

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 Témouchent- 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 antioxydante de l'extrait enrichi en polyphénols
de Marrubium vulgare L.*

Présenté Par :

- 1) M^{elle} Aicha Fersi
- 2) M^{elle} Marwa Bouhadi

Devant le jury composé de :

Dr Nassima Brixî Gormat	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Présidente
Dr Nesrine Bentabet	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinatrice
Dr Meriem Zerriouh	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2020/2021

Remerciements

Nous remercions Dieu le tout puissant, omnipotent et miséricordieux de nous avoir accordé des connaissances de la science, de nous avoir donné la volonté, le courage et la patience de réaliser ce travail.

Au début, on souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Dr Zerriouh Meriem, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour ses conseils et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

Nous tiendrons aussi à exprimer notre profonde gratitude et nos remerciements aux membres de jury Dr Brixj Gormant Nassima et Dr Bentabet Nesrine, de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.

Sans oublier de remercier vivement le personnel du laboratoire de biochimie de l'université BELHADJ Bouchaib.

Ce mémoire n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien actif des membres de nos familles, surtout nos parents qu'ils nous ont toujours encouragés moralement et matériellement et à qui on tient à les remercier.

Enfin, nous remercions gracieusement nos amis et collègues et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Dans cette étude, un extrait n-butanolique a été préparé à partir des feuilles de *Marrubium vulgare* par extraction sélective dans un but de l'enrichir en polyphénols, et d'étudier *in vitro* son pouvoir antioxydant. Les taux des polyphénols et des flavonoïdes exprimés par rapport au poids sec de l'extrait préparé sont de l'ordre de $161,51 \pm 18,71$ mg EAG/g et de $265,81 \pm 29,49$ mg EC/g respectivement. Le pouvoir antioxydant de l'extrait évalué par un test de DPPH a donné une IC_{50} égale à $28,45 \mu\text{g/ml}$ qui est 20 fois moins importante que celle l'acide ascorbique ($IC_{50}=1, 41 \mu\text{g/ml}$). Le test de FRAP a montré que notre extrait à la concentration de $2,5 \text{ mg/ml}$ a un pouvoir réducteur ($DO=1,89 \lambda=700$) supérieur à celui de l'acide ascorbique mesuré à la même concentration ($DO=1,54 \lambda=700$). À la lumière de ces résultats *M. vulgare* d'Ain Témouchent peut être considérée comme une source importante de molécules antioxydantes qui nécessitent d'être mieux étudiées et exploitées.

Mots clés : *Marrubium vulgare L.*, extrait n-butanolique, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante, DPPH, FRAP.

Summary

In this study, n-butanol extract was prepared from *Marrubium vulgare* leaves using selective extraction in order to enriched it with polyphenols and to study *in vitro* its antioxidant capacity. The levels of polyphenols and flavonoids expressed to the dried weight of the prepared extract are to the order of $161,51 \pm 18,71$ mg EGA/g et de $265,81 \pm 29,49$ mg EC/g respectively. The antioxidant capacity of the extract evaluated with DPPH test has given an IC_{50} equal to $28,45 \mu\text{g/ml}$ which is 20 times less important than of ascorbic acid ($IC_{50}=1, 41 \mu\text{g/ml}$). The FRAP test showed that our extract at the concentration of 2.5 mg/ml has a reducing power ($DO=1,89 \lambda=700$) greater than the one of ascorbic acid evaluated at the same concentration ($DO=1,54 \lambda=700$). In light of these results *M. vulgare* of Ain Témouchent could be considered as an important source of antioxidant molecules which need to be more studied and explored.

Key words: *Marrubium vulgare L.*, n-butanolic extract, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, DPPH, FRAP.

ملخص

في هذه الدراسة تم تحضير مستخلص n-بيوتانول من أوراق *Marrubium vulgare* باستخدام الاستخراج الانتقائي لإثرائه بالبوليفينول ودراسة قدرته المضادة للأكسدة في المختبر. مستويات البوليفينول والفلافونويد المعبر عنها للوزن المجفف للمستخلص المحضر تصل إلى $161,51 \pm 18,71$ مجم EGA / جم و $265,81 \pm 29,49$ مجم EC / جم على التوالي. أعطت السعة المضادة للأكسدة للمستخلص الذي تم تقييمه باختبار IC_{50} DPPH يساوي $28,45$ ميكروغرام / مل وهو 20 مرة أقل أهمية من حمض الأسكوربيك ($IC_{50} = 1, 41$ ميكروغرام / مل). أظهر اختبار FRAP أن مستخلصنا بتركيز 2.5 مجم / مل له قوة اختزال ($DO = 1.89 \lambda = 700$) أكبر من مستخلص حمض الأسكوربيك الذي تم تقييمه بنفس التركيز ($DO = 1,54 \lambda = 700$). في ضوء هذه النتائج يمكن اعتبار *M. vulgare* لعين تموشنت كمصدر مهم للجزيئات المضادة للأكسدة التي تحتاج إلى مزيد من الدراسة والاستكشاف.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium vulgare L.* ، خلاصة n-butanolic ، مركبات فينولية ، مركبات الفلافونويد ، نشاط مضاد للأكسدة ، FRAP ، DPPH.

Table de matière

Résumé.....	iii
Summary	iii
Table de matière.....	iv
Liste des abréviations.....	vi
Listes des figures.....	viii
Liste des tableaux	ix
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	2
1 Stress oxydatif.....	2
1.1 Définition du stress oxydatif	2
1.2 Origine du stress oxydatif	2
1.3 Les cibles du stress oxydatif	4
1.3.1 L'acide désoxyribonucléique	4
1.3.2 Les protéines	4
1.3.3 Les lipides	4
1.4 Les maladies liées au stress oxydatif	5
2 Activité antioxydante	6
2.1 Définition des antioxydants	6
2.2 Classification des antioxydants	6
2.3 Mode d'action des antioxydants	8
3 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	9
3.1 Test du piégeage du radical 2,2 diphényl -1 -pycridylhydrazil (DPPH).....	9
3.2 Test de réduction des ions ferriques (FRAP).....	9
3.3 Test de capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC).....	10
3.4 Test de l'inhibition de l'oxydation du cholestérol-LDLs.....	10
3.5 Test de l'inhibition de l'hémolyse	11
4 Les polyphénols.....	11
5 Marrubium vulgare L.....	12
5.1 Description botanique et systématique	13
5.2 Composition chimique.....	13
5.3 Activité biologique.....	13
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	Evaluation de l'activité antioxydante de <i>M.vulgare</i>	18
3.1	Test de piégeage du radical libre DPPH.....	18
3.2	Test de la réduction du fer : FRAP	20
	Résultats et discussion	22
1	Etude phytochimique de <i>M.vulgare L</i>	22
1.1	Préparation de l'extrait butanolique	22
1.2	Dosage des polyphénols et des flavonoïdes	23
2	Evaluation de l'activité antioxydante	25
	Conclusion et perspectives.....	28
	Références bibliographiques.....	29

Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Celsius

µg : Microgramme

µl : Microlitre

8-OH-dG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3 -éthylbenzothiazoline -6-sulfonique)

ADN: Acide désoxyribonucléique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

BHA : Acide béta-hydroxylé

BHT : Hydroxytoluène butylé

Cu⁺² : Nitrate de cuivre

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

EGCG: Epigallocatechin-3-O-gallate

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

Fe²⁺: Fer ferreux

Fe³⁺: Fer ferrique

Fe²⁺-TPTZ : Tripyridyltriazine ferreux

Fe³⁺-TPTZ : Tripyridyltriazine ferrique

FRAP : Capacité réductrice ferrique d'antioxydants

g : Gramme

GSH: Glutathion

h: Heure

H⁺ : Proton d'hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

LDL : Low density lipoprotéine

M: marrubium

L: Linné

mg : Milligrammes
ml: Millilitre
Mo₈O₂₃ : Molybdène
NAC: N-acetyl cysteine
NaCO₃ : Carbonate de sodium
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaNO₂ : Nitrite de sodium
NAOH : Hydroxyde de sodium
nm: Nanometre
NO₂: Dioxyde d'azote
NOS : Oxyde nitrique synthase
O₂: Dioxygène
O₂^{-•}: Anion superoxyde
OH[•]: Radical hydroxyle
PG : Gallate de propyle
PNN : Polynucléaires neutrophiles
RO: Radical alkoxyde
RO₂H: Hydroperoxyde
ROO[•] : Radical peroxyde
SOD : Superoxyde dismutase
TBHQ : Tert-butylhydroquinone
TEAC : Test de capacité antioxydante équivalente de Trolox
UV : Ultraviolet
V : Volume
W₈O₂₃ : oxyde bleu de tungstène

Listes des figures

Figure 1: Les facteurs produisant les espèces réactives (Lizorieux 2013).....	3
Figure 2: Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	3
Figure 3: Principaux dommages cellulaires induits par les espèces réactives de l'oxygène (Monteil et al., 2004)....	5
Figure 4: Classification des antioxydants (Ratnam et al., 2006).....	7
Figure 5: Les structures chimiques des antioxydants synthétiques les plus connus (Gulcin,2020).....	7
Figure 6: La réaction entre le DPPH• et l'antioxydant pour former le DPPH (Xiao et al., 2020).....	9
Figure 7: Formation du complexe tripyridyltriazine ferreux (Fe+2-TPTZ) à partir du complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe+3-TPTZ) par un antioxydant (Xiao et al., 2020).....	10
Figure 8: Formation du radical ABTS stable à partir du ABTS en présence du persulfate du potassium (Xiao et al., 2020).....	10
Figure 9: <i>Marrubium vulgare</i> (Marouf, 2021).....	12
Figure 10: Structure chimiques de quelques flavonoïdes de <i>M. vulgare</i> (Lodhi et al., 2017).....	14
Figure 11: Transformation du DPPH de sa forme active (R-) à celle inactive (Bhuiyan, Howlader, Raihan, & Hasan) (Rolland, 2004).....	19
Figure 12: Courbe étalon de l'acide gallique ($\lambda=750$ nm).....	23
Figure 13: Courbe étalon de la catéchine ($\lambda=510$ nm).....	24
Figure 14: Pourcentages d'inhibition de DPPH par l'extrait n-butanol de <i>M. vulgare</i> et de l'acide ascorbique.	26
Figure 15: Pouvoir réducteur de l'extrait butanolique des feuilles de <i>M vulgare</i> comparé à l'acide ascorbique par le test de FRAP.....	26
Figure 16: Mécanisme de l'activité antioxydante des polyphénols (Belščak-Cvitanović et al., 2018).....	27

Liste des tableaux

Tableau 1: <i>Quelques antioxydants et leur mode d'action (Ratnam et al., 2006).</i>	8
Tableau 2 : <i>Les structures de base des principales classes des composés phénoliques (de Lima Cherubim et al., 2020).</i>	12
Tableau 3: <i>Mode opératoire du dosage des polyphénols totaux de l'extrait butanolique</i>	16
Tableau 4: <i>Mode opératoire de dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique de M.vulgare.</i>	18
Tableau 5: <i>Mode opératoire de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique de M. vulgare et de l'acide ascorbique (DPPH).</i>	19
Tableau 6: <i>Mode opératoire de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique de M. vulgare et de l'acide ascorbique (FRAP).</i>	21

Introduction

Les plantes médicinales représentent un patrimoine pour l'humanité, elles sont utilisées pour soigner plusieurs maladies notamment dans les pays en voie de développement. De nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie ont montré l'efficacité de ces remèdes naturels dans les différents modèles pharmacologiques et qu'ils sont quasiment dépourvus de toxicité (**Bouزيد et al., 2017**).

