



N° de série :

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 الشهيد حمه لخضر الوادي
Université Echahid Hamma Lakhdar -El OUED
كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية
Département de biologie Cellulaire et Moléculaire

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en
Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

***l'étude de l'effet de *Marrubium vulgare* sur
l'hépatotoxicité induite par l'alloxane chez les rattes de type
*Wistar albinos****

Présentés Par

M^{elle} ARCHI Ghania

M^{elle} TOURQUI Hala

Devant le jury composé de :

Président : Mr.Derouiche S.

M.C.B, Université d'El Oued.

Examineurs : Mr.khelef Y .

M.A.A, Université d'El Oued.

Promoteur : Mr. Bouali N.

M.A.A, Université d'El Oued.

Co -promoteur : Mme. MAHBOUB N.

M.A.A, Université d'El Oued.

- Année universitaire 2017/2018 -



Dédicace

Merci Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire bout de rêve et de bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire "ya kayoum".

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère.

À mon oncle, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

À Mr. BOUALI Noureddine, qu'il a fait preuve d'une patience et a été un grand apport pour la réalisation de ce travail ses conseils ses orientations ainsi que son soutien moral et scientifique. Son encadrement était de plus exemplaire.

Et aussi Mr. DEROUICHE Samir pour son suivi et ses conseils. Aussi pour son soutien, son attention, ses qualités humaines.

À mes frères: ABD ELMADJID et MAHDI en reconnaissance de leur affection toujours constante.

Tout le membre de ma famille grande et petite.

À mes très chères amies: HALA (binomi). À tous mes proches, mes camarades de promotion

GHANIA



Dédicace

Je Dédie ce modeste travail

*À ma cher mère **ARCCHI AMEL** et mon cher père
ABD ELMADJID, pour leur endurance et leurs
sacrifices sans limites*

*À mes frères: **WAIL** et **NAFAA** et mes sœurs:
NAHLA, **RIMA**, **HANINE** ET **DJOUMANA** .Et ma
À **FIANCE ALI***

*A ma famille **TOURQUI** et **ARCHI** et même
la famille **MAHBOUB***

*A mon cher oncle Dr . **Archi Abd EL SAMAD***

*A Mr. **BOUALI Noureddine**, qu'il a fait preuve
d'une patience et a été un grand apport pour la réalisation
de ce travail ses conseils ses orientation ainsi que son
soutien moral et scientifique. Son encadrement était de
plus exemplaire.*

*Et aussi Mme **MAHBOUB N.** pour son suivi et ses
conseils. Aussi pour son soutien, son attention, son
qualités humaines.*

*A mes très chers amis: **GHANIA** (binomi) et **IMAN** .À
tous mes proches, mes camarades de promotion*

HALA

Remerciements

«La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage».
Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nos avoir donné la force et la patience.

Nous remercions très chaleureusement Monsieur BOUALI Nourredine, notre directeur de mémoire. Merci pour votre disponibilité et votre encadrement efficace. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous nous aviez témoigné tout au long de cette étude. Malgré vos importantes obligations, vous avez toujours été présent pour orienter notre recherche dans la bonne direction et ceci a été fondamental dans la

bonne réalisation de cet mémoire. Soyez assurés de nos profonde gratitude.
Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur DEROUICHE S, enseignant à la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie pour son aide et ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements
Mme SANA, responsable du laboratoire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la vie à

L'université d'Echahid Hamma Lakhdar EL OUED.

Nos sincères et respectueux remerciements vont également à, Mr. Khalef Y Maitre assistant à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'el Oued qui nous a honoré en acceptant d'être examinateur de ce jury et pour ses précieux conseils.

Nous exprimons nos vifs remerciements à DEROUICHE S, enseignant à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'el Oued de nos avoir accordé le privilège de participer à ce jury en qualité présidente avec soin ce mémoire. Tout l'honneur lui en revient

Nous exprimons nos remerciements aussi à Mme MAHBOUB N. pour son aide dans la réalisation de ce travail.

