127.0402 (99), 239.1649 (100)	Deacetylforsskolin (isomer 2)
16	29.39	463.2095	C ₂₈ H ₃₁ O ₆	463.2126	6.7	192.3	10	247.1208 (91), 427.2329 (100)	Garcinone E (isomer 1)
17			C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577.1351	-5.4	29.8	15	307.0826 (2), 269.0452 (53)	Terminflorin (isomer 1)
18	29.85	463.2087	C ₂₈ H ₃₁ O ₆	463.2126	8.5	166.9	10	383.2420 (19), 427.2277 (100)	Garcinone E (isomer 2)
19	30.10	285.039	C ₁₅ H ₉ O ₆	285.0405	5.1	4.4	10	175.0360 (2), 151.0049 (2)	Luteolin
20	30.62	363.1821	C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363.1813	-2.1	12.5	10	235.1363 (16), 319.1907 (22), 239.1660 (43), 127.0404 (55), 363.1795 (100)	Premarrubinin (isomer 1)
21	30.92	577.1354	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577.1351	-0.4	12.6	10	145.0284 (2), 307.0773 (5), 269.0438 (92)	Terminflorin (isomer 2)
22	31.28	363.1823	C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363.1813	-2.7	16.4	10	319.1897 (19), 235.1331 (32), 363.1796 (80), 127.0398 (100)	Premarrubinin (isomer 3)
23	31.60	367.2113	C ₂₀ H ₃₁ O ₆	367.2126	-0.9	14.2	15	127.0393 (4), 239.1654 (100)	Deacetylforsskolin (isomer 4)
24	32.19	367.2153	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	577.1351	1.2	27.3	15	145.0293 (12), 269.0448 (49), 307.0831 (5)	Terminflorin (isomer 3)
25	32.49	367.2127	C ₂₀ H ₃₁ O ₆	367.2126	-7.4	5.6	10	127.0393 (4), 239.1654 (100)	Deacetylforsskolin (isomer 4)
26	32.57	395.2054	C ₂₁ H ₃₁ O ₇	395.2075	2.1	6.8	10	275.2033 (10), 239.1659 (99), 127.0402 (100)	Deacetylforsskolin (isomer 5)
27	34.09	395.2108	C ₈ H ₁₃ O ₁₀	269.0514	23.2	7.9	10	319.1889 (19), 235.1316 (38), 127.0393 (67), 363.1787 (100)	Marrullibacetal A (isomer 1)
28	36.42	363.1821	C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363.1813	-2.1	11.1	10	225.0548 (4), 117.0377 (5), 151.0058 (11)	Apigenin
29			C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363.1813	-8.3	3.7	10	127.0393 (67), 363.1787 (100)	Marrullibacetal A (isomer 2)
30			C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363.1813	-2.1	11.1	10	275.2008 (6), 319.1900 (19), 235.1354 (32), 127.0401 (100)	Premarrubinin (isomer 3)
31	38.78	723.1705	C ₂₀ H ₂₇ O ₆	363.1813	-8.9	11.1	10	275.2008 (6), 319.1900 (19), 235.1354 (32), 127.0401 (100)	Premarrubinin (isomer 4)
32	39.10	723.1705	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₄	723.1719	2.0	11.4	10	363.1871 (4), 269.0465 (18)	Anisofolin A (isomer 1)
33	44.93	375.2133	C ₃₉ H ₃₁ O ₁₄	723.1719	2.0	11.4	10	269.0472 (1), 363.1811 (100)	Anisofolin A (isomer 2)
34			C ₂₂ H ₃₁ O ₅	375.2177	11.6	3.7	10	293.2094 (72), 278.1127 (100)	Marrubenin

^a Peak numbers assigned according to the overall elution order.