L'Algérie est reconnue par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, cependant, la flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% d'endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique. C'est ainsi que beaucoup d'efforts sont nécessaires afin de valoriser ces substances naturelles d'intérêt thérapeutique (**Bouزيد et al., 2017**).

Parmi les substances naturelles qui ont suscité l'intérêt des scientifiques, les polyphénols qui sont des métabolites secondaires trouvés dans les plantes et les champignons, et qui sont localisés dans différentes parties, le fruit, la graine, la fleur, la tige et la racine. Ces molécules consommées protègent contre le stress oxydatif par leur propriété de piégeage des radicaux libres (**Singh et al., 2020**).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à étudier un extrait enrichi en polyphénols de *Marrubium vulgare L* une plante de la famille des *Lamiacées* utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, anti-inflammatoires, analgésiques, antihypertenseur et anticancéreuse (**Lodhi et al., 2011**). Notre travail se divise en trois principales parties :

La première partie est la synthèse bibliographique qui comporte des informations sur le stress oxydatif et l'activité antioxydante ainsi que les méthodes de son étude. La composition phytochimique de *M. vulgare* et ses activités biologiques sont aussi développées.

La deuxième partie est une description du protocole expérimental qui comporte la préparation de l'extrait enrichi en polyphénol à partir de la partie aérienne de *M. vulgare*, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes et l'évaluation de l'activité antioxydante par les tests du DPPH et du FRAP. La troisième partie est consacrée à l'exposition des résultats et leur discussion, avec une conclusion à la fin.

Synthèse bibliographique

1 Stress oxydatif

1.1 Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des espèces réactives d'oxygène (ERO) et d'azote (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós) et les antioxydants, notre mode de vie ainsi que notre régime alimentaire inadéquat participent significativement à l'augmentation du taux des espèces réactives dans l'organisme (**Haleng et al., 2007**). Le stress oxydatif est lié à une altération des molécules biologiques telles que l'acide désoxyribonucléique, les protéines et les lipides, il est potentiellement associé à un risque important de développement de graves pathologies comme les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Haleng et al., 2007**).

1.2 Origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être induit par plusieurs facteurs classés endogènes et exogènes (**Fig.1**). Les facteurs exogènes sont l'exposition prolongée aux rayons ultra-violets, la pollution, les pesticides et les infections, un mode de vie inapproprié (tabac, alcool, sport intense, fatigue, stress psychosocial), ainsi qu'une alimentation déséquilibrée avec déficience en un ou plusieurs antioxydants notamment les vitamines et les oligoéléments (**Lizorieux, 2013**).

Quant aux facteurs endogènes, ils ont comme origine la fuite des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine — oxydase) ou l'oxydation de molécules telles que le glucose et l'hémoglobine (**Migdal & Serres, 2011; Pincemail et al., 2002**).

Le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire est une source importante des radicaux libres, notamment les espèces réactives de l'oxygène, dans la **figure 2**, sont données les principales espèces réactives de l'oxygène ainsi que les réactions impliquées dans leur formation.

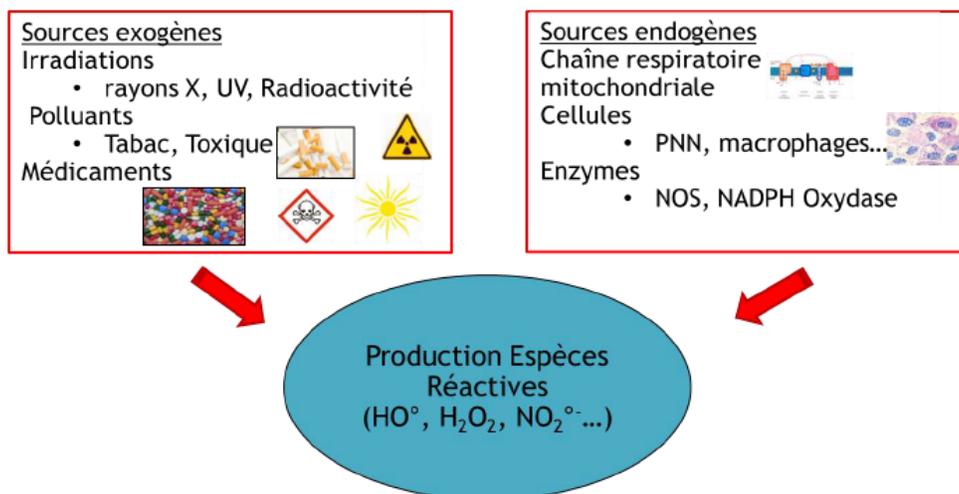
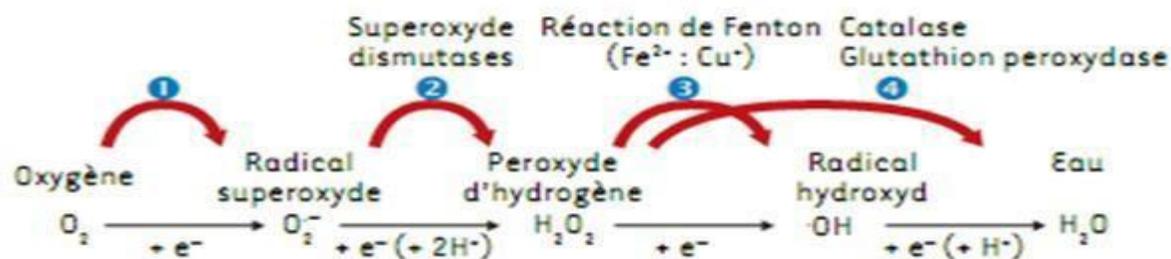


Figure 1: Les facteurs produisant les espèces réactives (Lizorieux 2013).



Réduction tétravalente de l'oxygène		$O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$
$O_2^{\bullet -}$	Anion superoxyde	1 $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène	2 $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} (+ 2 H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$\bullet OH$	Radical hydroxyle	3 $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \bullet OH + Fe^{3+} + OH^-$ 4 $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ 5 $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$
RO_2^{\bullet}	Radical peroxyde	6 $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$
RO_2H	Hydroperoxyde	7 $RO_2^{\bullet} + RH \rightarrow RO_2H + R^{\bullet}$
RO^{\bullet}	Radical alkoxyde	8 $RO_2H + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^-$

Figure 2: Origine des espèces réactives de l'oxygène.

Les quatre étapes de la réduction de l'oxygène et la formation des intermédiaires partiellement réduits sont détaillées. En plus des espèces réactives de l'oxygène primaires (le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle), il existe aussi des ERO, dits secondaires comme le radical peroxyde, l'hydroperoxyde et le radical alkoxyde (Migdal et Serres, 2011).

1.3 Les cibles du stress oxydatif

Le stress oxydant représente un mécanisme de toxicité cellulaire important du fait de son caractère ubiquitaire et des dommages cellulaires dont il est responsable. En effet, il peut être à l'origine de l'apparition, de l'entretien et/ou de l'aggravation de nombreuses pathologies, cet effet toxique est provoqué le plus souvent par des réactions d'oxydation sur les macromolécules intracellulaires telles que les lipides, les protéines ou encore les acides nucléiques (**Fig.3**) (**Monteil et al., 2004**).

1.3.1 L'acide désoxyribonucléique

Le radical hydroxyle (OH[•]) peut réagir avec toutes les composantes de l'ADN, avec altération des purines, des pyrimidines et des désoxyriboses, par exemple la guanine est transformée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) (**Valko et al., 2007**). Ces modifications vont aboutir à des mutations au sein de l'ADN avec perturbations du message génétique et vont être impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (**Haleng et al., 2007**).

1.3.2 Les protéines

L'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine sont les acides aminés les plus sensibles aux espèces réactives de l'oxygène. L'oxydation de ces acides aminés a pour conséquence l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bityrosine intra- et interchaînes, ce qui entraîne des modifications fonctionnelles des protéines avec perte de fonction (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Des agrégats de protéines oxydées peuvent aussi se former dans les cellules ou dans les compartiments extracellulaires (**Haleng et al., 2007**).

1.3.3 Les lipides

Les acides gras polyinsaturés sont la cible du radical hydroxyle, qui peut leur arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction mène à la formation d'un radical lipidique qui réagit avec une molécule d'oxygène et forme un radical peroxy (ROO[•]), qui à son tour arrache un proton H⁺ sur l'acide gras insaturé voisin, et ainsi de suite. L'oxydation des lipides membranaires induit des perturbations au niveau des membranes avec altération de la fluidité ce qui mène à la mort cellulaire (**Haleng et al., 2007**).

