

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République algérienne démocratique et populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب  
Université–Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib  
Faculté des Sciences et de Technologie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Projet de Fin d'Etudes  
Pour l'obtention du diplôme de Master en : Biochimie  
Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie  
Thème

*Evaluation de l'activité antiinflammatoire de l'extrait enrichi en polyphénols de  
Marrubium vulgare L.*

**Présenté Par :**

Melle. Hadjar KADDOUR AHMED

**Devant le jury composé de :**

Dr Ouassila Benhabib	M C B	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr Sofiane Benyamina	M C B	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examineur
Dr Meriem Zerriouh	M C B	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

*Année Universitaire 2020/2021*

# Remerciements

*En premier lieu, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le privilège et la chance d'étudier, de m'avoir donné aussi la force, le courage, et la patience pour accomplir ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à mon encadrante Dr Meriem ZERRIOUH maître de conférences à l'université d'AIN TEMOUCHENT d'avoir accepté de diriger ce travail, en m'offrant son soutien. C'est la personne qui m'a donnée des pistes de recherches, je la remercie pour le temps qu'elle m'a consacré, pour ces conseils avisés et pour sa supervision éclairée tout au long de la rédaction du mémoire.*

*Je tiens à remercier sincèrement les membres de jury Dr Ouassila BENGHABIB et Dr Sofiane BENJAMINA maîtres de conférences à l'université d'Ain Témouchent, c'est un grand honneur que j'ai la chance d'être évaluée par eux.*

*Merci encore au chef de département Dr Farid BENNABI pour ces efforts déployés afin de nous assurer un stage de qualité et sa disponibilité malgré ces occupations.*

*Comme un témoignage de mon amitié, mes remerciements à tous mes amis, particulièrement Khalid ZAID, Ahmed Sami BAKHTI et Nour El Houda MESSAOUDI qui m'ont beaucoup soutenue dans des moments difficiles et leurs courages au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Hadjar*

# *Dédicace*

En ce jour mémorable pour moi je dédie ce travail à l'âme de mes grands-parents **BENALLAL Yamina, KADDOUR AHMED Saïd, N'HARI Mohamed** et mon oncle **KADDOUR AHMED Mohamed** que **Dieu** les accueille dans son vaste paradis.

Ma grand-mère **KADDOUR AHMED Khadra** en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle que **Dieu le Tout puissant** vous garde et vous procure santé et bonheur.

Mes très chers parents qui ont toujours été pour moi un exemple de père et mère respectueux, honnêtes. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation je vous aime et j'implore **le tout puissant** pour qu'il vous accorde bonne santé et une vie longue et heureuse.

Mes chers frères **Boumediene** et **Mohamed** pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, a tous les moments d'enfance passés avec moi.

Mes oncles, **N'HARI Moustapha, N'HARI Saïd, KADDOUR AHMED Djamel** et **KADDOUR AHMED Mourad.**

Ma tante **KADDOUR AHMED Hadja.**

Je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite.

*Hadjar*

## Résumé

Le travail de la présente étude a pour le but d'évaluer l'activité inflammatoire d'extrait butanolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, une plante de la famille des Lamiacées, très utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement d'une variété de maladies.

Le dosage des phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) et nitrite de sodium ( $NaNO_2$ ) dans l'extrait butanolique a respectivement donné des valeurs de  $142 \pm 2,66$  mg EAG/g d'extrait et  $288, 53 \pm 19,88$  mg EC/g d'extrait. L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait butanolique du *Marrubium vulgare* montre que cet extrait a un pourcentage d'inhibition très important de l'hémolyse provoquée par la chaleur et même par la solution hypotonique, et donc une activité protectrice des globules rouges.

**Mots clés :** *Marrubium vulgare L*, métabolites secondaires, polyphénols, flavonoïdes, activité anti-inflammatoire.

## Abstract

The aim of the present study is to evaluate the inflammatory activity of butanolic extract of the aerial part of *Marrubium vulgare*, a plant of the Lamiaceae family, widely used in traditional medicine for the treatment of a variety of diseases. Determination of total phenols by Folin-Ciocalteu method and flavonoids by aluminum trichloride ( $AlCl_3$ ) and sodium nitrite ( $NaNO_2$ ) method to butanolic extract gave values of  $142 \pm 2.66$  mg EAG/g extract and  $288, 53 \pm 19.88$  mg EC/g extract respectively. The study of the anti-inflammatory activity *in vitro* of the butanolic extract of *Marrubium vulgare* shows that this extract has a very important percentage of inhibition of the hemolysis caused by heat and even by the hypotonic solution, and therefore a protective activity of the red blood cells.

**Key words:** *Marrubium vulgare L*, secondary metabolites, polyphenols, flavonoids, anti-inflammatory activity.

## المخلص

لهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط الالتهابي لمستخلص البوتانوليكي من الجزء الجوي من *Marrubium vulgare*، وهو نبات من عائلة Lamiaceae، ويستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي لعلاج مجموعة متنوعة من الأمراض. أعطى تحديد إجمالي الفينولات بطريقة Folin-Ciocalteu و الفلافونويدات بواسطة طريقة ثلاثي كلوريد الألومنيوم ( $AlCl_3$ ) و نترات الصوديوم ( $NaNO_2$ ) في مستخلص البيوتانول قيم  $142 \pm 2.66$  مجم EAG / جم من المستخلص و  $288.53 \pm 19.88$  ملغ مستخلص / EC g على التوالي. تظهر دراسة النشاط المضاد للالتهابات في المختبر لمستخلص البوتانول من *Marrubium vulgare* أن هذا المستخلص يحتوي على نسبة كبيرة جداً من تثبيط انحلال الدم الناجم عن الحرارة وحتى عن طريق محلول ناقص التوتر، وبالتالي نشاط وقائي لخلايا الدم الحمراء.

**الكلمات المفتاحية:** *Marrubium vulgare L* ، المستقلبات الثانوية ، البوليفينول ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للالتهابات.

## Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## Etude bibliographique

1 Les polyphénols .....	2
2 <i>Marrubium vulgare L</i> .....	3
2.1 Etude botanique et systématique .....	3
2.2 Utilisation traditionnelle et activité thérapeutique .....	4
2.3 Composition chimique.....	4
3 Inflammation .....	5
3.1 Définition .....	5
3.2 Mécanisme de l'inflammation .....	6
3.3 Types d'inflammation .....	7
3.3.1 Inflammation aiguë .....	7
3.3.2 Inflammation chronique .....	7
3.4 Marqueurs biologiques de l'inflammation.....	8
3.4.1 Protéine C réactive (CRP) .....	8
3.4.2 Vitesse de sédimentation (VS).....	8
3.4.3 La procalcitonine (PCT) .....	8
3.4.4 L'électrophorèse des protéines plasmatiques .....	8
4 Les anti-inflammatoires .....	9
4.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens(AIS) : glucocorticoïdes.....	9
4.2 Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	10
4.3 Anti-inflammatoiresenzymatiques .....	11
4.4 Anti-inflammatoires à base de plantes .....	12
5 Méthodes d'étude de l'activité anti-inflammatoire .....	13
5.1 Etude <i>in vitro</i> .....	13
5.1.1 Dénaturation protéique .....	13

5.1.2	Stabilisation membranaire .....	14
5.1.3	Activité anti-lipoxygénase .....	14
5.2	Etude <i>in vivo</i> .....	14

## **Partie expérimentale**

### **Matériel et méthodes**

1	Matériel végétal.....	15
2	Etude phytochimique de l'extrait butanolique de <i>M. vulgare L.</i> .....	15
2.1	Préparation de l'extrait n-butanol.....	15
2.2	Dosage des polyphénols totaux.....	15
2.3	Dosage des flavonoïdes totaux.....	17
3	Etude <i>in vitro</i> de l'activité biologique de l'extrait n-butanolique de <i>M. vulgare</i> .....	19
3.1	Evaluation de l'activité anti-hémolytique de l'extrait butanolique .....	19

### **Résultats et discussion**

1	Etude phytochimique de <i>M. vulgare</i> .....	23
1.1	Préparation de l'extrait n-butanolique .....	23
1.2	Teneur en composés phénoliques totaux .....	24
1.3	Teneur en flavonoïdes totaux.....	25
2	L'activité anti-inflammatoire ( <i>in vitro</i> ) .....	27
	Conclusion .....	30
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	31

# LISTE DES ABREVIATIONS

**%** : pourcentage

**°C** : degré Celsius

**µg** : microgramme

**µL** : microlitre

**mL** : millilitre

**nm** : nanomètre

**Abs** : absorbance

**AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens

**AIS** : anti-inflammatoires stéroïdiens

**AlCl<sub>3</sub>** : trichlorure d'aluminium

**cm** : centimètre

**CRP** : Protéine C réactive

**DO** : densité optique

**EAG** : équivalent d'acide gallique

**EC** : équivalent de la catéchine

**EQ** : équivalent de quercétine

**g** : gramme

**h** : heure

**IC<sub>50</sub>** : concentration Inhibitrice à 50%

**l** : litre

***M.vulgare*** : *Marrubium vulgare*

**NaCO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium

**NaNO<sub>2</sub>** : nitrite de sodium

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PCT** : La procalcitonine

**UV** : ultraviolet

**Vis** : visible

**VS** : vitesse de sédimentation

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Les principales classes des composés phénoliques .....	<b>2</b>
<b>Figure 2:</b> <i>Marrubium vulgare</i> L.(Plante entière (a), fleurs (b), capsules de fruits (akène) (c), graines (d)) .....	<b>4</b>
<b>Figure 3:</b> Enchaînement des cinq étapes de la réponse inflammatoire .....	<b>6</b>
<b>Figure 4:</b> Glucocorticoïdes stéroïdiens. ....	<b>10</b>
<b>Figure 5 :</b> Les médicaments anti-inflammatoires les plus communs .....	<b>11</b>
<b>Figure 6:</b> Structures chimiques des principaux anti-inflammatoires dérivés de plantes .....	<b>13</b>
<b>Figure 7 :</b> Gamme étalon d'acide gallique gallique (0-50µg/ml).....	<b>24</b>
<b>Figure 8 :</b> Courbe étalon de l'acide gallique ( $\lambda=750$ nm). ....	<b>25</b>
<b>Figure 9:</b> Gamme étalon de la catéchine (0-500µg/ml) et l'extrait butanolique. ....	<b>26</b>
<b>Figure 10 :</b> Courbe étalon de lacatéchine ( $\lambda=510$ nm). ....	<b>26</b>

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Composés bioactifs dérivés de plantes ayant une activité anti-inflammatoire .....	<b>12</b>
<b>Tableau 2:</b> Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux de l'extrait butanolique de <i>M.vulgare</i> .....	<b>16</b>
<b>Tableau 3:</b> Mode opératoire du dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique de <i>M.vulgare</i> .....	<b>18</b>
<b>Tableau 4:</b> Mode opératoire du test de la stabilisation membranaire par la chaleur.....	<b>20</b>
<b>Tableau 5:</b> Mode opératoire du test d'hémolyse.....	<b>21</b>
<b>Tableau 6:</b> Effet de l'extrait butanolique de <i>M. vulgare L</i> , contre l'hémolyse des membranes érythrocytaire, induite dans la chaleur et dans la solution hypotonique.....	<b>28</b>

## Introduction

Le règne végétal est une source précieuse de remèdes curatifs pour diverses pathologies, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 80 % des personnes dans le monde exploitent la médecine traditionnelle pour leurs soins de santé (Amri *et al.*, 2017). À ce jour, de nombreux groupes de recherches orientent leurs efforts vers l'identification de médicaments naturels et d'extraits de plantes capables de prévenir ou de traiter différentes manifestations pathologiques (Amri *et al.*, 2017).