Nous remercions aussi tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

GHANIA & HALA

Résumé

Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'évaluer l'activité antioxydante et l'effet antihépatotoxique de l'extrait aqueux de feuilles de *Marrubium vulgare*, sur un modèle des rattes *Wistar* rendu intoxiqué par injection intrapéritonéale d'une dose unique de 120 mg/kg pc d'alloxane. L'étude réalisée sur 30 rattes de la souche *Wistar* albinos répartis en six groupe de cinq rattes chacun dont le premier lot sert de témoin (T), le second subit une gavage gastrique de la liqueur de *Marrubium vulgare* 100mg/kg/j, le 3ème subit une injection unique d'alloxane 120 mg/kg pc, et les 3 derniers lots ont subit une combinaison d'injection ; alloxane 120 mg/kg pc dose unique et des différentes doses de *Marrubium vulgare* 100 mg /kg/j, 200 mg/kg/j et 400 mg/kg/j spécifique à chaque lot et ceci pendant 21 jours. Le screening phytochimique est essentiel afin d'identifier les composés existant dans l'extrait aqueux. La teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait a été déterminée par des méthodes de Folin-Ciocalteu, chlorure d'aluminium. L'activité antioxydant de l'extrait issus de la *Marrubium vulgare* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydant remarquable de l'ordre 0,010mg/ml. L'administration de traitement par gavage un fois par jour pendant 21 jours a révélée , une diminution significative de l'activité enzymatique des transaminases, de la phosphatase alcaline, la bilirubine totale et le protéine γ GT chez les trois doses de traitement par l'extrait aqueux . D'autre part l'administration de l'extrait aqueux est également amélioré le statut de stress oxydant dans le tissu hépatique. En effet, la diminution des concentrations de l'MDA et de GST avec une augmentation du taux de GSH et l'activité de la catalase dans le foie des rattes traités par les trois doses de l'extrait aqueux plus précise la dose de 200mg/kg pc. Finalement, l'examen histologique du tissus hépatique a révélé une amélioration des lésions hépatocytaires des rattes alloxanique traité par rapport à celle des rattes alloxanique non traité. En conclusion, le *Marrubium vulgare* a un effet antihépatotoxique et dispose la dose de 200 mg/kg/j comme un model thérapeutique

Mots clés: Alloxane, stress oxydant, *Marrubium vulgare*, Antioxydante, Antihépatotoxique tissu hépatique.

ملخص

يهدف عملنا إلى دراسة النشاطية المضادة للأكسدة من جهة وتأثير المضاد لتسمم الكبد من جهة أخرى للمستخلص المائي لنبات المريوة *Marrubium vulgare* والتي طبقت على جرذان من نوع ويستار اصبحت مسممة عن طريق حقنها بجرعة واحدة من الالوكسان 120ملغ/كغ. أجريت هذه الدراسة على 30 جرذ مقسمة إلى ستة (6) مجموعات ذوات خمسة جرذان: المجموعة الأولى الشاهد , الثانية الشاهد المعالج بالالوكسان 120ملغ/كغ , الثالثة الشاهد المعالج بالمريوة *Marrubium vulgare* 100ملغ/كغ , وثلاثة مجموعات محقونة 120 ملغ/كغ من مادة الالوكسان مع جرعات مختلفة من المريوة *Marrubium vulgare* على التوالي: 100ملغ/كغ , 200ملغ/كغ , 400ملغ/كغ و كل هذا لمدة 21 يوم. توصلنا من خلال الدراسة الكيميونباتية للمتخلص المائي وذلك بإتباع طريقة Folin-Ciocalteu و كلوريد الألومونيوم. كما تم تحديد النشاطية المضادة لأكسدة للمستخلص المريوة *Marrubium vulgare* عن طريق معايرة الجذور الحرة DPPH حيث أن هذا المستخلص المائي لديه تأثير على النشاطية بنسبة 0.010 ملغ/مل. المعالجة بالمستخلص المائي مرة في اليوم لمدة 21 يوم أدت إلى انخفاض ملحوظ في نشاط إنزيمات ناقلات الامين ، الفوسفاتاز القلوي، والبيليروبين الكلي والبروتين GGT عند المعالجة بتركيز الثلاثة للمستخلص المائي . من ناحية أخرى أدى كذلك إلى تحسين معايير الإجهاد التأكسدي على مستوى النسيج الكبدي .ومنه نقصان تركيز بيروكسيد الدهون MDA و في مستوى GST مع زيادة في مستوي الغلوتاثيون وفي نشاط الكاتالاز في كبد الجرذان المعالجة بالتركيز الثلاثة المختلفة للمستخلص المائي بالتحديد التركيز 200ملغ/كغ . وأخيرًا ، أظهر الفحص النسيجي لأنسجة الكبد تحسناً على مستوى الخلايا الكبدية في الفئران المعالجة بالالوكسان مع المستخلص المائي مقارنة بالفئران التي لا يتم علاجها بالمستخلص . في الختام ، *Marrubium vulgare* له تأثير مضاد لتسمم الكبد ويمكن اعتبار جرعة 200 ملغ / كغ / يوم كنموذج علاجي.