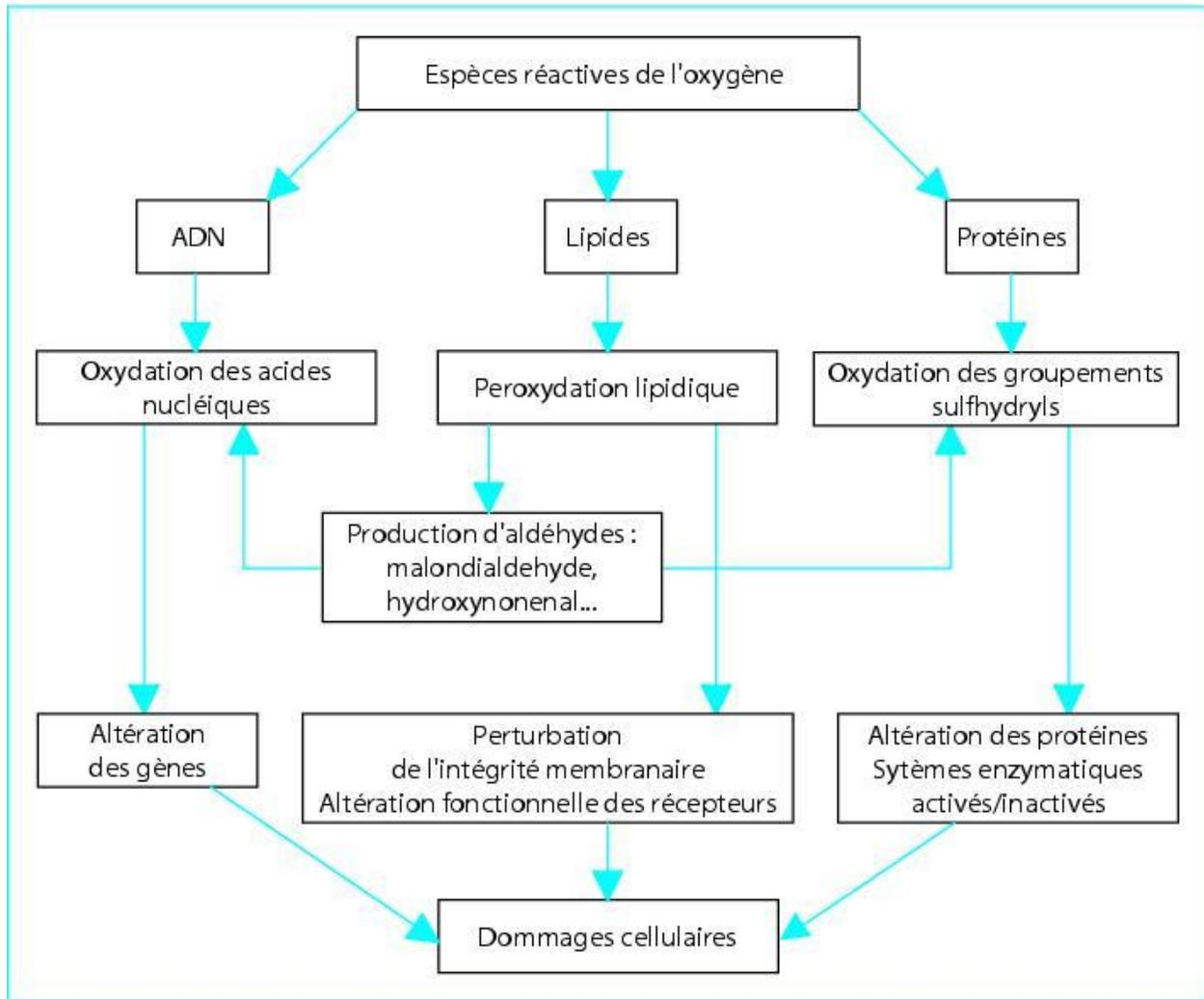


Figure 3: Principaux dommages cellulaires induits par les espèces réactives de l'oxygène (Monteil et al., 2004).

1.4 Les maladies liées au stress oxydatif

L'altération des acides nucléiques, des lipides et des protéines par le stress oxydatif, mène à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Cette perturbation de ces molécules peut théoriquement contribuer au développement d'une maladie (Dalle-Donne et al., 2006). Différentes maladies ont été associées au stress oxydatif, tels l'inflammation (Pasquier, 1995), les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, le diabète sucré, l'asthme, les maladies rénales et hépatiques (Dalle-Donne et al., 2006). Le stress oxydatif est aussi impliqué dans les mécanismes de la mort cellulaire lors des maladies neurodégénératives principalement la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson idiopathique et la sclérose latérale amyotrophique qui sont les plus fréquentes de ces affections (Desport & Couratier, 2002).

2 Activité antioxydante

2.1 Définition des antioxydants

Un antioxydant est une molécule capable d'inhiber l'oxydation d'une autre molécule (**Gulcin, 2020**). Il est défini comme n'importe quelle substance qui lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat (**Halliwell & Gutteridge, 1995**). Cette définition s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des nutriments alimentaires comme les composés phénoliques, les vitamines E et C et les caroténoïdes, mais aussi à des enzymes comme la superoxide dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (**Huang et al., 2005**).

2.2 Classification des antioxydants

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces pour tenter de prévenir le stress oxydatif, il existe deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques (**Fig.4**) (**Ratnam et al., 2006**). De plus de ces antioxydants naturels, il existe des antioxydants synthétiques, qui ont été développés pour être ajoutés aux aliments à fin de les protéger de l'oxydation, ce sont des composés phénoliques comme hydroxyanisole butylé , hydroxytoluène butylé (BHT) tert-butylhydroquinone (TBHQ), gallate de propyle (PG) et gallate d'octyle (**Fig.5**) (**Gulcin, 2020**).

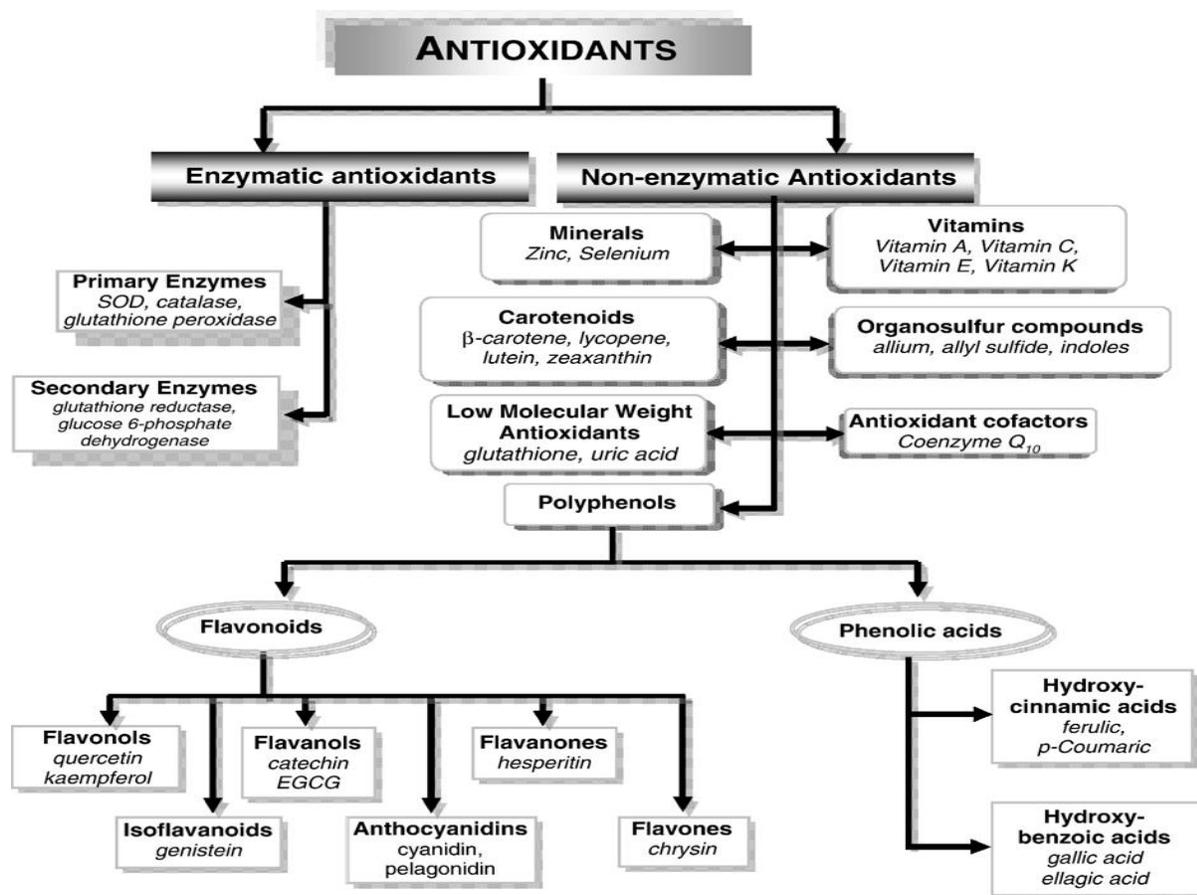


Figure 4: Classification des antioxydants (Ratnam et al., 2006).

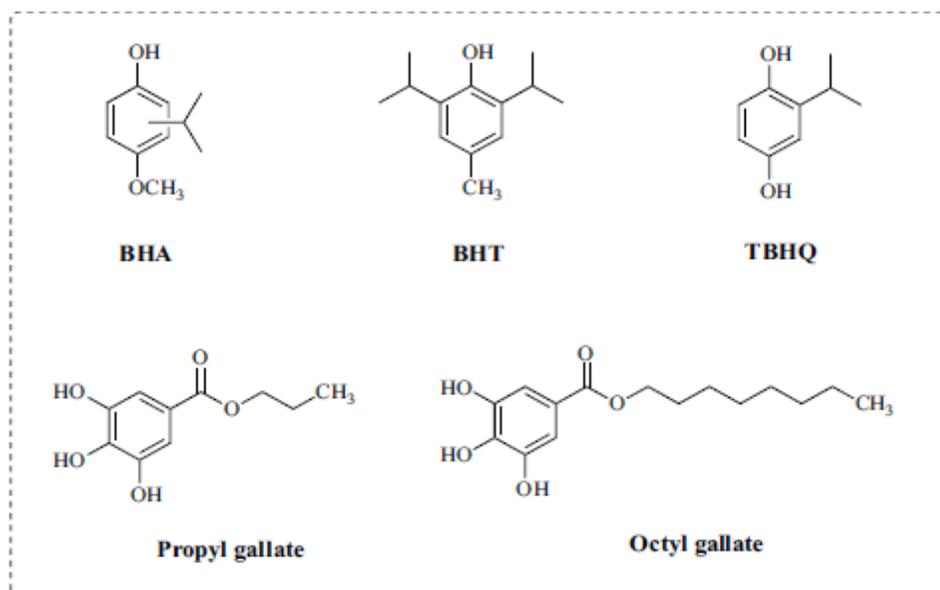


Figure 5: Les structures chimiques des antioxydants synthétiques les plus connus (Gulcin,2020).