Les métabolites secondaires des plantes (composés phénoliques, tannins condensés, gallotannins, flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes, saponines, stérols, terpenoïdes et huiles essentielles) constituent une source importante de médicaments depuis l'antiquité, et aujourd'hui, près de la moitié des médicaments utilisés dans la pratique sont dérivés de sources naturelles et beaucoup de ces composants végétaux sont largement prescrits pour le traitement des affections inflammatoires (Mohammed *et al.*, 2014).

Dans les pays en voie de développement, les plantes possédant une activité anti-inflammatoire pourraient constituer une alternative dans la thérapeutique anti-inflammatoire du fait de leur meilleure accessibilité et de leur moindre toxicité en général, vis-à-vis des anti-inflammatoires classiques (Ndiaye *et al.*, 2006).

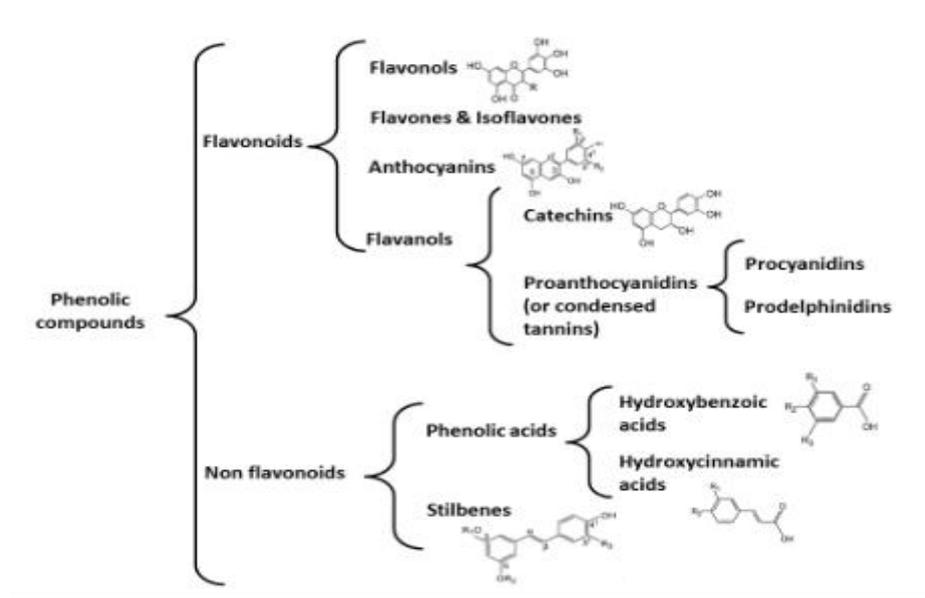
C'est dans ce cadre que nous nous sommes intéressés à *Marrubium vulgare*, une plante de la famille des *lamiacées* utilisée en médecine traditionnelle et représente ainsi une source précieuse de composés bioactifs ayant des effets bénéfiques pour la santé avec divers pouvoirs : antioxydant, anti-inflammatoire, antidiabétique et antimicrobien (Aćimović *et al.*, 2020).

C'est ainsi et dans un but de contribuer à la valorisation de *M. vulgare* de la wilaya d'Ain Témouchent, la présente étude consiste à la préparation d'un extrait enrichi en polyphénols, de déterminer sa teneur totale en phénols et flavonoïdes et d'estimer ses propriétés anti-inflammatoires *in vitro* par le test de l'hémolyse.

*Etude*  
*bibliographique*

## 1 Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturellement synthétisés par le métabolisme secondaire des plantes, qui ont attiré une grande attention de la communauté scientifique en raison de leurs effets thérapeutiques potentiels sur la santé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal, principalement dans les fruits et les légumes, et l'on estime que plus de 8000 structures ont déjà été identifiées (de Araújo *et al.*, 2020), et qui appartiennent à différentes classes (Fig.1) notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, les lignanes (Tapiero *et al.*, 2002), les tannins condensés et les gallotannins (Mohammed *et al.*, 2014).



**Figure 1:** Les principales classes des composés phénoliques ( d'après Garde-Cerdán *et al.*, 2017).

Les composés phénoliques présentent tous un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (Hennebelle *et al.*, 2004), ils se présentent sous des formes libres ou conjuguées (de Araújo *et al.*, 2020) avec un ou plusieurs résidus de sucre, avec des acides carboxyliques et organiques, des amines et des lipides (Bravo, 1998) .

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui jouent de multiples rôles essentiels dans la physiologie végétale et ont des propriétés potentielles sur l'organisme humain, principalement en tant qu'antioxydants, agents antiallergiques, anti-inflammatoires, anticancéreux, antihypertenseurs, antimicrobiens, antibactériens, antiviraux et antifongiques (Daglia, 2012).

## 2 *Marrubium vulgare L*

### 2.1 Etude botanique et systématique

*Marrubium vulgare L.*, est une plante herbacée du genre *Marrubium* (AOUADHI *et al.*, 2013), originaire de la région située entre la mer Méditerranée et l'Asie centrale (Aćimović *et al.*, 2020), de l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie, que l'on trouve surtout sur les bords de chemins, les prés secs et les terrains vagues (AOUADHI *et al.*, 2013), elle est devenue très répandue, habitant actuellement tous les continents.

Le nom latin *Marrubium* dérive du mot hébreu marrob, qui signifie jus amer, tandis que *vulgare* signifie "commun" ou "bien connu" (Aćimović *et al.*, 2020), cette espèce est communément connue comme "Marriout" en Algérie (Kebbi *et al.*, 2020), "Marroubia" en Tunisie (AOUADHI *et al.*, 2013), "horehound", et "o'cajnica" en Europe, cette dernière appellation signifie « femme désespérée », car le thé de cette herbe était typiquement utilisé comme remède amer par les femmes qui ne pouvaient pas concevoir (pour la régulation du cycle menstruel) (Aćimović *et al.*, 2020).

*M. vulgare* est une herbe annuelle ou vivace (Fig.2), avec une racine pivotante résistante, ligneuse et ramifiée ou de nombreuses racines latérales fibreuses, et de nombreuses tiges qui sont quadrangulaires, érigées, très duveteuses, et de 20 à 100 cm de haut. Les feuilles sont rondes, ovales, généralement dentées, pétiolées, veinées et hirsutes en surface, et elles sont disposées en paires opposées sur une longue tige. Les inflorescences sont formées à l'aisselle des feuilles supérieures, avec des fleurs blanches en verticilles axillaires serrés. Les fleurs de *M. vulgare* apparaissent généralement au début du printemps, et elles sont régulièrement visitées par des abeilles qui butinent le nectar (Aćimović *et al.*, 2020).

- La position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare L* est la suivante (NOUIRI, 2020):

**Règne :** Végétal

**Sous classe :** Astérides

**Sous règne :** Plante vasculaire

**Ordre :** Lamiales

**Embranchement :** Spermatophytes

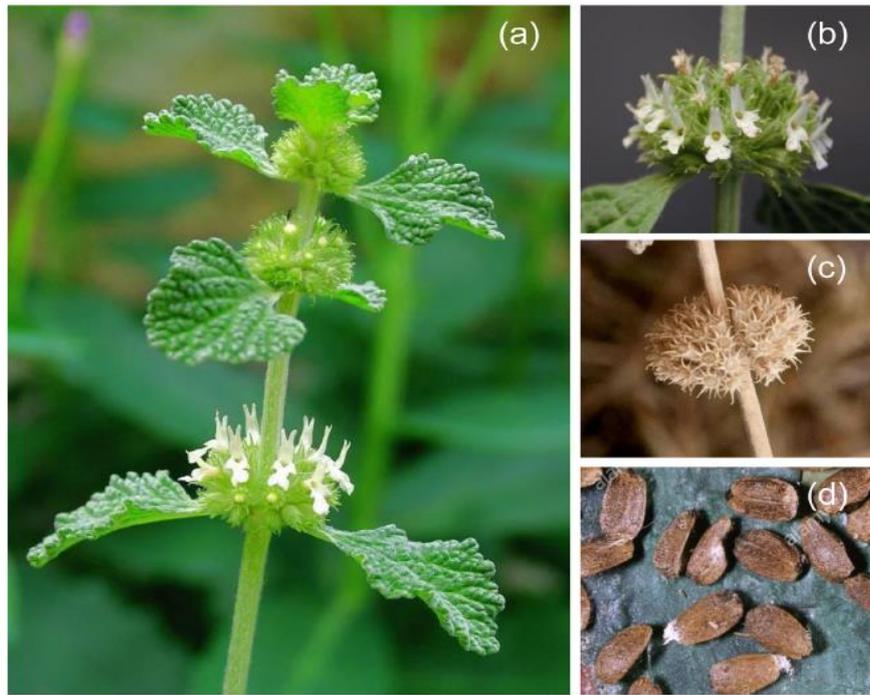
**Famille :** Lamiacées

**Division :** Magnoliophytes

**Genre :** *Marrubium*

**Classe :** Magnolipsides

**Espèce :** *Marrubium vulgare L.*



**Figure 2:** *Marrubium vulgare* L. (Plante entière (a), fleurs (b), capsules de fruits (akène) (c), graines (d)) (Nedjimi *et al.*, 2020).

## 2.2 Utilisation traditionnelle et activité thérapeutique

L'application traditionnelle la plus courante de *M. vulgare* dans le monde est le traitement des troubles gastro-intestinaux et respiratoires (Aćimović *et al.*, 2020), mais elle est aussi utilisée contre les maladies rénales, la fièvre et les lésions cutanées (Schlemper *et al.*, 1996). Au Mexique et au Maroc, la plante est surtout utilisée comme un antidiabétique, des études scientifiques ont effectivement prouvées cet effet hypoglycémiant (Rodríguez Villanueva *et al.*, 2017).

D'autre part de nombreuses activités thérapeutiques de *M. Vulgare* ont été aussi prouvées y compris les activités analgésique, anti-nociceptive, anti-inflammatoire, anti-oedématogène, antispasmodique, gastroprotectrice, antihypertensive, anti-hyperlipidémique, antihépatotoxique, immunomodulatrice, antioxydante, antimicrobienne, anticancéreuse, molluscicide et anti-protozoaire (Lodhi *et al.*, 2017).

## 2.3 Composition chimique

*M. vulgare* est une source abondante de divers composés phénoliques, comme les acides phénoliques, les acides phénylpropanoïdes (cinnamiques), les esters, les flavonoïdes et les tannins. Les quantités totales des dérivés de l'acide cinnamique et des tannins condensés sont

estimées à 14,09 mg/100 mg et 16,55 mg de catéchine/100 g de matière sèche respectivement. L'analyse chimique détaillée a permis d'identifier les acides gallique, gentsique, p- hydroxy-benyoïque, protocatéchuïque et syringique (**Aćimović et al., 2020**). D'autres composés ont été aussi déterminés dans le matériel végétal de *M. vulgare* qui sont divers composés azotés comme la choline, la bétonicine et la stachydrine, des acides aminés, des polysaccharides, ainsi que des minéraux, en particulier des sels de potassium (**Aćimović et al., 2020**).

### 3 Inflammation

#### 3.1 Définition

Le terme d'inflammation est tiré du mot latin « inflammare » qui signifie (brûler) (*de oliveira*) (**Abdulkhaleq et al., 2018**). L'inflammation fait partie du mécanisme de défense de l'organisme, c'est le processus par lequel le système immunitaire reconnaît et élimine les stimuli nocifs et étrangers du reste de l'organisme et entame le plus rapidement possible le processus de guérison et de réparation des tissus (**Abdulkhaleq et al., 2018; Pahwa et al., 2020; Weill et Batteux, 2003**). L'efficacité d'un tel système repose sur la capacité à mettre en place une réponse rapide adaptée au type particulier de déclencheurs inflammatoires tout en limitant autant que possible les aspects dommageables de l'inflammation (**Barton, 2008**).