الكلمات المفتاحية : أوكسان ، الإجهاد التأكسدي ، *Marrubium vulgare* ، مضادات الأكسدة ، مضاد لتسمم الكبد، نسيج الكبدي.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction générale	01
PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : l'Hépatotoxicité	
I.1. Le foie	05
I.1.1. Anatomie et physiologie du foie.....	05
I.1.1.1. Le lobule hépatique.....	06
I.1.1.2. Hépatocyte	07
I.2. Hépatotoxicité.....	08
I.2.1. Définition d'hépatotoxicité	08
I.2.2. L'hépatite.....	08
I.2.2.1. Types d'hépatite	08
I.2.2.1.1. Stéatose.....	08
I.2.2.1.2 Cholestase	10
I.2.2.1.3 Cirrhose	11
I.2.2.1.4. Fibrose.....	12
I.2.2.1.5. Nécrose.....	12
I.2.3. Mécanismes de l'hépatotoxicité.....	13
I.2.4. Les types de l'hépatotoxicité	16
I.2.4.1. l'hépatotoxicité des xénobiotiques	16
I.2.4.2. L'hépatotoxicité des substances récréatives.....	17
I.2.4.3. L'hépatotoxicité des produits chimiques.....	18
I.2.4.4. L'hépatotoxicité des Métaux.....	19

I.2.4.5.L'hépatotoxicité des Produits industriels.....	20
I.2.4.6. L'hépatotoxicité des médicaments.....	20
I.3.L'hépatotoxicité de Produit chimique étudié : Alloxane.....	22
I.3.1.L'alloxane.....	22
I.3.1.1Définition.....	22
I.3.1.2.Historique.....	22
I.3.1.3.Mode d'action	23
Chapitre II : Les stress oxydatifs	
II.1. Définition.....	26
II.2.Les radicaux libres.....	26
II.3. Les conséquences du stress oxydatif.....	28
II.3.1. Oxydation des lipides	28
II.3.2. Oxydation de l'ADN.....	29
II.3.3. Oxydation des protéines.....	29
II.3.4. Oxydation des glucides	30
II.4. Systèmes de défense antioxydants.....	30
II.4.1. Antioxydants enzymatiques.....	31
II.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	31
II.4.1.2. Catalases	31
II.4.1.3.Glutathion peroxydase (GPx).....	31
II.4.1.4. Glutathion réductase.....	32
II.4.1.5.Glutathionne-S-transférase.....	32
II.4.2. Antioxydants non enzymatiques.....	32
II.4.2.1. Vitamine E.....	32
II. 4.2.2. Vitamine C (acide ascorbique).....	33
II.4.2.3. Glutathion réduit (GSH).....	33
II.4.2.4. Oligo-éléments	33
II.4.2.4.1.Zinc.....	33
II.4.2.4.2.Sélénium.....	34
II.4.2.4.3.Cuivre.....	34
II.4.2.5. Polyphénols.....	34

Chapitre III : <i>Marrubium vulgare</i>	
III. <i>Marrubium vulgare</i>	36
III.1. Définition.....	36
III.2. Classification botanique.....	36
III.3. Description morphologique.....	37
III.4. Composition chimique.....	37
III.5. Répartition géographique.....	37
III.6. Utilisations de la plante.....	37
III.7. Toxicité.....	37
DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIELS ET MÉTHODES	
I. Matériels	39
I.1. Matériels végétales <i>Marrubium vulgare</i>	39
I.1.1. Récolte de <i>Marrubium vulgare</i>	39
I.2. Matériels Animale.....	39
I.2.1. Enceinte d'élevage.....	40
I.3. Etude l'effet d'extrait de <i>Marrubium vulgare</i>	40
I.3.1. Induction de l'hépatotoxicité.....	40
I.3.2. Traitement des souris.....	41
I.3.3. Sacrifices et prélèvements d'organes.....	41
I.4. Produits chimiques.....	43
I.4. Matériels du laboratoire.....	43
II. Méthodes	43
II.1. Préparation des extraits aqueux.....	43
II.2. Calcul des rendements en extrait sec.....	45
II.3. Tests photochimiques.....	45
II.4. Détermination des teneurs en principes actifs.....	46
II.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	46
II.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	47
II.5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits par la méthode de DPPH (effet scavenger).....	47