2.3 Mode d'action des antioxydants

Les antioxydants sont de nature diverse, ils agissent en synergie soit en se sacrifiant pour piéger l'électron célibataire d'un radical libre et le neutraliser en le délocalisant soit en réduisant enzymatiquement les espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2006). Ces antioxydants peuvent provenir de l'alimentation (les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), les caroténoïdes ou les polyphénols), ou d'origine endogène synthétisé par l'organisme comme le glutathion réduit et les superoxydes dismutases (SOD)) (Favier, 2006). Dans le tableau 1 sont donnés quelques antioxydants et leur mode d'action.

Tableau 1: Quelques antioxydants et leur mode d'action (Ratnam et al., 2006).

Antioxydant	Mécanisme d'action
Superoxide dismutase (SOD)	Dismutation du superoxyde en H ₂ O ₂
Catalase	Décomposition du H ₂ O ₂ en oxygène moléculaire et eau
N-acetyl cysteine (NAC)	Piégeage du H ₂ O ₂ et du peroxyde De-acétylation du précurseur de la synthèse du GSH.
Glutathion (GSH)	Agent réducteur intracellulaire
Epigallocatechin-3-O-gallate. (EGCG)	Chélation des métaux Piégeage du superoxyde, H ₂ O ₂ , OH et de l'oxygène singulet Régénération du tocophérol
Lycopène	Piégeage de l'oxygène singulet
Acide ellagique	Piégeage du H ₂ O ₂ Stimulation du glutathion-S-transférase
Coenzyme Q10 (CoQ10)	Inhibition de la peroxydation des lipides Réduction du stress oxydative mitochondrial
Quercétine	Piégeage du H ₂ O ₂ , un des antioxydants poly-phénoliques le plus puissant
Vitamine C	Piégeage des anions superoxyde
Vitamine E	Piégeage direct du superoxyde Régulation des enzymes antioxydants Inhibition de la peroxydation des lipides

3 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants jouent un rôle très important dans la préservation des aliments par inhibition des processus d'oxydation et contribution à l'amélioration de la santé (Shahidi & Zhong, 2015). L'activité antioxydante est évaluée soit par le dosage des produits formés (en particulier les hydroperoxydes) par des méthodes photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres (Marc et al., 2004). Nous allons développer quelques méthodes utilisées dans l'étude de l'activité antioxydante.

3.1 Test du piégeage du radical 2,2 diphényl -1 -pycridylhydrazil (DPPH)

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violette qui absorbe à 517 nm. Le principe de la méthode est basé sur la capacité de l'antioxydant à donner un électron pour neutraliser le radical DPPH, ce qui est accompagné par un changement dans la coloration, une décoloration indique l'efficacité de l'antioxydant (Fig.6) (Shahidi & Zhong, 2015).

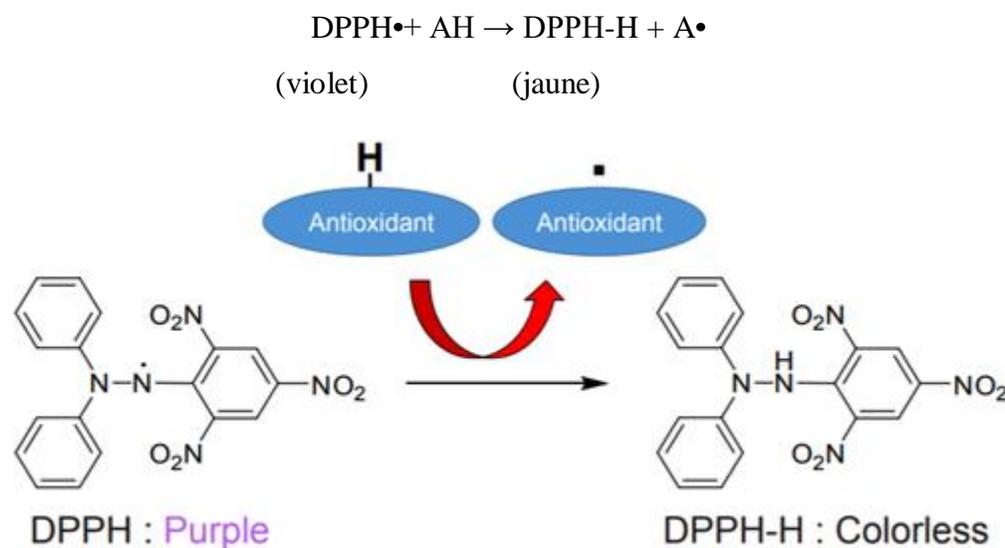


Figure 6: La réaction entre le DPPH• et l'antioxydant pour former le DPPH (Xiao et al., 2020).

3.2 Test de réduction des ions ferriques (FRAP)

C'est une méthode qui est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) à la forme ferreuse (Fe^{2+} -TPTZ) de couleur bleue par transfert d'électrons qui se fait en présence des antioxydants, en milieu acide (Fig.7). L'activité antioxydante est déterminée par une augmentation de l'absorbance à 593 nm, et le résultat est exprimé par micromolaire de Fe^{2+} équivalent à un antioxydant de référence (Shahidi & Zhong, 2015).

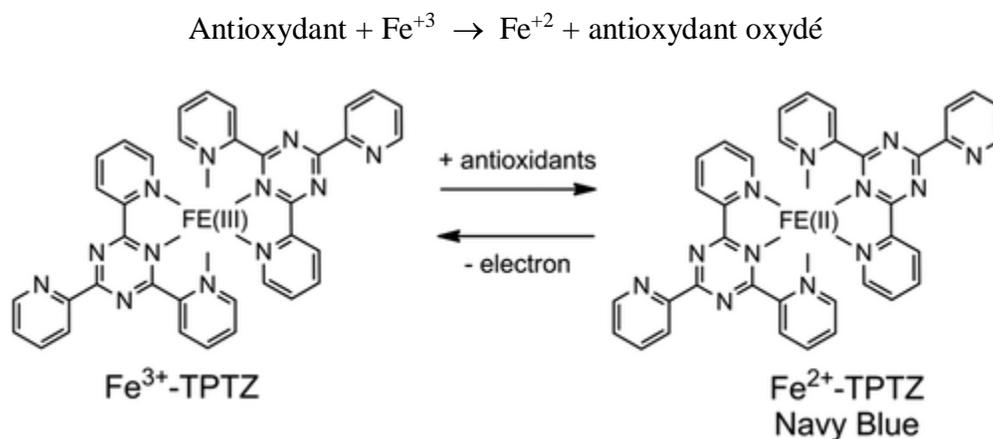


Figure 7: Formation du complexe tripyridyltriazine ferreux ($\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$) à partir du complexe tripyridyltriazine ferrique ($\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$) par un antioxydant (Xiao et al., 2020).

3.3 Test de capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC)

Dans la méthode TEAC, l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine ou *horseradish peroxidase*) en présence de H_2O_2 ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse ou persulfate de potassium). Le radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, en contact avec un donneur de H^{\bullet} conduit à l'ABTS⁺ (Fig.8) et à la décoloration à 734 nm de la solution (Marc et al., 2004).

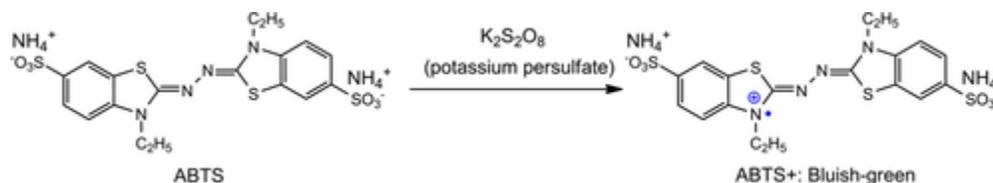


Figure 8: Formation du radical ABTS stable à partir du ABTS en présence du persulfate du potassium (Xiao et al., 2020).

3.4 Test de l'inhibition de l'oxydation du cholestérol-LDLs

Les modifications oxydatives du LDL-cholestérol jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'athérosclérose et les maladies du cœur. Dans cette méthode le substrat de l'oxydation, qui est le cholestérol-LDL, l'agent de l'oxydation qui est le métal de transition tel que les ions cuivriques

(Cu⁺²) et l'antioxydant sont incubés à une température physiologique de 37 °C. La formation des diènes conjugués est suivie par méthode spectrophotométrique à 234 nm soit d'une façon périodique ou à un certain point final. L'activité antioxydante est reportée comme pourcentage d'inhibition de la formation des diènes conjugués en comparaison avec le contrôle sans antioxydant (Shahidi & Zhong, 2015).

3.5 Test de l'inhibition de l'hémolyse

Les globules rouges sont constamment exposés au stress oxydatif, à cause de leur rôle physiologique de transporteurs de molécules d'oxygène. Ce sont des cellules sans noyau, sans mitochondrie, et d'autres organites typiques, ce qui les rend un modèle simple et sensible pour l'évaluation de l'activité antioxydante. Dans ce test, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est utilisé pour induire l'oxydation des protéines (les hémoglobines) et des lipides (principalement l'ester de cholestérol), en présence d'un antioxydant, l'ensemble est incubé à une température de 37 °C. Le degré de l'oxydation est évalué d'une façon périodique par centrifugation et mesure du taux de l'hémoglobine libérée dans le surnageant à 524 nm. Inhibition de l'hémolyse peut être calculée par la suite par comparaison à un contrôle ne contenant pas d'antioxydant (Shahidi & Zhong, 2015).

4 Les polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires biologiquement actifs caractérisés par la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques portants des substituants hydroxylés et/ou des dérivés fonctionnels, comme les esters, les éthers et les glycosides. Ils peuvent être classés en deux classes, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (**Tableau 2**). Les flavonoïdes sont la classe la plus importante et la plus diversifiée des polyphénols, et sont très répandus dans les fruits, les végétaux, les baies et les graines (de Lima Cherubim et al., 2020).

Les polyphénols naturels ont montré de nombreuses activités biologiques bénéfiques pour la santé, telles que les maladies reliées à l'âge, les cancers et les maladies du cœur, etc (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

Plusieurs études ont associé la structure chimique des composés phénoliques avec l'activité antioxydante, en effet le noyau phénolique joue le rôle d'un capteur d'espèce réactive et d'un réducteur et chélateur des ions ferriques qui catalysent la peroxydation lipidique (de Lima Cherubim et al., 2020).