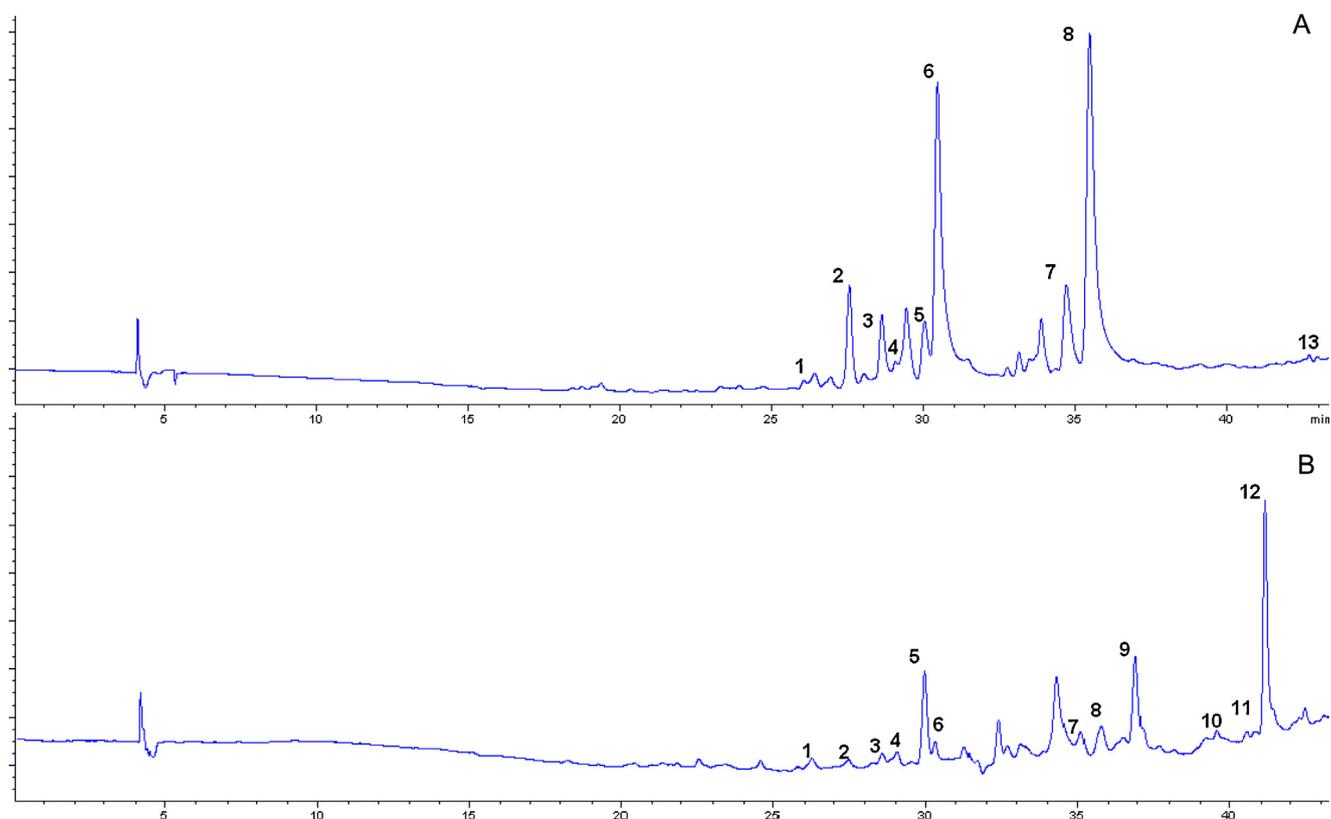


Figure : HPLC chromatogram of EtOAc fraction of *Marrubium vulgare* monitored at 360 nm (A) and 320 nm (B). The peak assignments are listed in Table.

Table List and content (mg/g dw) of phenolic compounds identified in EtOAc fraction of *M. vulgare* populations.

Peak no.	Compound	RT (min)	l_{\max} (nm)	Population						Mean	F_{test}^a
				1	2	3	4	5	6		
1	Caffeic acid	26.1	320	– ^b	–	–	0.07	–	–	0.12 ± 0.02	
2	Syringic acid	27.5	320	–	–	0.19	–	–	0.00	0.03 ± 0.03	
3	Sinapic acid	28.7	320	0.79	1.56	0.88	0.93	1.82	0.66	1.10 ± 0.19	
4	Ferulic acid	29.0	320	0.38	0.21	0.51	0.65	0.07	1.31	0.52 ± 0.18	
5	2-Hydroxycinnamic acid	30.1	280	0.29	–	–	0.56	0.43	0.21	0.24 ± 0.1	
6	Luteolin-7-O-β-D-glucoside	30.4	360	2.70 ^a	1.44 ^b	1.91 ^b	3.13 ^a	2.32 ^{a,b}	1.70 ^b	2.20 ± 0.3	*
7	Rosmarinic acid	34.9	320	0.51 ^c	1.49 ^{a,b}	1.89 ^{a,b}	1.24 ^b	2.82 ^a	0.74 ^c	1.44 ± 0.3	*
8	Quercetin-3-D-galactoside	35.7	360	6.96 ^c	9.43 ^b	5.84 ^c	14.46 ^a	7.55 ^c	10.00 ^b	9.04 ± 0.3	**
9	Quercetin-3-β-D-glucoside	36.9	360	–	–	–	1.52	–	0.21	0.28 ± 0.3	
10	Kaempferol-3-glucoside	39.8	360	1.61 ^a	0.66 ^b	1.04 ^a	0.00 ^c	0.63 ^b	0.66 ^b	0.76 ± 0.2	*
11	<i>trans</i> -Cinnamic acid	40.7	280	–	0.05	0.1	0.08	0.02	0.08	0.06 ± 0.01	
12	Apigenin	41.2	320	4.67 ^a	2.74 ^b	2.17 ^b	4.33 ^a	3.48 ^{a,b}	3.58 ^{a,b}	3.50 ± 0.6	*
13	Coumaric acid	42.8	320	– ^b	– ^b	0.13 ^a	– ^b	0.06 ^b	0.17 ^a	0.06 ± 0.03	*