Ainsi, la réponse inflammatoire idéale est rapide et destructrice (lorsque cela est nécessaire), mais spécifique et autolimitée. L'importance de cet équilibre est démontrée par les observations selon lesquelles, dans certaines infections chroniques ou certains troubles inflammatoires, la réponse inflammatoire cause plus de dommages à l'hôte qu'au microbe (**Barton, 2008**).

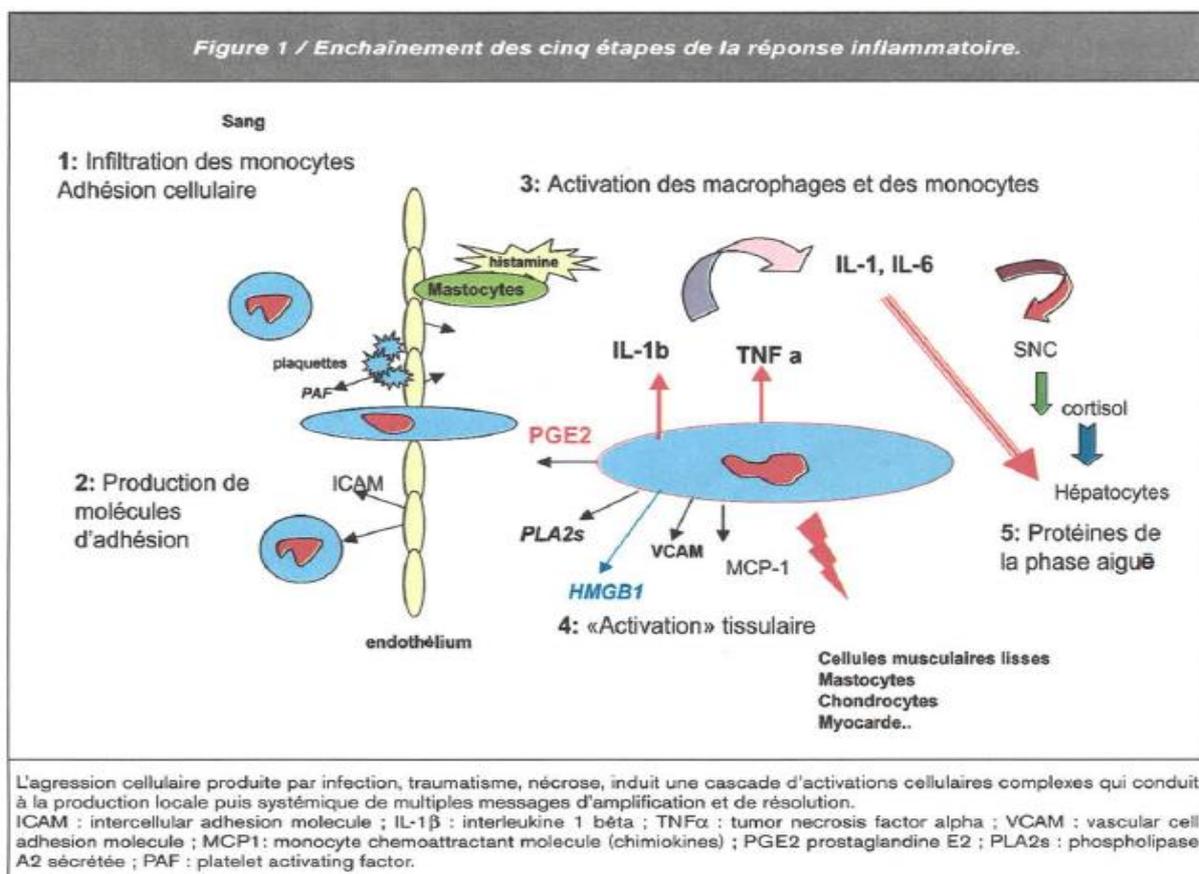
L'infection peut être induite par des facteurs non infectieux qui peuvent être de nature physique (brûlure, gelure, blessure physique, corps étrangers, traumatisme, rayonnement ionisant), chimique (glucose, acides gras, toxines, alcool, irritants comme le fluorure et le nickel), biologique (cellules endommagées, agents immunologiques), psychologique (excitation) et environnementale (pollution). Quant aux facteurs infectieux sont les bactéries, les virus ou n'importe quels autres microorganismes (**Chen et al., 2018 ; Hamdi et al., 2018 ; Iwalewa et al., 2007 ; Weill et Batteux, 2003**).

Les symptômes de l'inflammation sont la douleur, la chaleur, la rougeur, le gonflement et la perte de fonctions qui résultent de la dilatation des vaisseaux sanguins entraînant une augmentation de l'apport sanguin et de l'augmentation des espaces intercellulaires ce qui

provoque le déplacement des leucocytes, des protéines, des médiateurs inflammatoires et des fluides dans les régions enflammées (Chen *et al.*, 2018).

### 3.2 Mécanisme de l'inflammation

Le mécanisme de l'inflammation représente une chaîne de réponses organisées et dynamiques comprenant des événements cellulaires et vasculaires avec des sécrétions humorales spécifiques. Ces voies impliquent un changement d'emplacement physique des globules blancs (monocytes, basophiles, éosinophiles et neutrophiles), du plasma et des fluides au niveau du site enflammé. Un groupe de médiateurs sécrétés et d'autres molécules de signalisation (par exemple, l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes, les radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote, et la sérotonine) sont libérés par les cellules de défense immunitaire (Abdulkhaleq *et al.*, 2018). Dans la **figure 3** sont données les cinq étapes de l'inflammation (Raymondjean, 2007).



**Figure 3:** Enchaînement des cinq étapes de la réponse inflammatoire (d'après Raymondjean, 2007).

### 3.3 Types d'inflammation

#### 3.3.1 Inflammation aiguë

Les lésions tissulaires dues à un traumatisme, une invasion microbienne ou des composés nocifs peuvent induire une inflammation aiguë, qui est d'une apparition rapide et courte, avec des symptômes de seulement quelques jours, par exemple une cellulite ou une pneumonie aiguë (**Pahwa et al., 2020**). Cette inflammation se caractérise par l'exsudation de fluides et de protéines plasmatiques et par la migration des leucocytes, plus particulièrement les neutrophiles, dans la zone lésée. Cette réponse inflammatoire aiguë est considérée comme un mécanisme de défense visant à tuer les bactéries, les virus et les parasites tout en facilitant la réparation des plaies (**Iwalewa et al., 2007; Pahwa et al., 2020**). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (**Iwalewa et al., 2007; Rousselet et al., 2005**). Elle peut être divisée en trois grandes phases : Vasculaire ; Cellulaire et de résolution ; Cicatrisation.

#### 3.3.2 Inflammation chronique

L'inflammation chronique est également appelée inflammation lente et à long terme, qui dure pendant des périodes prolongées de plusieurs mois à plusieurs années. En général, l'ampleur et les effets de l'inflammation chronique varient en fonction de la cause de la blessure et de la capacité de l'organisme à réparer et à surmonter les dommages (**Pahwa et al., 2020**). Elle est considérée comme la phase la plus dangereuse, où la dégénérescence et la fibrose des tissus se produisent. La réponse inflammatoire chronique peut entraîner la mort et est classée après les maladies cardiovasculaires et les cancers dans la liste des causes de décès les plus importantes au monde (**Hamdi et al., 2018**).

Les symptômes courants qui se développent lors d'une inflammation chronique sont les douleurs corporelles, l'arthralgie, la myalgie, la fatigue chronique, l'insomnie, les complications gastro-intestinales comme la constipation, la diarrhée et le reflux acide, la dépression, l'anxiété, la prise de poids ou la perte de poids et les infections fréquentes (**Pahwa et al., 2020**).

Une inflammation chronique peut avoir plusieurs étiologies, comme l'échec d'élimination de l'agent provoquant une inflammation aiguë tel que les organismes infectieux, y compris *Mycobacterium tuberculosis*, les protozoaires, les champignons et autres parasites, mais aussi suite à l'exposition prolongée à un faible niveau d'un matériau irritant comme les

produits chimiques industriels. D'autre part, elle peut résulter d'une maladie auto-immune dans laquelle le système immunitaire reconnaît le composant normal du corps comme un antigène étranger et attaque les tissus sains donnant lieu à des maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé (**Pahwa et al., 2020**).

### 3.4 Marqueurs biologiques de l'inflammation

#### 3.4.1 Protéine C réactive (CRP)

La protéine C réactive est une protéine sérique spécifique à la réaction inflammatoire synthétisée par le foie précocement au cours de la réponse inflammatoire en réponse aux cytokines (**Boukhari et al., s. d.**), son dosage est aussi intéressant en postopératoire et en pathologie néonatale. En effet, la CRP ne traverse pas le placenta, ce qui permet de différencier une inflammation d'origine maternelle d'une inflammation propre à l'enfant (**CRP - CSCQ, s. d.**).

#### 3.4.2 Vitesse de sédimentation (VS)

C'est un examen de laboratoire qui consiste à laisser sédimenter les hématies dans un tube vertical. On mesure la distance parcourue pendant 1 heure parfois également 2 heures. La VS est un examen simple, peu coûteux, reproductible, mais très peu spécifique. Il permet surtout de détecter une anomalie des immunoglobulines ( hypergammaglobulinémie, gammopathie monoclonale) (**CRP - CSCQ, s. d.**).

#### 3.4.3 La procalcitonine (PCT)

Polypeptide pro-hormone de calcitonine, elle est produite en réponse à un stimuli pro-inflammatoire. Elle s'élève tôt, comme la CRP, selon une cinétique encore plus rapide. Ses performances sont excellentes pour le diagnostic d'infection bactérienne en pédiatrie, en réanimation, elle permet de guider la prise en charge des patients septiques graves (**Emile, 2012**).

#### 3.4.4 L'électrophorèse des protéines plasmatiques

La séparation électrophorétique des protéines plasmatiques donne 5 fractions, chacune d'entre elles contenant des protéines intervenant dans les mécanismes de l'inflammation. Une hypoalbuminémie est présente lors des syndromes inflammatoires sévères. L'élévation des alpha1 globulines est observée lors d'un processus inflammatoire à son début, tandis que l'augmentation des alpha2 évoque un syndrome inflammatoire constitué. L'augmentation

isolée des globulines est le témoin d'une élévation des taux de transferrine lors d'une carence martiale. Une hyperglobulinémie polyclonale reflète un processus infectieux chronique, une maladie auto-immune ou une hépatopathie chronique (**Emile, 2012**).

### 4 Les anti-inflammatoires

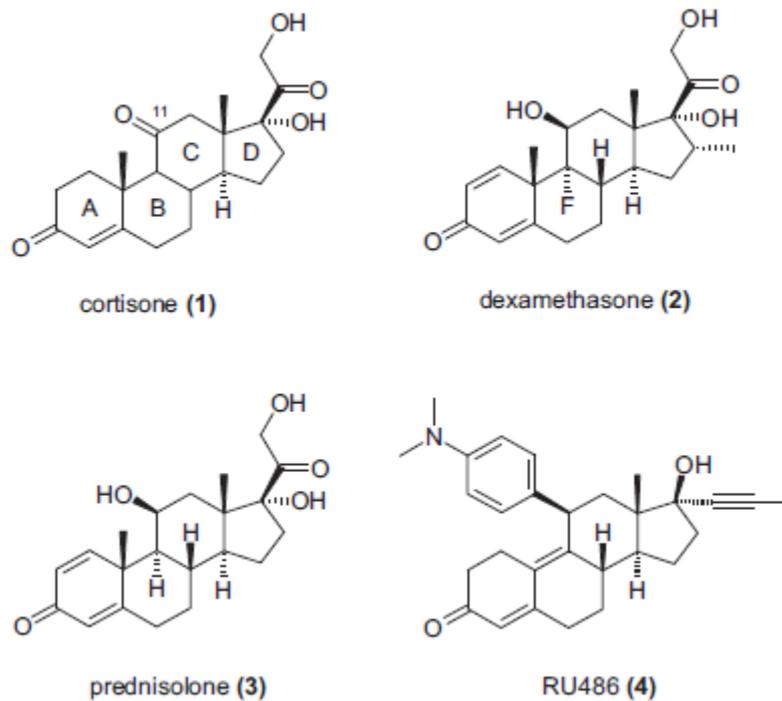
La thérapeutique anti-inflammatoire est destinée à contrôler l'excès des réactions aspécifiques des tissus et à éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique. Du fait de la grande variété des stimuli phlogogènes (immuns, microcristaux, infections, corps étranger, traumatismes...) qui peuvent léser l'organisme, les anti-inflammatoires sont utilisés dans tous les domaines de la pathologie (**Muster, 2005**).