Tableau 2 : Les structures de base des principales classes des composés phénoliques (de Lima Cherubim et al., 2020).

Structure de base	Classe du composé phénolique	Structure chimique
C6-C1	Dérivés de l'acide benzoïque	
C6-C3	Dérivés de l'acide cinnamique	
C6-C2-C6	Stilbènes	
C6-C3-C6	Flavonoïdes	

5 Marrubium vulgare L.

Le genre *Marrubium* fait partie de la famille des *lamiacées*. Il comprend plus de 30 espèces natives de l'Europe, la région de la Méditerranée et l'Asie, l'espèce *Marrubium vulgare* (**Fig.9**) est le représentant le plus connu (**Argyropoulou et al., 2009**). C'est une plante herbacée vivace dénommée « marrube blanc » et en Algérie « Marriout », elle est très utilisée localement pour le traitement du diabète sucré (**Boudjelal et al., 2012**).



Figure 9: *Marrubium vulgare* (Marouf, 2021).

5.1 Description botanique et systématique

Marrubium vulgare est une plante herbacée vivace qui peut atteindre de 30 à 60 cm de hauteur, elle est caractérisée par une odeur des thymus très amère, elle possède une tige raide cotonneuse sur les faces inférieures, poilues, mais vertes sur la face supérieure. Des petites fleurs blanches sont présentées en verticilles axillaires nombreux compacts et espacés sur les tiges. La floraison de la plante débute en mois de mai et la récolte en mois de juin. (Belhattab, 2018).

- La classification de la plante *M. vulgare* est comme suit (Boudjelal, 2013).

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Marrubium*.

Espèce : *Marrubium vulgare* L.

5.2 Composition chimique

Marrubium vulgare contient plusieurs molécules, les plus actives sont marrubiin, apigenin, apigenin 7-O-glucoside, apigenin 7-lactate, apigenin 7-(6"-p-coumaroyl)-glucoside, luteolin, luteolin 7-O-β-D-glucoside, luteolin 7-lactate, chrysoeriol, chrysoeriol O-glucuronide, quercetin 3-O-α-L-rhamnosyl-glucoside, isoquercitrin, ursolic acid, gallic acid, caffeic acid, maleic acid, vulgarol, vulgarin, β-sitosterol, stigmasterol, vitexin, acteoside, forsythoside B, arenarioside, ballotetriside, marruboside, acetyl marruboside, marrubenol, 6-octadecynoic acid, 5-O-caffeoylquinic (chlorogenic) acid; ladanein, 11-oxomarrubiin, vulgaroside A, 3-hydroxyapigenin 4'-O-(6"-O-p-coumaroyl)-beta-D-glucopyranoside, phenylpropanoide esters et monoterpènes (Cechinel Filho, 2018). Dans la **figure 10** sont données les structures des principaux flavonoïdes de *M. vulgare*.

5.3 Activité biologique

Marrubium vulgare est très utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies, elle a prouvé des propriétés thérapeutiques telles que les activités antidiabétique,

hypolipémiants, anti-inflammatoire, antioxydante, antiparasitaire, cardioprotectrice, pouvoir analgésique, antihypertensive et antimicrobienne (Cechinel Filho, 2018).

Plusieurs travaux de recherche ont étudié ces activités biologiques, l'activité anti-inflammatoire a été reliée à l'acide L-malique, l'arénarioside, l'actéoside, le forsythoside B et au ballotétroside, des composés de la partie aérienne de la plante (Lodhi et al., 2017). L'activité antioxydante a été testée et l'expérience a montré que l'extrait aqueux de la plante protège contre les maladies cardiovasculaires en protégeant les LDL humains contre la peroxydation lipidique (Chedia et al., 2014). Le *M. vulgare* est connu aussi par son activité anticancéreuse en raison de son avantage à contenir quatre glycosides phénylpropanoïdes différents (acteoside, forsythoside B, arénarioside et ballotétroside), et un dérivé non glycosidique (acide caféaffel-1-malique), ces dérivés phénoliques ont été testés pour leur activité chimioprotectrice (Martin-Nizard et al., 2003).

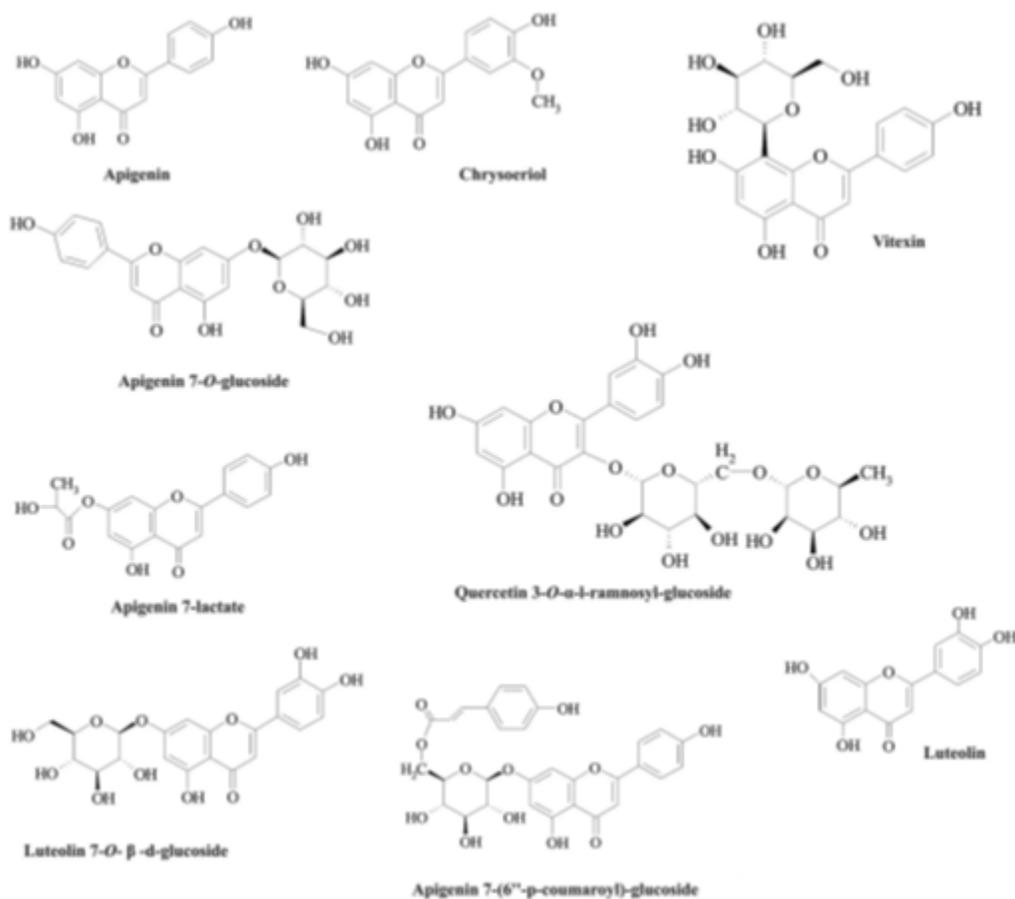


Figure 10: Structure chimique de quelques flavonoïdes de *M. vulgare* (Lodhi et al., 2017).

1 Matériel végétal

Marrubium vulgare L., a été récoltée en janvier 2020 dans la région d'Ain Témouchent. Le matériel végétal est ensuite séché à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 21 jours. Après séchage, 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

20 g de la plante en poudre sont introduits dans un mélange méthanol/eau (70:30 ; v/v), et ont été laissé macérer sous agitation douce pendant 24h 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 :

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

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

2.2 Dosage des polyphénols totaux

➤ Principe

Le dosage des polyphénols totaux est déterminé par la méthode colorimétrique qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Le principe est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par l'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), les principaux constituants du réactif utilisé, qui sont ainsi réduits en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). L'intensité de la coloration (725 à-

760nm) est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits testés (**Singleton et al., 1999**)

➤ **Procédure**

Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait butanolique a été réalisé selon la méthode suivante : 1 ml de l'extrait dilué est mélangé avec 5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé, le tout est agité par un vortex. Après quatre minutes, 4 ml du réactif de carbonate de sodium (NaCO₃) à 7.5% sont ajoutés au mélange, le tout est laissé incubé pendant 2 heures à température ambiante, et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis (Multi-cell changer 6715UV/Vis JENWAY) à 750 nm. Une gamme étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique.

Le **tableau 3** résume le mode opératoire et les différentes étapes suivies pour le dosage des polyphénols totaux.

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

Concentration de l'acide gallique (mg/ml)	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	-
Extrait butanolique (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	1.2
Volume en ml	1	1	1	1	1	1	1
Folin-Ciocalteu (ml)	5	5	5	5	5	5	5
Incubation pendant 4 min à une température ambiante							
Carbonate de sodium (NaCO₃) à 7.5% (ml)	4	4	4	4	4	4	4
Incubation pendant 2 h à une température ambiante et à l'obscurité							
Mesure de la DO à 750 nm							

➤ **Expression des résultats**

Le taux des polyphénols totaux dans l'extrait butanolique de *M. vulgare*, exprimé en milligramme équivalent d'acide gallique (mg EAG) par gramme d'extrait n-butanolique est calculée comme suit :

$$[\text{Polyphénols}] = a.f / C$$

a : concentration des polyphénols (mg/ml) déterminée à partir de la courbe étalon.

f : facteur de dilution.

C : la 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 (AlCl_3) et au nitrite de sodium (NaNO_2). 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 (510nm) entre les groupements hydroxyles des flavonoïdes et les ions Al(III) , (**Zhishen et al., 1999**)

➤ **Procédure**

Le dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique a été réalisé selon la méthode colorimétrique suivante : 1 ml de l'extrait est mélangé avec 300 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 6g/L. Après six minutes, 300 μl de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 22g/L sont ajoutés au mélange, le tout est laissé incubé pendant six minutes. Ensuite, 300 μl d'hydroxyde de sodium (NAOH) à 0.8 M sont ajoutés à chaque tube. Après 10 minutes d'incubation, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis (Multi-cell changer 6715UV/Vis JENWAY). Une gamme étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Le **tableau 4** résume le mode opératoire et les différentes étapes suivies pour le dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique de *M. vulgare*.

Tableau 4: Mode opératoire de dosage des flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique de *M.vulgare*.