^a F_{test} of the variance analysis is highly significant (**) at $P < 0.001$ and significant (*) at $P < 0.05$.

^b Absent.

^c Values followed by the same letter are not significantly different (Duncan's multiple range test at $P > 0.05$).

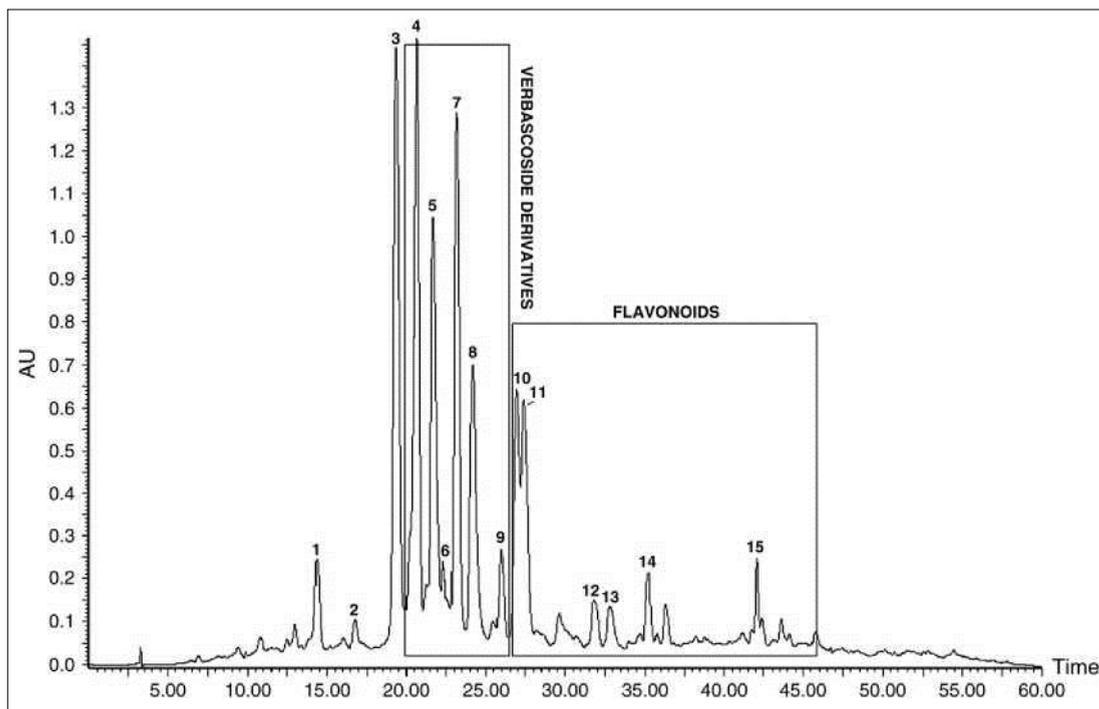
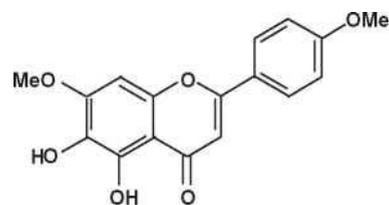


Figure : LC chromatogram of *M. vulgare* aqueous extract, visualized at $K = 330$ nm (peaks 4–9 are phenyl-propanoid esters as discussed in the text).