L'efficacité anti-inflammatoire s'explique par l'inhibition de la synthèse de nombreuses cytokines, enzymes et médiateurs de l'inflammation ou l'induction de cytokines et de molécules anti-inflammatoires (**Muster, 2005**).

#### 4.1 Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) : glucocorticoïdes

Ces stéroïdes analogues ou précurseurs de la cortisone (**Fig.4**), naturellement sécrétés par les glandes surrénales, possèdent de nombreuses propriétés pharmacologiques dont beaucoup sont à l'origine d'effets indésirables (diabète...) (**Muster, 2005**). Les glucocorticoïdes ont, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), une action inhibitrice de la synthèse des prostaglandines. Cette action s'exerce principalement sur la phospholipase A2, en amont du métabolisme de l'acide arachidonique par la cyclo-oxygénase. Les glucocorticoïdes ont cependant une action plus large que les AINS, action à la fois cytoplasmique et génomique, ayant pour conséquences une modulation de la transcription et de l'expression des médiateurs (bradykinine, histamine...), des cytokines (interleukine 1 et 2, TNF,...) et de divers neuropeptides (CRF, ACTH, Beta endorphine...)(**Orliaguet et al., 2013**).

Contrairement aux AINS, les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire. Par leur action directe sur les vaisseaux, ils diminuent les phénomènes vasculaires de l'inflammation. Par leur effet antiprolifératif sur les histiocytes-monocytes-macrophages de tous les types, les lymphocytes, les plasmocytes, les fibroblastes et les polynucléaires neutrophiles, ils inhibent les phénomènes cellulaires précoces et tardifs de l'inflammation. A très fortes doses, les glucocorticoïdes ont un effet lymphocytolytique permettant une inhibition de l'immunité à médiation cellulaire et, à un degré moindre, une diminution de la synthèse des anticorps humoraux (**Muster, 2005**).



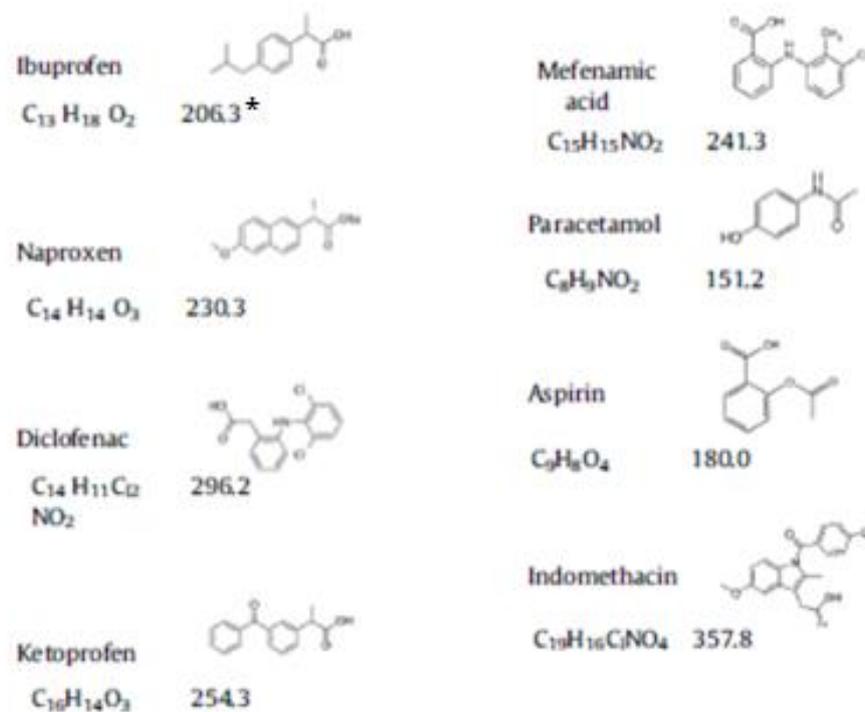
**Figure 4:** Glucocorticoïdes stéroïdiens. (d'après RAZAVI et HARKEN, 2012).

Les composés 2 et 3 sont considérés comme les médicaments les plus florissants en médecine moderne. Le composé 4 est la mifépristone.

#### 4.2 Anti-inflammatoires non stéroïdien (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) demeurent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, que ce soit dans le cadre de la prescription médicale ou de celui de l'automédication, en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques ou antalgiques (Jouzeau *et al.*, 2004).

Chimiquement, les AINS constituent une classe médicamenteuse hétérogène, comprenant une trentaine de produits (Pillon, 2014), ils sont la classe médicamenteuse la plus communément utilisée pour traiter les douleurs et les blessures, voire pour les prévenir (Lai-Cheung-Kit *et al.*, 2019) (Fig.5). Ils convient de distinguer les AINS salicylés, dont le chef de file est l'acide acétylsalicylique, et les AINS non salicylés. Malgré la diversité de leur nature chimique, ont tous en commun le fait de contrer les manifestations de la réaction inflammatoire (Pillon, 2014).



**Figure 5** : Les médicaments anti-inflammatoires les plus communs (Izadi *et al.*, 2020).

L'efficacité des AINS, comme leurs principaux effets secondaires sont liés à leur mécanisme d'action principal qui est une inhibition de la cyclo-oxygénase (COX), enzyme responsable de la biosynthèse des prostaglandines (Orliquet *et al.*, 2013), est qu'ils sont responsables d'une morbi-mortalité importante, générée principalement par leurs effets indésirables digestifs sévères et rénaux (Jouzeau *et al.*, 2004). Les AINS classiques, c'est-à-dire non sélectifs, inhibent les deux isoformes de la COX (COX-1 et COX-2), contrairement aux AINS sélectifs de la COX-2 (coxib) (Orliquet *et al.*, 2013).

### 4.3 Anti-inflammatoires enzymatiques

Les enzymes sont des anti-inflammatoires d'efficacité modeste. Elles sont utilisées comme antiœdémateux par voie locale ou par voie orale et sont proposées dans le traitement des œdèmes post-traumatiques ou même postchirurgicaux. Parmi ces enzymes on peut citer Ribatran® qui est une ribonucléase animale d'origine pancréatique à action nucléase et maxilase® une alpha-amylase bactérienne (*Bacillus subtilis*), à activité endoamylase (carbohydase) (Muster, 2005). La principale contre-indication est l'hypersensibilité à l'un des composants. Elles sont surtout prescrites chez l'adulte et à une dose plus faible, chez

l'enfant de plus de 6 ans. Par mesure de précaution, il est préférable de ne pas les utiliser chez les femmes pendant la grossesse (Muster, 2005).

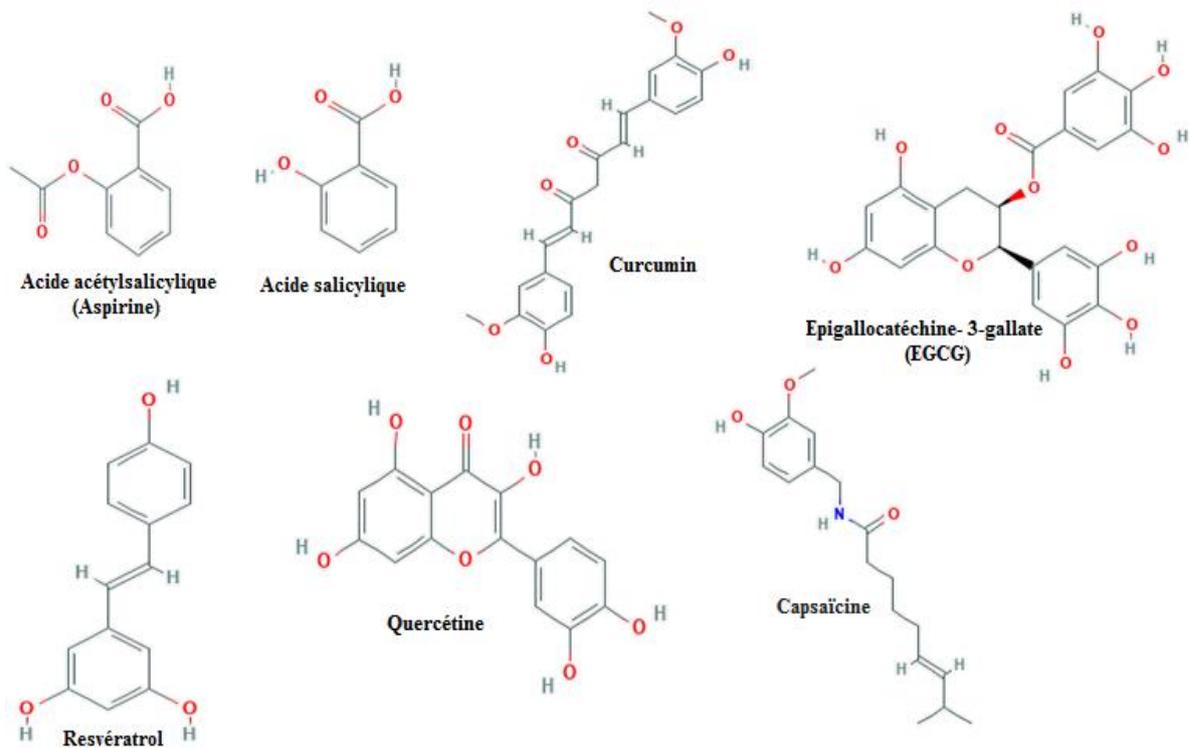
#### 4.4 Anti-inflammatoires à base de plantes

Les enzymes COX convertissent l'acide arachidonique en prostaglandines. Les prostaglandines sont impliquées dans le processus complexe de l'inflammation et sont également responsables de la sensation de douleur. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines permet donc de soulager la douleur et de réduire l'inflammation des tissus enflammés. Un certain nombre d'études ont montré que les plantes possèdent une activité inhibitrice contre les enzymes COX. Ces plantes peuvent donc être une option dans le traitement de la douleur et des affections inflammatoires (Larsen *et al.*, 2015).

Le **tableau n°1** représente la liste des principaux agents anti-inflammatoires issus de plantes médicinales et dont l'activité a été prouvée après des essais pré-cliniques et cliniques. Les structures de ces anti-inflammatoires sont données dans la **figure 6**.

**Tableau 1:** Composés bioactifs dérivés de plantes ayant une activité anti-inflammatoire (Olofsson *et al.*, 2017).

Principal agent	Classe chimique	Source naturelle
<b>Acide acétylsalicylique (aspirine)/modifié par synthèse</b>	Acide 2-(acetoxy)-benzoïque	A partir de l'acide salicylique
<b>Acide salicylique (naturel)</b>	Acide beta-hydroxy	<i>Salix alba</i>
<b>Curcumin</b>	Diarylheptanoïde	<i>Curcuma longa</i>
<b>Epigallocatechine- 3-gallate (EGCG)</b>	Catéchine	<i>Camellia sinensis</i>
<b>Resvératrol</b>	Stilbenoïde	<i>Vitis vinifera</i> <i>Polygonumcuspidatum</i>
<b>Quercétine</b>	Flavonol	Plante (plusieurs fruits, légumes, graines)
<b>Capsaïcine</b>	Capsaïcinoïde	<i>Capsicum</i> sps



**Figure 6:** Structures chimiques des principaux anti-inflammatoires dérivés de plantes (PubChem, s. d.-g, s. d.-a, s. d.-c, s. d.-d, s. d.-f, s. d.-e, s. d.-b).