Concentration de catéchine (mg/ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-
Extrait butanolique (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	1,2
Volume (µl)	300	300	300	300	300	300	300
Nitrite de sodium (NaNO₂) à 6g/l (µl)	300	300	300	300	300	300	300
Incubation pendant 5 min à une température ambiante.							
Trichlorure d'aluminium (AlCl₃.6H₂O) à 22g/l (µl)	300	300	300	300	300	300	300
Incubation pendant 6 min à une température ambiante							
NaOH 0.8M (µl)	300	300	300	300	300	300	300
Incubation pendant 10 min à une température ambiante. Lecture de la DO à 510 nm.							

➤ **Expression des résultats**

La teneur des flavonoïdes totaux dans l'extrait butanolique de *M. Vulgare*, exprimé en milligramme équivalent de catéchine (mg EC) par gramme de l'extrait est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = a.f / C$$

a : concentration des flavonoïdes (mg/ml) déterminée à partir de la courbe étalon.

f : facteur de dilution.

C : la masse de l'extrait.

3 Evaluation de l'activité antioxydante de *M.vulgare*

3.1 Test de piégeage du radical libre DPPH

➤ **Principe**

L'activité anti-radicalaire de l'extrait butanolique de *M. vulgare* a été évaluée, par le test de DPPH, selon la méthode décrite par (Molyneux, 2004). La méthode repose sur la capacité d'une molécule à réduire le radical DPPH[•] (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyle), cette réduction est traduite par un changement de couleur de la solution du violet au jaune, qui est proportionnel au pouvoir antioxydant. L'intensité de la coloration est mesurée à 520 nm (Molyneux, 2004) (Fig. 11).

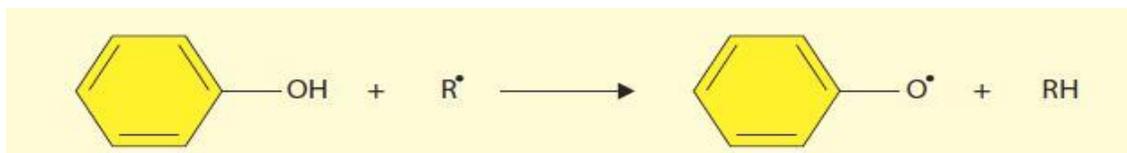


Figure 11: Transformation du DPPH de sa forme active (R-) à celle inactive (Bhuiyan, Howlader, Raihan, & Hasan) (Rolland, 2004).

➤ **Mode opératoire**

Le **tableau 4** résume le mode opératoire et les différentes étapes suivies pour la détermination de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique et de l'acide ascorbique utilisé comme un contrôle positif.

2ml de l'extrait butanolique de *M. vulgare*, ou de l'acide ascorbique préparés à différentes concentrations, sont additionnés de 2ml d'une solution éthanolique de DPPH à 2.5%. Le mélange est bien agité, et laissé incubé à température ambiante pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est réalisée à 520nm, par un spectrophotomètre UV/Vis (Multi-cell changer 6715UV/Vis JENWAY).

Tableau 5: Mode opératoire de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique de *M. vulgare* et de l'acide ascorbique (DPPH).

[Acide ascorbique] (µg/ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	-	-	-	-	-
[Extrait butanolique] (µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	40	60	80	100
Volume (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volume de DPPH à 2.5 % (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Incubation pendant 30 min à la température ambiante et à l'obscurité																
Lecture de la DO à 520nm.																

➤ **Expression des résultats**

L'activité antioxydante exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH⁺, est calculée selon la formule suivante (Molyneux, 2004)

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Abs du contrôle} - \text{Abs de l'échantillon}}{\text{Abs du contrôle}} \times 100$$

Abs : absorbance.

La concentration qui provoque la réduction de 50% du DPPH, est appelée concentration inhibitrice à 50% (**IC₅₀**), elle est déterminée sur les graphes tracés pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits (**Molyneux, 2004**).

3.2 Test de la réduction du fer : FRAP

➤ **Principe**

Le test du FRAP est une méthode simple basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) à pH bas, ce qui permet la formation d'un complexe coloré tripyridyltriazine ferreux, qui absorbe au maximum à 593 nm. Le changement de l'absorbance est linéaire en fonction de la concentration des antioxydants (**Benzie & Strain, 1996**).

➤ **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans l'extrait butanolique est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (**Oyaizu, 1986**). Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,25 à 2,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50 °C pendant 20 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10 % sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1 %. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons (**Bougandoura & Bendimerad, 2013 5**).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont explorés en traçant les graphes absorbances en fonction des concentrations, l'augmentation de l'absorbance témoigne d'un pouvoir réducteur qui augmente avec la teneur en antioxydants dans l'extrait (**Bougandoura & Bendimerad, 2013**).

Tableau 6: Mode opératoire de l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique de *M. vulgare* et de l'acide ascorbique (FRAP).

[Acide ascorbique] (mg/ml)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5	-	-	-	-	-	-
[Extrait butanolique] (mg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,5	1	1,5	2	2,5
Volume (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Ferricyanure de potassium (K₃Fe (CN)₆) à 1 %.	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Incubation pendant 50 °C pendant 20 min													
Arrêt de la réaction : Acide trichloroacétique CCl₃COOH à 10 %													
Centrifugation 3000 rpm pendant 10 min													
0,5 ml Trichlorure ferrique (FeCl₃)0,1%.													
Lecture de l'absorbance à 700 nm.													

Résultats et discussion

1 Etude phytochimique de *M.vulgare* L.

1.1 Préparation de l'extrait butanolique

Dans un but d'obtenir un extrait riche en polyphénols à partir des feuilles de *M. vulgare*, nous avons procédé à une extraction sélective en deux étapes, la première étape est 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, les formes conjuguées sont soluble dans l'eau, et leur solubilité augmente avec le nombre des groupements hydroxyles (Belščak-Cvitanović et al., 2018), de plus l'extrait méthanolique a donné la plus grande valeur en composés phénoliques et en flavonoïdes à partir des feuilles de *M.vulgare* (Bouterfas et al., 2016; Ghedadba et al., 2014).

La deuxième étape est une série d'extraction liquide-liquide en utilisant 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 (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 l'extrait butanolique, ont effectivement mis en évidence 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-butanolique enrichi en polyphénol, a donné un rendement de 2,7 % (g/g de plante sèche), ce dernier est toutefois différent des rendements obtenus dans d'autres études qui ont utilisé l'éthanol comme solvant d'extraction, (Billami, 2016) a obtenu un rendement 3 fois plus que le notre (8.6% (g/g)) avec une macération de la plante dans un mélange éthanol : eau à 80 % et (Djahra, Bordjiba, & Benkherara, 2015) Djahra et ses collaborateurs (2015) ont obtenu un rendement de 5,9 % (g/g), avec une extraction par l'appareil de Soxhlet.

Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec d'autres études, car le rendement d'extraction n'est que relatif (Lee et al., 2003), et il est influencé par plusieurs facteurs comme la méthode d'extraction et les conditions de son application telles que l'état de séchage de la matière végétale, le temps, la température et la polarité des solvants utilisés. De plus, la teneur en métabolites secondaires est largement dépendante des conditions climatiques et géographiques dans lesquelles la plante a poussé (Koné et al., 2017)

Il est temps de signaler que l'utilisation des solvants tels le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le toluène pour l'extraction de produits bioactifs est actuellement critiquée, à cause de leur dangerosité et leurs impacts sur l'atmosphère, sur l'environnement, sur la santé de l'être humain et même sur la qualité de l'extrait obtenu, des méthodes d'extraction écologiques sont devenues ainsi nécessaires (Deli et al., 2019).

1.2 Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Le dosage des polyphénols dans l'extrait butanolique, a été réalisé par la méthode colorimétrique qui utilise le réactif de Folin et Ciocalteu. Une courbe d'étalon a été tracée avec la molécule de référence, l'acide gallique à différentes concentrations (Fig.12). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de l'extrait butanolique (mg eq AG/g d'extrait).

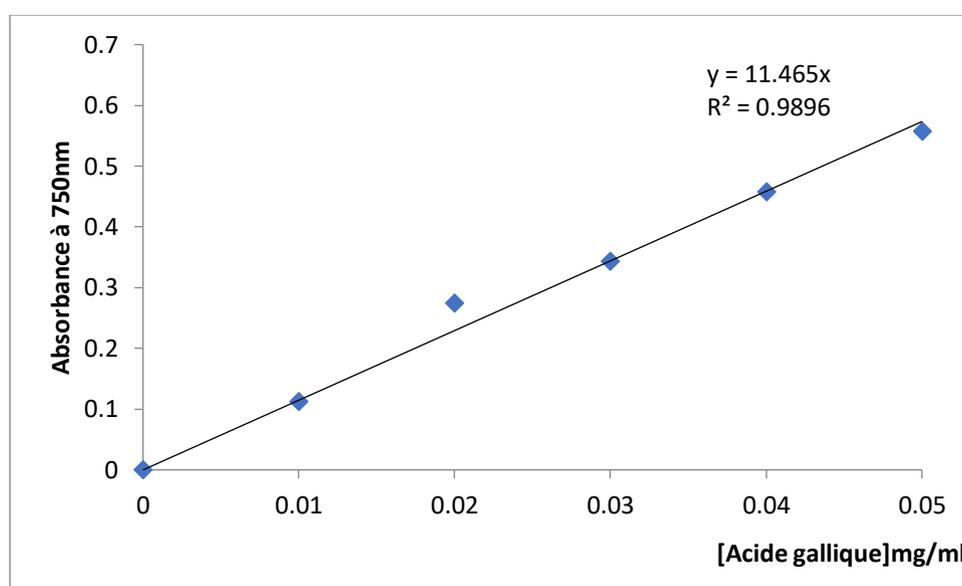


Figure 12: Courbe étalon de l'acide gallique ($\lambda=750$ nm).

L'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisée dans la gamme d'étalonnage avec un R^2 de 0,99.

Le taux des polyphénols totaux dans l'extrait butanolique de *M. vulgare*, est de l'ordre de $161,51 \pm 18,71$ mg EAG/g de l'extrait. Ce taux obtenu est largement supérieur à d'autres études réalisées sur la même espèce, qui ont donné des taux de l'ordre de $6,25$ mg EAG/g d'extrait (Fathiazad et al., 2016), et de $102,69 \pm 0,15$ mg EAG/g d'extrait (Kasmi, 2016).