Table

List of metabolites identified in *M. vulgare* aqueous infusion.

peak #	Rt (min)	Identification	mg/100 mg dry wt.
1	14.74	5-O-caffeoylquinic (chlorogenic) acid	0.67
2	17.21	apigenin 6,8 di-C-glucoside (vicenin-2)	0.42
3	20.05	N.I. ^a	1.88
4	21.17	ballotetroside ^b	3.66
5	22.28	verbascoside-pentoside ^c	2.22
6	23.02	verbascoside-pentoside ^c	0.45
7	23.58	verbascoside-pentoside ^c	2.76
8	24.79	verbascoside ^d	1.78
9	26.37	alyssonoside ^b	0.67
10	27.04	luteolin O-glucoside	1.21
11	27.82	luteolin O-glucuronide	1.02
12	31.69	apigenin O-glucoside	0.62
13	33.08	apigenin O-glucuronide	0.65
14	35.37	crysoeriol O-glucuronide	0.69
15	41.89	ladanein	0.47
Total flavonoids			5.08
Total cinnamic acid derivatives (of which verbascosides)			14.09 (11.54)



Ladanein

^a N.I. = verbascoside derivative not identified; ^b tentatively identified; ^c correct isomer not identified; ^d co-injection with high-purity standard, ^e peak 3 not included.

Résumé :

Le but du présent travail est de valoriser une plante médicinale locale de la famille des lamiacées « *Marrubium vulgare* » et ce par l'analyse phyto-chimique, l'évaluation de l'activité antioxydante et l'étude de la toxicité aiguë sur souris.

La teneur en phénols totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu et l'activité antioxydante par méthode de piégeage des radicaux libres du DPPH. L'étude de la toxicité aiguë a été effectuée sur un modèle murin.

Nos investigations expérimentales indiquent une teneur assez élevée en composé phénoliques dans l'extrait du *Marrubium vulgare* soit 8,23 mg GAE / g de matière sèche. La capacité de piégeage du DPPH de l'extrait a été mesurée et mise en évidence par la concentration Inhibitrice IC50 qui est de 2.27 mg ce qui justifie clairement le potentiel biologique de cette plante. Ainsi que son innocuité après administration pour des souris

Mots clés : phytothérapie, *Marrubium vulgare*, extraction acétonique, polyphénols, activité antioxydante, toxicité aiguë.

Abstract :

The aim of this study is to valorize a local medicinal plant from lamiaceae family “*Marrubium vulgare*” by physicochemical analysis including its *in vitro* antioxidant activity and acute toxicity.

The total phenol content was determined by the Folin-Ciocalteu method and the *in vitro* antioxidant activity was evaluated by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) free radical scavenging activity. The acute toxicity study was carried out on murine model.

Our experimental investigations indicate a fairly high phenolic compound content in the acetonic extract of *Marrubium vulgare* 8.23 mg GAE / g dry matter. The capability of scavenging the DPPH of the extract was measured and demonstrated by the effective concentration IC50 which is about 2.27 mg, this clearly justifies the biological potential of this plant, as well as its safety after administration for mice.

Keywords : Phytotherapy, *Marrubium vulgare*, acetonic extraction, polyphenols, antioxidant activity, acute toxicity.

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو اعطاء قيمة وأهمية بالغة لهذه النبتة الطبية المحلية من عائلة لماسي ماروبيوم بولقاري، عبر تحاليل فيزيو كيميائية وتقييم نشاط المضاد للأكسدة ودراسة السمية الحادة على نموذج الفئران.

تم تجديد محتوى الفينول الكلي باستعمال طريقة فولين سيوكالكتو، وتم تقييم نشاط المضاد للأكسدة في المختبر عبر النشاط الكفح للجذور الحرة، واجريت دراسة السمية الحادة على نموذج الفئران.

تشير تحقيقاتنا التجريبية على نسبة عالية من المركبات الفينولية في الاستخراج ماروبيوم بولقاري المقدرة بـ 8.23 ملغ مقابل حمض غاليك لـ 01 غ من المادة الجافة، وتم قياس قدرة الكسح من DPPH للمستخرج التي أظهرت نسبة تركيز الكفح IC 50 يساوي 2.27 ملغ ، و ذلك يبرر بوضوح القدرة البيولوجية لهذه النبتة، بالإضافة سلامتها بعد تناولها من طرف الفئران.

الكلمات الرئيسية : الأدوية العشبية او العلاج بالنباتات، ماروبيوم بولقاري، استخلاص اسيتونيك، بوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، السمية الحادة.