## 5 Méthodes d'étude de l'activité anti-inflammatoire

### 5.1 Etude *in vitro*

#### 5.1.1 Dénaturation protéique

La dénaturation des protéines est un processus au cours duquel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par l'application d'un stress ou d'un composé externe, comme un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou la chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines est une cause bien documentée de l'inflammation. La méthode consiste à mélanger l'extrait étudié avec une solution de sérum-albumine, et de créer un stress par la chaleur (ex ; 51 C ° à 20 min), la turbidité est ensuite mesurée à 660 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la protéine est calculé comme suit : pourcentage d'inhibition =  $[\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}] \times 100 / \text{Abs contrôle}$  (Leelaprakash et Dass, 2011).

### 5.1.2 Stabilisation membranaire

Le choix de l'érythrocyte comme modèle pour l'étude du mécanisme de stabilisation des membranes présente plusieurs avantages : la surface membranaire des érythrocytes peut être estimée de manière assez précise, et l'érythrocyte est dépourvu de membranes et d'organelles intracellulaires. On peut donc supposer que tout effet d'un médicament sur l'hémolyse osmotique peut être interprété à juste titre comme un effet sur la membrane, bien qu'il soit nécessaire d'exclure les effets sur la matrice intracellulaire (**Seeman et Weinstein, 1966**). Pour tester la stabilité membranaire deux tests sont utilisés, un test de stabilité par la chaleur et un test d'hémolyse, la quantité de l'hémoglobine libérée est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 560 nm, le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit :pourcentage d'inhibition =  $[\text{Abs contrôle}-\text{Abs échantillon}] \times 100/\text{Abs contrôle}$  (**Leelaprakash et Dass, 2011**).

### 5.1.3 Activité anti-lipoxygénase

La voie de la lipoxygénase dans les plantes est l'équivalent de la cascade de l'acide arachidonique chez les animaux. C'est pour cette raison, l'inhibition *in vitro* de la lipoxygénase constitue un très bon modèle pour le criblage de l'activité anti-inflammatoire des substances naturelles. L'activité anti-lipoxygénase est étudiée en mélangeant l'acide linoléique comme un substrat et lipoxydase comme enzyme, en présence de l'extrait de plante étudié, l'incubation est réalisée à 250 °C, et l'absorbance est mesurée à 234 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante : % d'inhibition =  $[(\text{Abs contrôle}-\text{Abs échantillon})/\text{Abs contrôle}] \times 100$ , la IC<sub>50</sub> est aussi déterminée (**Leelaprakash et Dass, 2011**).

## 5.2 Etude *in vivo*

Le criblage de l'activité anti-inflammatoire est réalisé par le test de la carragénine. Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte du rat un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et qui sera traduit en volume et mesuré par le Pléthysmomètre ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire. Cette méthode a été très utilisée dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés, en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'induction des symptômes caractéristiques de l'inflammation (**Riahi et al., 2011**).

*Matériel*

*et*

*méthodes*

## 1 Matériel végétal

*Marrubium vulgare L.*, dans leur habitat naturel. Cette espèce a été récoltée en janvier 2020 dans la région d'Ain Témouchent. Le séchage du matériel végétal est effectué à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 21 jours. Après séchage, la partie aérienne (tiges et feuilles) de la plante est broyée en fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique et stockée soigneusement jusqu'à son utilisation.

## 2 Etude phytochimique de l'extrait butanolique de *M.vulgare L.*

### 2.1 Préparation de l'extrait n-butanol

Dans un erlenmeyer contenant un mélange méthanol/eau (70:30 ; v/v), 10 g de poudre fine du *Marrubium vulgare* sont ajoutés, et ont été laissés macérer pendant 24 h sous agitation douce à température ambiante. Ensuite l'extrait hydroalcoolique est récupéré par filtration sous vide, et est concentré par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor à 40 ° C. On obtient ainsi un extrait aqueux, qui va subir une série d'extractions liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante ; l'hexane, l'éther diéthylique, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. La phase organique finale n-butanol est évaporée à sec (rotavapor à 50 °C), pour obtenir un extrait butanolique destiné aux dosages phytochimiques et à l'étude de son activité biologique.

#### ➤ Détermination du rendement

Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage d'extrait est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{\text{Masse de l'extrait sec (en g)}}{\text{Masse de la matière végétal (en g)}} \times 100$$

R : rendement exprimé en pourcentage % (g/g).

### 2.2 Dosage des polyphénols totaux

#### ➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux est déterminé par une méthode colorimétrique dont le Folin-Ciocalteu est utilisé comme réactif (Singleton *et al.*, 1999). Le principe est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par l'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et l'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMO<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), les principaux constituants du réactif utilisé, qui sont

ainsi réduits en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). L'intensité de la coloration (725 à 760 nm) est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits testés. (Singleton *et al.*, 1999).

Le réactif de Folin-Ciocalteu est sensible aux composés réducteurs, y compris les polyphénols, produisant ainsi une couleur bleue lors de la réaction. Cette couleur bleue est mesurée spectrophotométriquement. Ainsi, le contenu phénolique total peut être déterminée (Maurya et Singh, 2010).

➤ **Procédure**

Un volume de 1 ml butanolique a été mélangé avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 %. Après agitation au vortex, le mélange est laissé reposer pendant 4 minutes à température ambiante puis 4 ml du réactif de carbonate de sodium ( $NaCO_3$ ) à 7.5% sont ajoutés. L'ensemble est incubé pendant 2 heures et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Multi-cell changer 6715UV/Vis JENWAY) à 750 nm.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, l'acide gallique est utilisé comme un standard avec différentes concentrations allant de 0,01 à 0,5 mg/ml qui ont été déjà préparées dans du méthanol à 70%. Le **tableau 2** résume le protocole illustratif et les différentes étapes suivies pour le dosage des polyphénols totaux.

**Tableau 2:** Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux de l'extrait butanolique de *M. vulgare*.

<b>Concentration de l'acide gallique (mg/ml)</b>	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	-
<b>Extrait butanolique (mg/ml)</b>	-	-	-	-	-	-	1,2
<b>Volume en ml</b>	1	1	1	1	1	1	1
<b>Folin-Ciocalteu (ml)</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>Incubation pendant 4 min à une température ambiante</b>							
<b>Carbonate de sodium (<math>NaCO_3</math>) à 7.5% (ml)</b>	4	4	4	4	4	4	4
<b>Incubation pendant 2 h à une température ambiante et à l'obscurité</b>							
<b>Mesure de la DO à 750 nm</b>							

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique (mg EAG) par gramme d'extrait n-butanolique sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de polyphénols} = a.f/b$$

**a** : Concentration en polyphénols en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalonnage

**f** : Facteur de dilution

**b**: Masse de l'extrait

### 2.3 Dosage des flavonoïdes totaux

➤ **Principe**

Le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et au nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) (**Zhishen et al., 1999**). Le principe est basé sur la nitrosation des flavonoïdes par l'acide nitrique, suivie par la formation dans un milieu alcalin, d'un complexe rouge (510 nm) entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et les ions Al (III) (**Zhishen et al., 1999**).

➤ **Procédure**

La teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait n-butanolique est déterminée en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. 1 ml de l'extrait est mélangé à 300  $\mu\text{l}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 0,6 %. Après 6 minutes 300  $\mu\text{l}$  de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 2,2 % sont additionnés au mélange, le tout est laissé incubé pendant six minutes. Après 6 min d'incubation à la température ambiante, 300  $\mu\text{l}$  d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 0,8 M sont ajoutés à chaque tube. L'ensemble est agité au vortex puis laissé reposer pendant 10 minutes à la température ambiante. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis (Multi-cell changer 6715UV/Vis JENWAY).

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, la catéchine est utilisée comme un standard avec différentes concentrations allant de 0,1 à 0,5 qui ont été préparé dans l'éthanol. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme de la

courbe d'étalonnage établie avec la catéchine. Le **tableau 3** résume le Protocole illustratif et les différentes étapes suivies pour le dosage des flavonoïdes totaux.

**Tableau 3:** Mode opératoire du dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique de *M. vulgare*.

<b>Concentration de catéchine (mg/ml)</b>	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-
<b>Extrait butanolique(mg/ml)</b>	-	-	-	-	-	-	1,2
<b>Volume (µl)</b>	300	300	300	300	300	300	300
<b>Nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 6g/l (µl)</b>	300	300	300	300	300	300	300
<b>Incubation pendant 5 min à une température ambiante</b>							
<b>Trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) à 22g/l (µl)</b>	300	300	300	300	300	300	300
<b>Incubation pendant 6 min à une température ambiante</b>							
<b>NaOH 0.8 M (µl)</b>	300	300	300	300	300	300	300
<b>Incubation pendant 10 minutes à une température ambiante</b>							
<b>La lecture de la DO a été réalisée 510 nm.</b>							

➤ **Expression des résultats**

Le taux des flavonoïdes totaux dans l'extrait butanolique de *M. vulgare*, exprimé en milligramme équivalent de la catéchine (mg EC) par gramme de l'extrait est calculé comme suit :

$$\text{Quantité de flavonoïdes} = a.f/C$$

**a** : Concentration des flavonoïdes en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalonnage

**f** : Facteur de dilution

**c** : Masse de l'extrait

### 3 Etude *in vitro* de l'activité biologique de l'extrait n-butanolique de *M. vulgare*

#### 3.1 Evaluation de l'activité anti-hémolytique de l'extrait butanolique

##### ➤ Principe

Activité anti-inflammatoire de l'extrait n-butanolique peut être étudiée *in vitro* par l'utilisation des membranes des érythrocytes qui représentent des similitudes avec d'autres membranes cellulaires notamment des lysosomes, l'effet sur la stabilisation de la membrane érythrocytaire pourrait être extrapolé à la stabilisation de la membrane lysosomale (**Shobana et Vidhya, 2016**). Dans notre étude, nous avons utilisé deux tests, un test de stabilité par la chaleur et un test d'hémolyse, en se basant sur la méthode suivie par **Shinde** et ces collaborateurs (**1999**).

##### ➤ Mode opératoire

#### A- Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang humain a été prélevé par ponction veineuse sur un volontaire humain en bonne santé qui n'a pas pris d'AINS pendant 14 jours et placé délicatement dans un tube hépariné. L'obtention des globules rouges du sang total a été effectuée comme suit :

- Le tube a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes.
- Le plasma a été soigneusement éliminé, y compris la couche leucocytaire.
- Le culot ainsi récupéré, est lavé trois fois avec du sérum physiologique (0,9%), et reconstitué dans une solution tampon iso-saline (pH=7.4), à 40% (v/v).

#### B- Test de la stabilisation membranaire par la chaleur

Le **tableau 4** résume les différentes étapes utilisées dans le test de stabilisation membranaire par la chaleur. Deux séries de tubes ont été utilisées pour ce test, une est incubée à 54°C et l'autre à 4°C, pendant 20 min. Chaque tube contenant un mélange réactionnel qui était composé de 0,5 ml d'extrait butanolique de *M. vulgare* testé à différentes concentrations (350, 700 et 1400 µg/ml), de 4,5 ml d'une solution tampon phosphate (pH=7.4), et de 30 µl de la suspension érythrocytaire à 40%. Après incubation, le mélange réactionnel a été centrifugé à 1300 rpm pendant 3 min et l'absorbance des surnageants récupérés a été mesurée à 540 nm en utilisant un spectrophotomètre UV/Vis (Multi-cell changer 6715UV/Vis JENWAY). L'acide

salicylique (un anti-inflammatoire non stéroïdien), a été utilisé comme un contrôle positif a 500 µg/ml.