Les flavonoïdes totaux de l'extrait butanolique, ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et du nitrite de sodium ($NaNO_2$). Une courbe étalon (a été réalisée avec une molécule de référence, la catéchine utilisée à différentes concentrations (Fig.13). La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait butanolique (mg EC/g d'extrait).

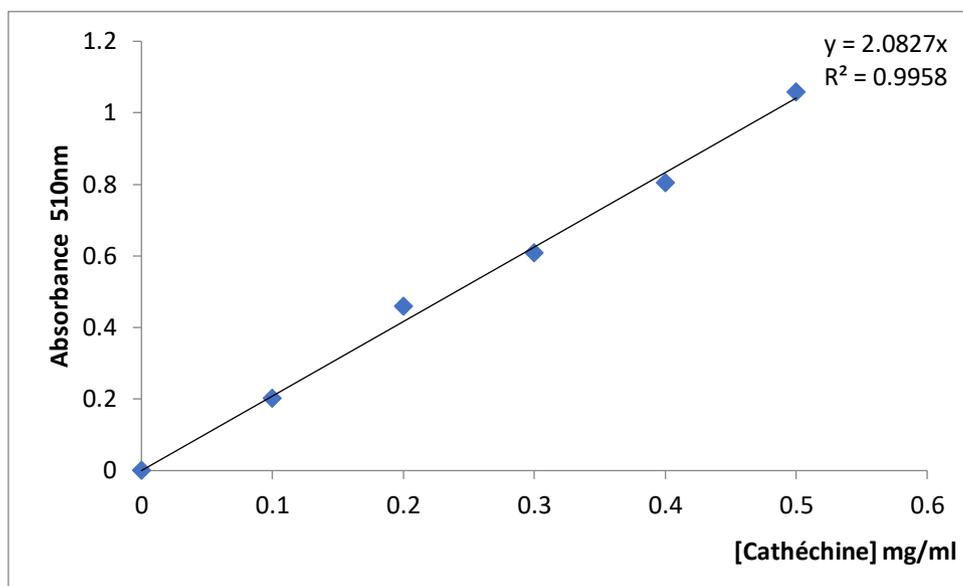


Figure 13: Courbe étalon de la catéchine ($\lambda=510\text{nm}$).

L'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de la catéchine utilisée dans la gamme d'étalonnage avec un R^2 de 0,99.

Les résultats du dosage de flavonoïdes totaux révèlent que l'extrait butanolique de *M. vulgare* contient une teneur de l'ordre de $265,81 \pm 29,49$ mg EC/g de l'extrait. D'autre part, des études ultérieures réalisées sur la même espèce présente des teneurs en flavonoïdes totaux plus ou moins différentes, de 0,002 mg EC/g d'extrait butanolique (Billami, 2016), de 0,61 mg EAG/g d'extrait méthanoïque aqueux (Chedia et al., 2014) et de $86\mu\text{g}$ EC/g d'extrait méthanol pur (Ghazghazia et al., 2013).

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 quantification 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 Evaluation de l'activité antioxydante

Le présent travail a pour but l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait n-butanol qui riche en polyphénols, obtenu à partir des feuilles de *M. vulgare*, par extraction sélective. Pour cela, deux méthodes sont utilisées ce qui permet de confirmer l'activité de l'extrait.

Les résultats de l'activité antioxydante de l'extrait de *M. vulgare* et de l'acide ascorbique en utilisant le test de DPPH, exprimés en pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations sont représentées dans **la figure 14**. Selon les résultats enregistrés, les valeurs des concentrations inhibitrices calculées par le logiciel de statistique AAT Bioquest, sont de l'ordre de 28,45 µg/ml pour l'extrait butanolique et de 1,41 µg/ml pour l'acide ascorbique, ce qui indique que notre extrait est doté d'un pouvoir antioxydant 20 fois moins important que celui de l'acide ascorbique un antioxydant de référence.

Le pouvoir antioxydant de *M. vulgare* a été prouvé dans plusieurs études, différents IC₅₀ ont été trouvé de l'ordre de 0.49 mg/ml (**Boudjelal, 2013**), de 0.07 à 0.23 mg/ml (**Namoune et al. , 2018**) et de 99 µg/ml (**Tabet Zatla, 2017**).

D'autre part, le test de FRAP, un test universel utilisé pour les extraits de plantes et pour le plasma (**Bougandoura & Bendimerad, 2013**), a aussi montré une activité antioxydante prometteuse pour notre extrait, en effet une augmentation de l'absorbance témoigne du pouvoir réducteur.

Les pouvoirs réducteurs de l'extrait butanolique et de l'acide ascorbique sont dose-dépendant, à la concentration de 1 mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait butanolique (DO=1.89) est supérieur à celui de l'acide ascorbique (DO=0,54) (**Fig.15**). Des études ultérieures ont également démontré l'activité de *M.vulgare* par le test de FRAP, des concentrations allant de 0,25 mg/ml à 1 mg/ml d'un extrait acétonique ont donné des absorbances comprises entre 0,88 et 1,52 à une longueur d'onde de 700 nm (**Orhan et al., 2010**).

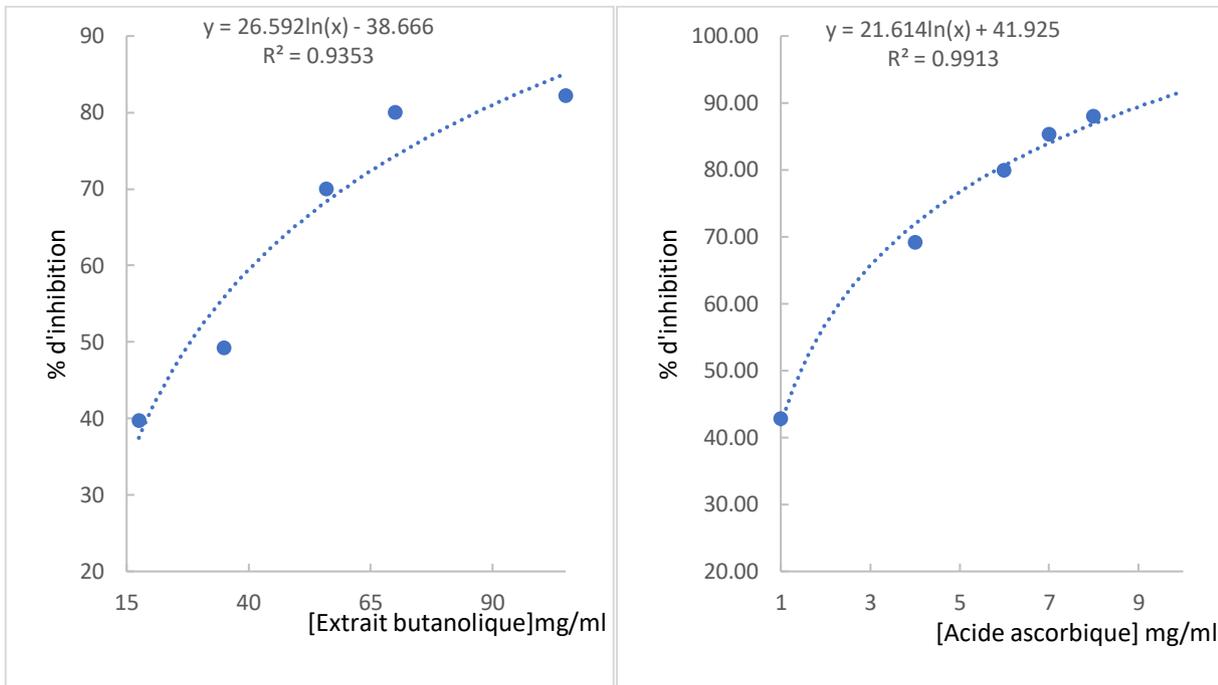


Figure 14: Pourcentages d'inhibition de DPPH par l'extrait n-butanol de *M. vulgare* et de l'acide ascorbique.

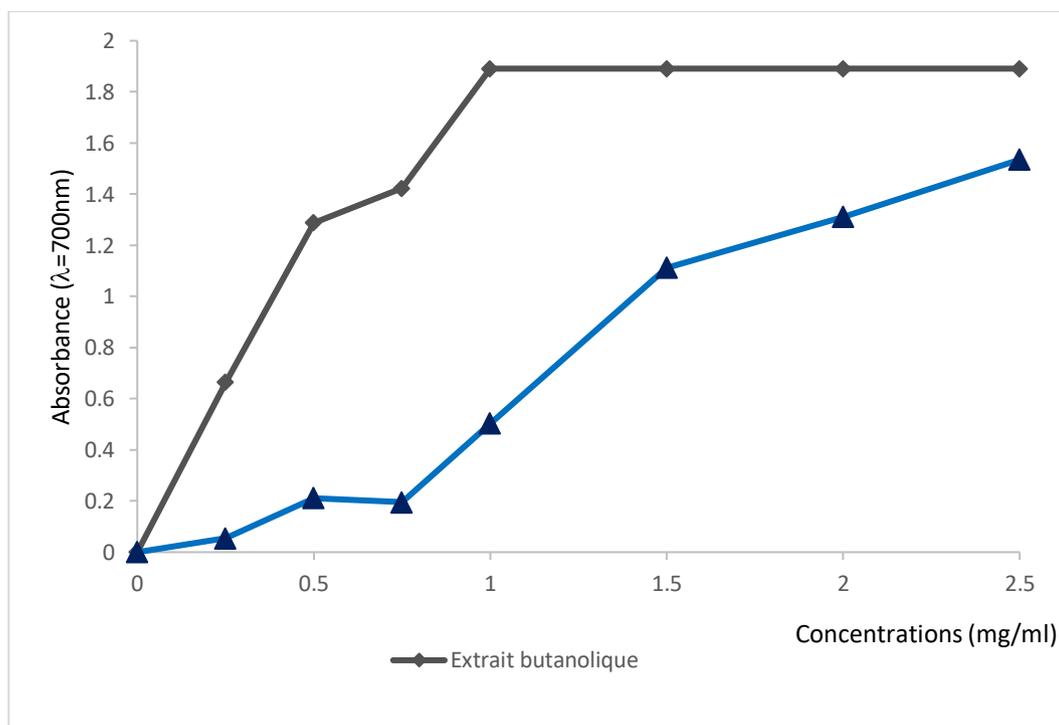


Figure 15: Pouvoir réducteur de l'extrait butanolique des feuilles de *M. vulgare* comparé à l'acide ascorbique par le test de FRAP.

Marrubium vulgare est l'une des sources naturelles de substances antioxydantes d'importance élevée (Ghedadba et al., 2014), l'activité antioxydante de notre extrait butanolique peut être attribuée en premier lieu à ses composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir antioxydant, qui dépend essentiellement des groupements hydroxyles (Heim et al., 2002).

Les composés phénoliques sont capables d'inactiver les radicaux libres par transfert d'atomes d'hydrogène ou par donation d'électrons (de Lima Cherubim et al., 2020). Le mécanisme de l'inactivation des radicaux est représenté dans la figure 16. Leur structure chimique leur donne la capacité de réagir comme des piègeurs de radicaux libres, pourtant le type du composé, le degré de méthylation (addition de groupement méthoxyle -O-CH₃), et le nombre de groupements hydroxyles sont parmi les paramètres qui déterminent l'activité antioxydante. La glycosylation diminue significativement la capacité antioxydante des polyphénols, principalement importante dans le cas du groupement 3 -OH (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

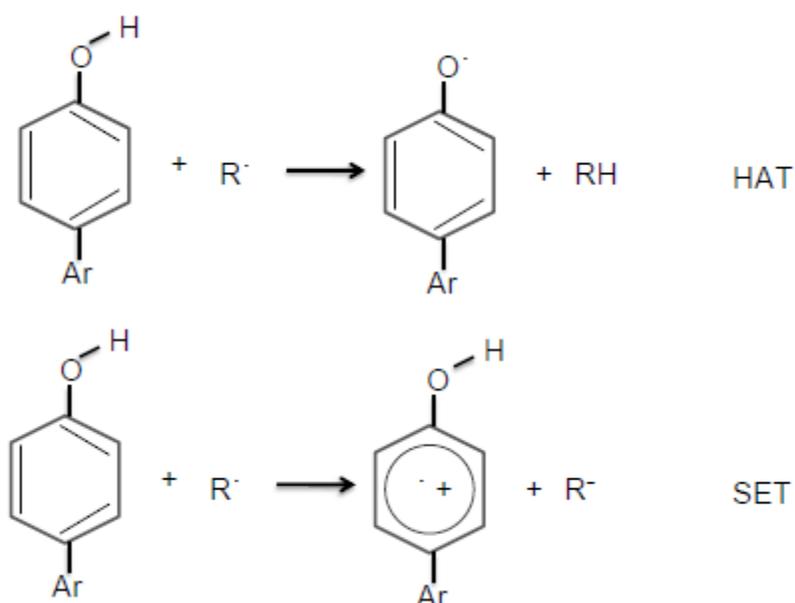


Figure 16: Mécanisme de l'activité antioxydante des polyphénols (Belščak-Cvitanović et al., 2018).

(HAT : transfert d'un atome d'hydrogène ; SET: transfert d'un électron célibataire.)

Par ailleurs, des travaux réalisés sur *M. vulgare*, ont montré que son pouvoir antioxydant est due aux phénylpropanoïdes glycosides, comme le forsythoside B, le ballotétroside, l'arénarioside, et l'actéoside, ces métabolites secondaires sont considérés par plusieurs chercheurs comme de puissant antioxydant (Martin-Nizard et al., 2003). La présence de cette famille dans notre extrait n'a pas été mise en évidence, mais leur polarité croissante suggère leur présence dans l'extrait butanolique.

Conclusion et perspectives

Notre étude a pour objectif d'obtenir un extrait n-butanolique enrichi en polyphénols des feuilles de *M. vulgare* et l'étude quantitative de leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes, ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante *in vitro* par deux méthodes le test de DPPH et le test de FRAP.

Les résultats ont montré la présence de composés phénoliques y compris les flavonoïdes, et leur pouvoir antioxydant très important, qui était même plus puissant que celui de l'acide ascorbique dans le test de FRAP.

L'extrait n-butanolique étudié est un extrait brut contenant un grand nombre de composés phénoliques et non phénoliques, l'activité antioxydante pourrait être due à une seule molécule, des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier, isoler et purifier ce principe actif.

Les résultats suggèrent l'importance de l'espèce du *Marrubium vulgare* de *Ain Témouchent* pour l'usage dans la pharmacie et la phytothérapie. Elle peut aussi être une source importante de molécules antioxydantes naturelles alternatives à certains additifs synthétiques.

Il est aussi nécessaire de réaliser d'autres études sur la plante, afin d'évaluer davantage son pouvoir antioxydant très intéressant, en utilisant des *tests in vitro* et *in vivo*.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de *M. vulgare* comme plante médicinale traditionnelle très largement utilisée.

Références bibliographiques

- Argyropoulou, C., Karioti, A., & Skaltsa, H. (2009). Labdane diterpenes from *Marrubium thessalum*. *Phytochemistry*, 70(5), 635-640.
- Belhattab, R. (2018). *COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIETES ANTIOXYDANTES, ANTIFONGIQUES ET ANTIAFLATOXINOGENES D'EXTRAITS DE Origanum glandulosum Desf. et Marrubium vulgare L.(famille des Lamiaceae)* Thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas- Sétif (Algérie). Répéré à: <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/1338>.
- 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.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bhuiyan, F. R., Howlader, S., Raihan, T., & Hasan, M. (2020). Plants metabolites: possibility of natural therapeutics against the COVID-19 pandemic. *Frontiers in Medicine*, 7, 444.
- Billami, C. (2016). *Pouvoir antibactérien des flavonoïdes de Marrubium vulgare L. (Mémoire de Master, Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem)*. Répéré à <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/2750>.
- Boudjelal, A. (2013). *Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées. Ajuga iva, Artemisia herba alba. (Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba)* Répéré à <http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2015/10/BOUDJELAL-Amel.pdf>.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., & Ruberto, G. (2012). Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare L.* infusion. *Fitoterapia*, 83(2), 286-292.
- Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta (L.) Briq.* *Nature & Technology*(9), 14.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, 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*. Paper presented at the Annales pharmaceutiques francaises.
- Bouزيد, A., Chadli, R., & Bouزيد, K. (2017). Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo L.* dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. *Phytothérapie*, 15(6), 373-378.
- Cechinel Filho, V. (2018). *Marrubium vulgare L Medicinal and Aromatic Plants of South America* (pp. 317-321): Springer.
- Chedia, A., Ghazghazi, H., Brahim, H., & Abderrazak, M. (2014). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of *Marrubium vulgare* methanolic extract. *Tunisian J Med Plants Nat Prod*, 11, 1-8.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601-623.
- de Lima Cherubim, D. J., Buzanello Martins, C. V., Oliveira Fariña, L., & da Silva de Lucca, R. A. (2020). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of cosmetic dermatology*, 19(1), 33-37.
- Deli, M., Ndjantou, E. B., Ngatchic Metsagang, J. T., Petit, J., Njintang Yanou, N., & Scher, J. (2019). Successive grinding and sieving as a new tool to fractionate polyphenols and antioxidants of plants powders: Application to *Boscia senegalensis* seeds, *Dichrostachys glomerata* fruits, and *Hibiscus sabdariffa* calyx powders. *Food science & nutrition*, 7(5), 1795-1806.

- Desport, J.-C., & Couratier, P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 253-259.
- Djahra, A. B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2015). Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 24, 29-37.
- Fathiazad, F., Rameshrad, M., Asghari, S., Hamedeyazdan, S., Garjani, A., & Maleki-Dizaji, N. (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory effect of *Marrubium vulgare* L. Methanol extract on carrageenan-induced paw inflammation in rats. *Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 3-11.
- Favier, A. (2006). *Stress oxydant et pathologies humaines*. Paper presented at the Annales pharmaceutiques françaises.
- Ghazghazia, H., Chediab, A., Abderrazakb, M., & Brahima, H. (2013). Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *Microbiol Hyg Alim*, 25(73), 37-41.
- Ghedadba, N., Bousselela, 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.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., & Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-638.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free radical biology & medicine*, 18(1), 125-126.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P. (2002). Botanique systématique: Une perspective phylogénétique (1e Ed ed., pp. 369-384). Paris et Bruxelles: De Boeck Supérieur.
- Kasmi, h. (2016). *Extraction et dosage de polyphénols et de flavonoïdes des extraits des plantes : Marrubium vulgare, Satureja calamintha, Mentha pulegium et Salvia officinalis. (mémoire de master université de Tlemcen) repéré à. http://bibfac.univ-tlemcen.dz/snvstu/opac_css/doc_num.php?explnum_id=2271*.
- Koné, K. P. F. O., Soro, Y., & Siaka, S. (2017). Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 15-22.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7292-7295.
- Lizorieux, C. P.-M. d. (2013). *Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique*. THÈSE DE DOCTORAT, Université Paris Sud 11, France. Repéré à <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/22218729>
- 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.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.

- Marouf, A. (2021). Plantes Natives D'Algérie. Repéré à, from <http://algerianativeplants.net/html/plante-algerie-recherche.php>
- Martin-Nizard, F., Sahpaz, S., Furman, C., Fruchart, J.-C., Duriez, P., & Bailleul, F. (2003). Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Planta medica*, 69(03), 207-211.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- Monteil, C., Mulder, P., & Thuillez, C. (2004). Stress oxydant et insuffisance cardiaque: une cible thérapeutique utopique? *Médecine thérapeutique Cardiologie*, 2(2), 78-85.
- Namoune, I., Khettal, B., Assaf, A., 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.
- Orhan, I. E., Belhattab, R., Şenol, F., Gülpinar, A., Hoşbaş, 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*, 32(3), 566-571.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 1995(276), 87-92.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.
- Ratnam, D. V., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, 113(3), 189-207.
- Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I. (2006). *Natural Products Isolation*. Totowa, New Jersey: umana Press Inc.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Singh, A., Tripathi, P., Yadawa, A. K., & Singh, S. (2020). Promising polyphenols in Parkinson's disease therapeutics. *Neurochemical Research*, 45, 1731-1745.
- 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. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Tabet Zatl, A. (2017). Caractérisations chimiques et étude biologiques d'extraits de quatre plantes aromatiques" Daucus. carota ssp. sativus, Marrubium vulgare, Ballota nigra et Cynoglossum cheirifolium" de la région de Tlemcen (Doctorat en sciences, université Abou-Bekr Belkaid-Telemcen) repéré à <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/12169>.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- 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>

Références bibliographiques

[D9%8A%D8%A7%D8%A9/2020/biochimie/5752/Activit%C3%A9%20biologique%20S%20persica%2015%20juin%202020-converti.pdf](#).

Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(11), 5165-5170.

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.