**Tableau 4:** Mode opératoire du test de la stabilisation membranaire par la chaleur.

<b>Concentrations de l'extrait butanolique (µg/ml)</b>		350	700	1400	-
<b>Acide salicylique (µg/ml)</b>	-	-	-	-	500
<b>Ethanol (ml)</b>	0.5	-	-	-	-
<b>Volumes (ml)</b>	-	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>Solution tampon phosphate (pH=7.4)</b>	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
<b>Volume de la suspension érythrocytaire (µl)</b>	30	30	30	30	30
<b>Chaque tube est préparé en deux exemplaires ; un est incubé à 54° dans un bain Marie et l'autre à 0°, pendant 20 min.</b>					
<b>Centrifugation 3 min à 1300 g.</b>					
<b>Récupération du surnageant et lecture de l'absorbance à 520 nm.</b>					

➤ **Calcul du pourcentage d'inhibition**

Le % de l'activité de stabilisation de la membrane a été calculé par la formule mentionnée ci-dessous (**Sindhi et al., 2013**):

$$\text{Pourcentage inhibition de l'hémolyse} = \left( 1 - \frac{DO2 - DO1}{DO2' - DO1'} \right) \times 100$$

DO1 : Echantillon à 0 °C

DO2 : Echantillon à 54 °c.

DO1' : Contrôle négative à 0 °c.

DO2' : Contrôle négatif à 54 °c.

**C- Test d'hémolyse**

Deux séries de tubes ont été utilisées, une a été traitée par une solution tampon phosphate isotonique (pH=7.4) et l'autre par une solution tampon hypotonique (pH=7.4). Chaque tube contenant un mélange réactionnel qui compose de 0,5 ml de l'extrait butanolique de *M.vulgare* à 350, 700 et 1400 µg/ml, de 4,5 ml de solution tampon phosphate isotonique ou hypotonique (pH=7.4), et de 30 µl de la suspension érythrocytaire à 40%. L'acide salicylique (500 µg/ml) a été utilisé comme un contrôle positif. Les tubes ont été incubés à une température ambiante pendant 10 minutes. Après incubation des tubes, le mélange réactionnel a été centrifugé pendant 3 min à 1300 rpm. Le liquide surnageant a été récupéré décanter et la teneur en hémoglobine a été estimée par un spectrophotomètre à 540 nm. Le **tableau 5** résume le mode opératoire utilisé dans le test d'hémolyse.

**Tableau 5:** Mode opératoire du test d'hémolyse.

<b>Concentrations de l'extrait aqueux (µg/ml)</b>	-	350	700	1400	-
<b>Concentrations de l'acide salicylique (µg/ml)</b>	-	-	-	-	200
<b>Volumes (ml)</b>	-	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>H<sub>2</sub>O (ml)</b>	0.5	-	-	-	-
Chaque tube est préparé en deux séries, une est additionnée d'une solution tampon phosphate hypotonique (pH 7,4) et l'autre d'une solution tampon phosphate isotonique (pH 7.4)					
<b>Volume de la suspension érythrocytaire 40 % (µl)</b>	30	30	30	30	30
Incubation à la température ambiante pendant 10 min					
Centrifugation 3 min à 1300 rpm					
Récupération du surnageant et lecture de l'absorbance à 540 nm.					

➤ **Calcul du pourcentage d'inhibition de l'hémolyse**

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé comme suit (Sindhi *et al.*, 2013):

$$\text{Pourcentage inhibition de l'hémolys} = \left(1 - \frac{DO2 - DO1}{DO2' - DO1'}\right) \times 100$$

DO1 : Echantillon traité par la solution isotonique.

DO2 : Echantillon traité par la solution hypotonique.

DO1' : Contrôle négative traité par la solution isotonique.

DO2' : Contrôle négatif traité par la solution hypotonique.

**D. Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes (m) accompagnées de leur indice de dispersion qui est l'erreur standard à la moyenne (ESM) : **m ± ESM**

$$\text{Moyenne (m)} \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

$$\text{Ecart type } (\sigma) \sigma = \sqrt{\text{variance}}$$

$$\text{Erreur standard de la moyenne (ESM)} \quad \text{EMS} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Pour comparer deux échantillons indépendants, on applique le test de Student à un degré de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon.

La différence entre deux moyennes est significative à  $P \leq 0.05$  (\*).

*Résultats*  
*et*  
*discussion*

## 1 Etude phytochimique de *M.vulgare*

### 1.1 Préparation de l'extrait n-butanolique

L'extraction sélective des métabolites secondaires par les solvants, permet selon la nature de ce dernier d'obtenir des composés ciblés, généralement, les solvants polaires sont utilisés pour l'extraction des composants hydrophiles, alors que les solvants non polaires (ou apolaires) sont préférés pour l'extraction des métabolites secondaires lipophiles (**El Mehdi et al., 2021**).

Dans un but d'obtenir un extrait riche en polyphénols à partir de la partie aérienne de *M. vulgare*, nous avons procédé à une extraction sélective en deux étapes, la première consiste en une extraction solide-liquide, en utilisant un mélange hydrométhanoïque à 70 % (v/v), en effet les composés phénoliques sont normalement solubles dans les solvants organiques polaires comme l'eau et le méthanol, et leur solubilité augmente avec le nombre des groupements hydroxyles (**Belščak-Cvitanović et al., 2018**). De plus des études sur *M. vulgare* ont montré que l'extrait méthanolique a donné la plus grande valeur en composés phénoliques et en flavonoïdes (**Bouterfas et al., 2016; Ghedadba et al., 2014**).

La deuxième étape est une série d'extraction liquide-liquide une méthode fondée sur la distribution inégale d'un soluté entre deux solvants en fonction de sa solubilité dans chacun d'entre eux (**Abe et al., 2010**). Dans notre étude nous avons utilisé des solvants à polarité croissante, le n-hexane et l'éther diéthylique qui isolent les composés non polaires comme les lipides et les pigments chlorophylliens respectivement, l'acétate d'éthyle qui extrait les monoglycosides et le n-butanol qui extrait les glycosides dont les flavonoïdes (**Sarker, 2006**).

Nous nous sommes intéressés à l'extrait final (le n-butanol) susceptible de contenir la fraction la plus importante des polyphénols, dont les flavonoïdes. Les tests phytochimiques qualitatifs réalisés sur cet extrait, ont prouvé la présence des flavonoïdes, qui ont donné une forte coloration rose-orangé en réaction avec l'acide chlorhydrique et les tournures de magnésium. En revanche, ces mêmes tests ont prouvé l'absence de tous les autres métabolites secondaires, à savoir les tannins, les quinones, les saponosides, les stéroïdes et les alcaloïdes.

L'extrait n-butanol riche en polyphénols a donné un rendement de 2.7% (g/g de plante sèche), dans l'étude de **Ghedadba (2018)** réalisée sur la même espèce mais sur les feuilles sèches et les sommités fleuries, montre que l'extrait butanolique donne un rendement de 8,7 %, qui est

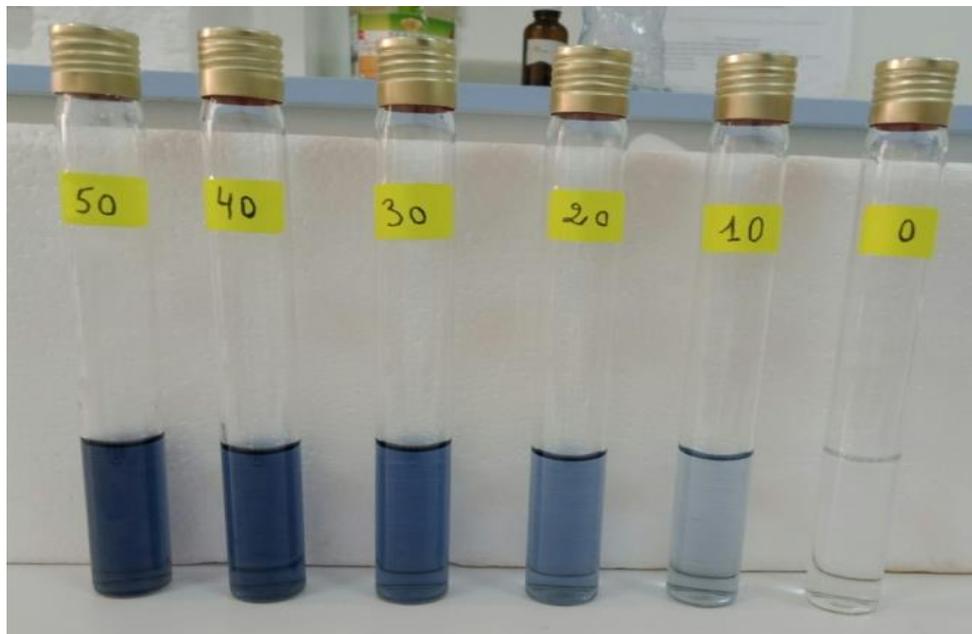
trois fois plus que le nôtre, par ailleurs l'extrait aqueux lyophilisé a donné un rendement très important de 12,98 %.

Cette variation de rendement peut être dû à plusieurs facteurs notamment le poids du matériel végétatif initiale, la partie étudiée de la plante, la période, le lieu de la récolte et la durée de séchage (**Ghedadba et al., 2014**).

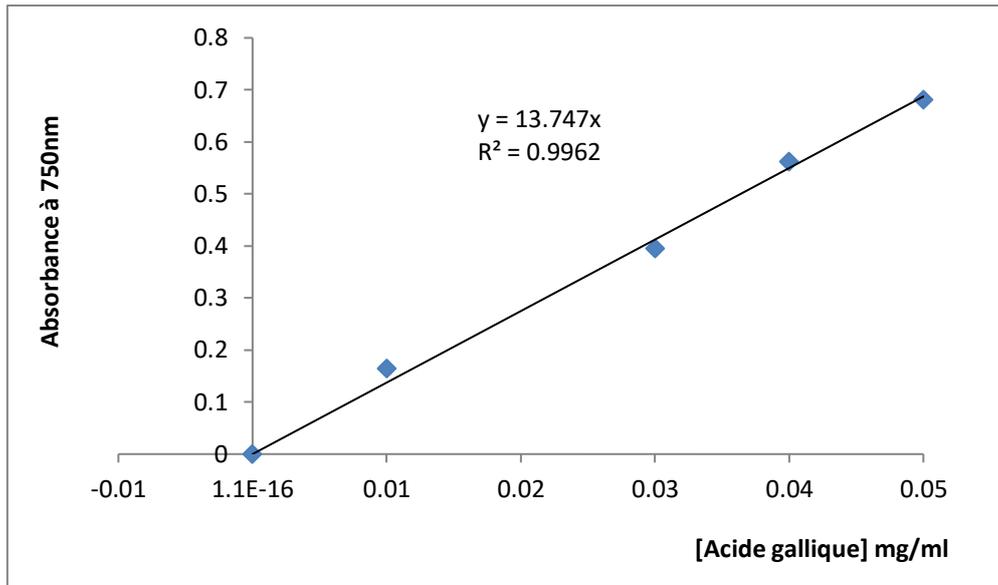
Il est important de souligner que le choix des solvants, ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tout le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (**Gheffour et al., 2015**).

### 1.2 Teneur en composés phénoliques totaux

Le contenu phénolique dans l'extrait n-butanolique de *M. vulgare* a été déterminé avec le réactif de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme composé standard (**Fig.7**). Les résultats obtenus pour la concentration des polyphénols totaux sont exprimés en mg EAG/ g d'extrait butanolique en utilisant l'équation de la courbe standard (**Fig.8**).



**Figure 7** : Gamme étalon d'acide gallique (0-50µg/ml).



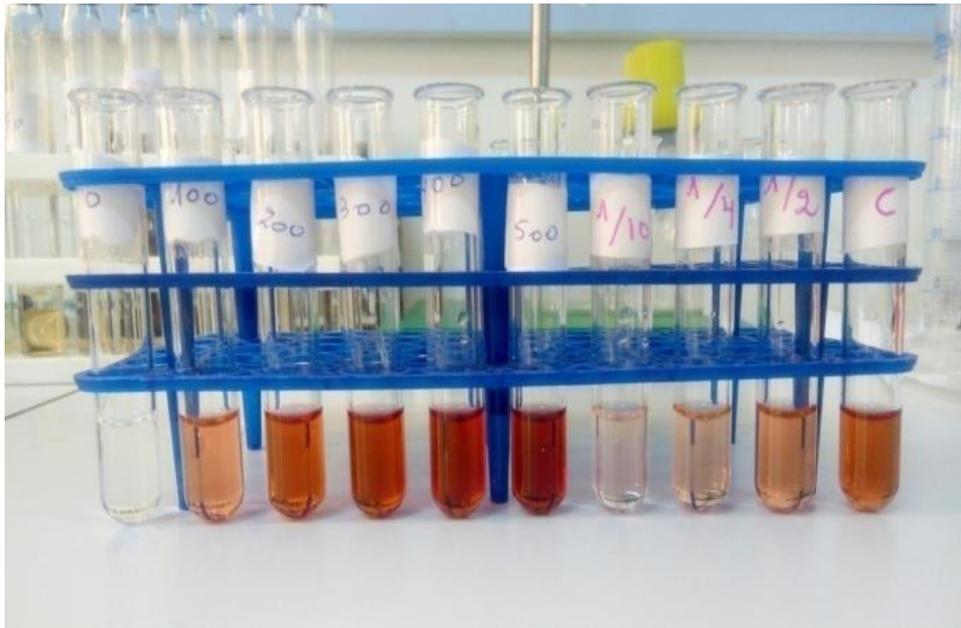
**Figure 8 :** Courbe étalon de l'acide gallique ( $\lambda=750$  nm).

Le contenu phénolique dans l'extrait examiné s'est étendu à une valeur de  $142 \pm 2,66$  mg EAG/ g d'extrait butanolique. Ce résultat est identique à celui obtenu par **Ghedadba, (2018)** sur la même espèce, et qui été d'une valeur de  $149 \pm 0,94$  mg EAG/ g d'extrait butanolique, Par contre, **Matkowski et ces collaborateurs (2008)**, ont trouvé un taux plus faible et qui de  $71.3 \pm 7.5$  mg EAG/ g d'extrait butanolique.

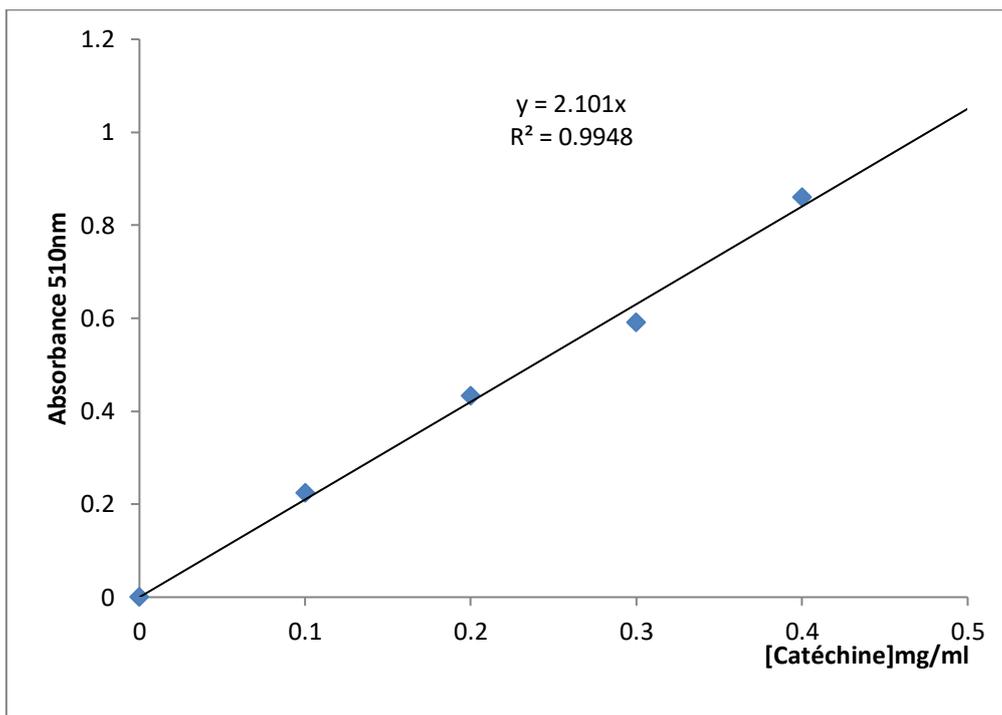
La quantité des composés phénoliques et des flavonoïdes des extraits de plantes varie d'une plante à l'autre, cela est probablement dû à la localisation géographique, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la maturité de la plante et la durée de conservation (**Gheffour et al., 2015**).

### 1.3 Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode spectrophotométrique utilisant le chlorure d'aluminium et le nitrite de sodium. La catéchine a été utilisée comme étalon (**Fig.9**) à différentes concentrations. La concentration des flavonoïdes a été exprimée en mg équivalent de catéchine EC/g d'extrait butanolique, en utilisant l'équation standard de la courbe (**Fig.10**).



**Figure 9:** Gamme étalon de la catéchine (0-500µg/ml) et l'extrait butanolique.



**Figure 10 :** Courbe étalon de la catéchine ( $\lambda=510$  nm).

Les résultats obtenus montrent que la concentration des flavonoïdes dans l'extrait butanolique est de  $288,53 \pm 19,88$  mg EC/g d'extrait et qui est largement supérieure à celui obtenu par (Nour El Islam *et al.*, 2020) qui ont fait le dosage sur le même extrait et qui ont révélé une teneur de 182,54 mg EAG/g d'extrait. D'autres études réalisées sur la même espèce, déclare

que la teneur en flavonoïdes de l'extrait butanolique est de  $20,90 \pm 0,78$  mg E quercétine/g (GHEDADBA, 2018), qui est inférieur à celle du travail actuel, cette différence entre les résultats peut être expliquée par le type du standard utilisé dans le dosage.

Les teneurs en polyphénols, dont les flavonoïdes, varient qualitativement et quantitativement pour la même espèce et cela peut être attribué à plusieurs facteurs, tels que les facteurs géographiques, climatiques et environnementaux (Zaid, 2020). D'autre part, les facteurs endogènes tels que la différenciation tissulaire, le stade de développement de la plante, la concurrence, l'état nutritionnel, les facteurs génétiques, le degré de maturation de la plante ont aussi une forte influence sur la teneur en polyphénols. De plus, les méthodes d'extraction et de quantifications utilisées et même le site et la période de la collecte de la plante peuvent également influencer la teneur en polyphénols (Zaid, 2020).

La composition phytochimique de *Marrubium vulgare* a été le sujet de plusieurs études, dans lesquelles les structures de plusieurs flavonoïdes ont été identifiées telles que l'apigénine, la vitexine, la quercétine et la lutéolin (Lodhi *et al.*, 2017). De plus la plante contient de l'acide ursolique, de la choline, des labdanes (diterpènes) en particulier la marrubiine (en forte concentration), des phénylpropanoïde et des glycosides phényléthanoïdes (Lodhi *et al.*, 2017), et de l'acide gallique (Ghedadba *et al.*, 2014).

## 2 L'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* d'extrait butanolique deux tests ont été réalisés :

- Test de la stabilisation membranaire par la chaleur
- Test de la stabilisation membranaire par la solution hypotonique

Ces deux procédés provoquent l'hémolyse des cellules érythrocytaires (globules rouges), si l'extrait butanolique possède des molécules anti-hémolytiques donc il peut prévenir cette hémolyse. L'acide salicylique (500 µg/ml) est utilisé comme un anti-inflammatoire standard de référence. Les résultats sont présentés dans le **tableau 6**.

**Tableau 6:** Effet de l'extrait butanolique de *M. vulgare L*, contre l'hémolyse des membranes érythrocytaire, induite dans la chaleur et dans la solution hypotonique.

Traitement	Concentrations (µg/ml)	Inhibition de l'hémolyse (%)	
		Chaleur	Solution hypotonique
Extrait butanolique de <i>M.vulgare L</i>	350	29,41 ± 0,41	62,65 ± 3,11
	700	*48,22 ± 0,22	84,72 ± 0,28
	1400	*44,14 ± 0,14	67,16 ± 0,16
Acide salicylique	500	*36,50 ± 0,50	80,54 ± 1,56

\* P<0.05.

Concernant l'hémolyse induite par chaleur testée sur l'espèce *Marrubium vulgare*, et d'après les résultats obtenus qui sont montrés dans le **tableau 6**, l'extrait butanolique a donné un taux le plus élevé de protection contre l'hémolyse qui égale à 48,22 ± 0,22 % à une concentration de 700 µg/ml et qui est supérieur même au taux de standard (acide salicylique) qui égale à 36,50 ± 0,50 % à une concentration de 500 µg/ml.

D'autre part, les résultats du test de l'activité anti-inflammatoire qui utilise l'hémolyse des globules rouges par la solution hypotonique, montre que l'extrait butanolique donne un effet protecteur maximal contre l'hémolyse qui est de valeur 84,72 ± 0,28 % à une concentration de 700 µg/ml et qui identique à celui du standard qui égale à 80,54 ± 1,56 à une concentration de 500 µg/ml.

Des études réalisées sur différents extraits de *M. Vulgare* ont aussi prouvé que la plante possède un effet anti-inflammatoire significatif, l'extrait méthanolique (**Lodhi et al., 2017**) et l'extrait chloroformique (**Namoune et al., 2018**), ont montré un effet sur la production des facteurs de nécrose tumorale (TNF-α). D'autre part, l'extrait méthanolique a montré un effet inhibiteur sur l'enzyme cyclooxygénase (**Hyun et al., 2016**).

Les études phytochimiques réalisées sur *M.vulgare* ont permis de caractériser différents métabolites, en particulier les flavonoïdes (lutéoline, apigénine et quercétine), et les diterpénoïdes de labdane (marrubiine) (**Nicholas, 1964; Zawiślak, 2012**), ces deux classes de

métabolites secondaires ont été considérées comme responsables de l'activité anti-inflammatoire de la plante.

**Kim et ses collaborateurs (2004)** ont suggéré que les flavonoïdes agissent comme des anti-inflammatoires en inhibant les enzymes génératrices d'eicosanoïdes, notamment la phospholipase A-2, les cyclo-oxygénases et les lipoxygénases, ce qui réduit les concentrations de prostanoïdes. D'autres études ont également montré que certains flavonoïdes, en particulier les dérivés de flavones, expriment leur activité anti-inflammatoire par la modulation de l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que la cyclo-oxygénase-2, l'oxyde nitrique synthase inductible et plusieurs cytokines (**Kim *et al.*, 2004**).

# Conclusion

## Conclusion

Nombreux patients atteints des maladies inflammatoires vont consommer des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non stéroïdiens pour se guérir de ces maladies, mais, l'utilisation à long cours de ces médicaments thérapeutiques est souvent liée à des effets indésirables tels que la prise de poids, les troubles digestifs et l'insuffisance rénale, ce qui a poussé les scientifiques à rechercher des sources naturelles d'un traitement à base des plantes médicinales qui présentent un vaste spectre des propriétés thérapeutiques.

Parmi ces plantes médicinales, *Marrubium vulgare* qui appartenant à la famille des Lamiaceae très fréquemment employées en Algérie. L'effet anti-inflammatoire *in vitro* d'extrait butanolique de *Marrubium vulgare* a été évalué dans ce travail.

Les essais phytochimiques exercés sur cette espèce en particulier la méthode de Folin-Ciocalteu à révéler la présence des polyphénols, de même le test de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et au nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) montre l'abondance de cette espèce en flavonoïdes.

Dans le but d'évaluer les activités anti-inflammatoires *in vitro* de cette plante, l'extrait butanolique a été mélangé par les cellules érythrocytaires dans deux conditions différentes, l'une dans la chaleur ( $54\text{ }^\circ\text{C}$ ) et l'autre en présence de la solution hypotonique, l'acide salicylique est utilisé comme un agent anti-inflammatoire standard. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait butanolique de *M. vulgare* présente des pourcentages d'inhibition de l'hémolyse très importants et donc une efficacité contre l'inflammation.

A la lumière de cette étude, ce travail préliminaire consacré à un extrait de *M. vulgare* nécessite d'être poursuivie en s'intéressant essentiellement à :

L'isolement et la caractérisation des différents métabolites secondaires présents dans l'extrait butanolique.

L'étude *in vitro* et *in vivo* des activités biologiques des molécules isolées, afin de sélectionner les plus actives, et d'étudier leurs mécanismes d'action.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation : A review. *Veterinary world*, 11(5), 627.
- Abe, E., Delyle, S. G., & Alvarez, J. C. (2010). Extraction liquide-liquide : Théorie, applications, difficultés. *Annales de Toxicologie Analytique*, 22(2), 51-59.
- Aćimović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiproviski, B., Sikora, V., & Zeremski, T. (2020). *Marrubium vulgare L.* : A Phytochemical and Pharmacological Overview. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122898>
- Amri, B., Martino, E., Vitulo, F., Corana, F., Kaâb, L. B.-B., Rui, M., Rossi, D., Mori, M., Rossi, S., & Collina, S. (2017). *Marrubium vulgare L.* leave extract : Phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. *Molecules*, 22(11), 1851.
- AOUADHI, C., GHAZGHAZI, H., HASNAOUI, B., & MAAROUFI, A. (2013). Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie. *Microbiol. Hyg. Alim*, 25(73), 9-14.
- Barton, G. M. (2008). A calculated response : Control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 413-420.
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties *Polyphenols: Properties, recovery, and applications* (pp. 3-44): Elsevier.
- Boukhari, A. A., Hartani, M., & Boumesbah, S. (s. d.). *Etude de la corrélation entre la vitesse de sédimentation des hématies et la protéine C réactive dans la recherche d'un syndrome inflammatoire.*
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves

extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Annales pharmaceutiques francaises*, 74(6), 453-462.

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204.
- *CRP - CSCQ*. (s. d.). studylibfr.com. Consulté 8 avril 2021, à l'adresse <https://studylibfr.com/doc/2140224/crp---cscq>
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2020). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food chemistry*, 127535.
- El Mehdi, A.-A., El KHETABI, A., BELMALHA, S., & LAHLALI, R. (2021). Utilisation des extraits de plantes contre les maladies de post-récolte des fruits. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2).
- Emile, C. (2012). Marqueurs de l'inflammation: À partir de deux cas cliniques. *Option/Bio*, 23(476), 22-24.
- Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago, A., & Pérez-Álvarez, E. P. (2017). *Phenolic compounds: Types, effects, and research* (Vol. 1-1 online resource.). Nova Science Publishers, Inc.; WorldCat.org. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1540099>
- GHEDADBA, N. (2018). Contribution à l'étude de l'activité biologique des deux espèces de *Marrubium vulgare* L et *Marrubium deserti* de Noé *in vitro et in vivo*. [Doctoral, Université de Batna 2]. <http://eprints.univ-batna2.dz/1551/>

- Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15-24.
- Ghedadba, N., Hambaba, L., Aberkane, M. C., Oueld-Mokhtar, S. M., Fercha, N., & Bousselsela, H. (2014). Évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, 2(2), 64-74.
- Gheffour, K., Boucherit, K., & Boucherit-Otmani, Z. (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.
- Hamdi, A., Majouli, K., Abdelhamid, A., Marzouk, B., Belghith, H., Chraief, I., Bouraoui, A., Marzouk, Z., & Vander Heyden, Y. (2018). Pharmacological activities of the organic extracts and fatty acid composition of the petroleum ether extract from *Haplophyllum tuberculatum* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 216, 97-103.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- Hyun, T. K., Kim, H.-C., Ko, Y.-J., & Kim, J.-S. (2016). Antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and anti-inflammatory effects of aerial parts extract from Korean crowberry (*Empetrum nigrum* var. *Japonicum*). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 181-188.
- Iwalewa, E. O., McGaw, L. J., Naidoo, V., & Eloff, J. N. (2007). Inflammation : The foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(25).
- Izadi, P., Izadi, P., Salem, R., Papry, S. A., Magdouli, S., Pulicharla, R., & Brar, S. K. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the environment : Where were we and how far we have come? *Environmental Pollution*, 267, 115370. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115370>

- Jouzeau, J.-Y., Daouphars, M., Benani, A., & Netter, P. (2004). Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 28, 7-17.
- Kebbi, S., Fadel, H., Chalchat, J., Figueredo, G., Chalard, P., Hazmoune, H., Benayache, F., Benayache, S., & Seghiri, R. (2020). Chemical Composition of Algerian *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. And *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae) Essential Oils from the Aures Region. *Acta Scientifica Naturalis*, 7(2), 1-14.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 0411110005-0411110005.
- Lai-Cheung-Kit, I., Lemarchand, B., Bouscaren, N., & Gaüzère, B.-A. (2019). Consommation des anti-inflammatoires non stéroïdiens lors de la préparation au Grand Raid 2016 à La Réunion. *Science & Sports*, 34(4), 244-258.
- Larsen, B. H. V., Soelberg, J., & Jäger, A. K. (2015). COX-1 inhibitory effect of medicinal plants of Ghana. *South African Journal of Botany*, 99, 129-131.
- Leelaprakash, G., & Dass, S. M. (2011). *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3), 189-196.
- Lodhi, S., Vadnere, G. P., Sharma, V. K., & Usman, M. (2017). *Marrubium vulgare* L. : A review on phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(4), 429.
- Matkowski, A., Tasarz, P., & Szypua, E. (2008). Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(11), 321-330.
- Maurya, S., & Singh, D. (2010). Quantitative analysis of total phenolic content in *Adhatoda vasica* Nees extracts. *International Journal of PharmTech Research*, 2(4), 2403-2406.

- Mohammed, M. S., Osman, W. J., Garelnabi, E. A., Osman, Z., Osman, B., Khalid, H. S., & Mohamed, M. A. (2014). Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *J Phytopharmacol*, 3(4), 275-285.
- Muster, D. (2005). Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1(1), 21-29.
- Namoune, I., Khettal, B., Assaf, A. M., Elhayek, S., & Arrar, L. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of organic and aqueous extracts of northeast Algerian *Marrubium vulgare*. *Phytothérapie*, 16(S1), S119-S129.
- Ndiaye, M., Sy, G., Dièye, A., Touré, M., & Faye, B. (2006). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*annona reticulata* (annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat induit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 15, 179-186.
- Nedjimi, B., Souissi, Z. E., Guit, B., & Daoud, Y. (2020). Differential effects of soluble salts on seed germination of *Marrubium vulgare* L. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 17, 100250.
- Nicholas, H. J. (1964). Isolation of marrubiin, a sterol, and a sesquiterpene from *Marrubium vulgare*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 53(8), 895-899.
- NOUIRI, W. (2020). Évaluation de l'activité antibactérienne des champignons endophytes isolés à partir de *Marrubium vulgare* [PhD Thesis]. UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA.
- Nour El Islam, Z., Abd El Kader, S., & Oussama, D. (2020). Contribution à l'étude des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'extrait butanolique des feuilles de *Marrubium vulgare* L., de la région d'Ain-Témouchent.
- Olofsson, P. S., Metz, C. N., & Pavlov, V. A. (2017). *Inflammation : From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic*.
- Orliaguet, G., Gall, O., & Benabess-Lambert, F. (2013). Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, 17(5), 228-237.
- Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P., & Jialal, I. (2020). Chronic inflammation. *StatPearls [Internet]*.

- Pillon, F. (2014). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités Pharmaceutiques*, 53(534), 43-46.
- PubChem. (s. d.-a). *Aspirin*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2244>
- PubChem. (s. d.-b). *Capsaicin*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1548943>
- PubChem. (s. d.-c). *Curcumin*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516>
- PubChem. (s. d.-d). *(-)-Epigallocatechin gallate*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65064>
- PubChem. (s. d.-e). *Quercetin*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343>
- PubChem. (s. d.-f). *Resveratrol*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445154>
- PubChem. (s. d.-g). *Salicylic acid*. Consulté 5 mai 2021, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/338>
- Raymondjean, M. (2007). Les mécanismes de l'inflammation périphérique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(389), 21-28. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(07\)80058-X](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(07)80058-X)
- RAZAVI, H., & HARCKEN, C. (2012). Non-steroidal dissociated glucocorticoid receptor agonists. *Anti-Inflammatory Drug Discovery*, 481-516.
- Riahi, R. C., Tarhouni, S., & Kharrat, R. (2011). Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88(1-4), 19.
- Rodríguez Villanueva, J., Martín Esteban, J., & Rodríguez Villanueva, L. (2017). A Reassessment of the *Marrubium Vulgare* L. Herb's Potential Role in Diabetes Mellitus

Type 2 : First Results Guide the Investigation toward New Horizons. *Medicines*, 4(3).  
<https://doi.org/10.3390/medicines4030057>

- Rousselet, M., Vignaud, J. M., Hofman, P., & Chatelet, F. P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3). *Copyright AFECAP*, 1-75.
- Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I. (2006). *Natural Products Isolation*. Totowa, New Jersey: umana Press Inc.
- Schlemper, V., Ribas, A., Nicolau, M., & Cechinel Filho, V. (1996). Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*, 3(2), 211-216.
- Seeman, P., & Weinstein, J. (1966). I. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochemical Pharmacology*, 15(11), 1737-1752.
- Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J., & Saraf, M. N. (1999). Membrane stabilizing activity—A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodarata* wood oil. *Fitoterapia*, 70(3), 251–257.
- Shobana, S., & Vidhya, R. (2016). Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (linn.). *World J Pharm Pharm Sci*, 5(5), 1182-1196.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of pharmacy research*, 7(9), 828-835.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, p. 152–178). Elsevier.
- Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathe, G. (2002). Polyphenols : Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(4), 200-207.

- Weill, B., & Batteux, F. (2003). *Immunopathologie et réactions inflammatoires*. De Boeck Supérieur.
- Zaid, K. (2020). Contribution à l'étude des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des racines de *Salvadora persica L.* Repéré à: <http://193.194.79.186/memoire/%D9%82%D8%A7%D8%B9%D8%AF%D8%A9%20%D8%A8%D9%8A%D8%A7%D9%86%D8%A7%D8%AA%20%D8%B9%D9%84%D9%88%D9%85%20%D8%A7%D9%84%D8%B7%D8%A8%D9%8A%D8%B9%D8%A9%20%D9%88%20%D8%A7%D9%84%D8%AD%D9%8A%D8%A7%D8%A9/2020/biochimie/5752/Activit%C3%A9%20biologique%20S%20persica%2015%20juin%202020-converti.pdf>.
- Zawislak, G. R. A. Ż. Y. N. A. (2012). The chemical composition of the essential oil of *Marrubium vulgare L.* from Poland. *Farmacia*, 60(2), 287-292.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555–559.