II-6. Méthode de dosage des paramètres biochimiques sérique.....	48
II-6-1. Méthode de dosage de bilirubine totale.....	48
II-6-2. Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST).....	49
II-6-3. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT).....	50
II-6-4. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL).....	50
II-6-5. Méthode de dosage de gamma-glutamyl transferase (γ GT).....	51
II-7. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif.....	52
II-7-1. Préparation de l'homogénats des organes.....	52
II-7-2. Méthode de Dosage des protéines tissulaire.....	52
II.7.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	52
II .7.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH).....	53
II.7.5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	54
II-7-6.Mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs).....	55
II-8. Technique histologique.....	56
II-8-1.Fixation des échantillons.....	56
II-8-2.Déshydratation.....	56
II-8-3. Inclusion.....	56
II-8-4. Confection des coupes histologiques.....	56
II-8-5. Colorations.....	57
II-8-6.Montage et observation.....	57
II-9. Méthode d'analyse statistique.....	57
TROISIEME PARTIES : RESULTAT ET DISCUSSION	
I. Résultats.....	59
I.1. Criblage phytochimiques.....	59
I.2. Analyse quantitative des composés phénoliques.....	60
I. 2.1. Teneurs en polyphénols totaux (PPT).....	60
I.2.2.Teneurs en flavonoïde total (FVT).....	61
I. 3. Activité anti-radicalaire d'extrait aqueux de <i>Marrubium vulgare</i>	62
I.4. Étude du poids corporel et poids relatif du foie.....	63

I.4.1.Poids corporel.....	65	
I.4.2.Poids relatif du foie.....	66	
I.5. Etude des paramètres biochimiques sanguins.....	67	
I.5.1.Transaminases.....	68	
I.5.2.Phosphatase alcaline.....	69	
I.5.3 Bilirubine Totale.....	69	
I.5.4. Le protéine γ GT.....	70	
I.6. Détermination du statut oxydant/antioxydant.....	71	
I.6.1. Malondialdéhyde (MDA).....	71	
I.6.2.Glutathion réduit (GSH).....	72	
I.6.3.Glutathion - S- transférase (GST).....	73	
I.6.4.Catalase (CAT).....	74	
I.7. Etude histologique.....	75	
II. Discussion	79	
Conclusion générale et perspective	89	
Référence bibliographique	92	
Annexe	106	
Résumé et mots clés		

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	page
Figure 1	Vue supérieure d'un foie de rat LG: lobe gauche, LM : lobe médian, LD : lobe droit	5
Figure 2	Représentation des différents lobes hépatiques et vascularisation chez le rat LG : lobe gauche , LM :lobe médian , LD :lobe droit	5
Figure 3	Segmentation hépatique	6
Figure 4	Schéma d'un lobule hépatique	7
Figure 5	Aspects histo-pathologiques des NAFLD et NASH	9
Figure 6	Aspect macroscopique de la stéatose hépatique	9
Figure 7	Cholestase intrapatoctaire et intracanaliculaire	11
Figure 8	Cirrhose hépatique hypertrophique (vue macroscopique de la surface)	12
Figure 9	Nécrose hépatocytaire, au cours d'une hépatite toxique	13
Figure 10	Localisation histologique préférentielle au sein du lobule hépatique, de certaines atteintes hépatiques toxiques	14
Figure 11	Les 5 phases de la biotransformation des xénobiotiques par les hépatocytes.	17
Figure 12	Formules chimiques de l'Alloxane, l'acide dialurique et butyl-alloxane	24
Figure 13	Réactions redox cyclables entre l'acide dialurique et l'alloxane	24
Figure 14	Origine des différents radicaux libres oxygéné	27
Figure 15	Peroxydation des acides gras polyinsaturés	29
Figure 16	Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule	30

Figure 17	<i>Marrubium vulgare</i>	36
Figure 18	la plante <i>Marrubium vulgare</i> (photo originale)	39
Figure 19	Rates blanche de la souche <i>Wistar Albinos</i> (photo originale)	40
Figure 20	Schéma récapitulatif de protocole expérimental.	42
Figure 21	Protocole de préparation de l'extrait aqueux de la <i>Marrubium vulgare</i> .	44
Figure 22	Forme réduite et libre du DPPH	47
Figure 23	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols	60
Figure 24	Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	61
Figure 25	Courbe d'inhibition d'acide ascorbique	62
Figure 26	Effet d'extraits de <i>Marrubium vulgare</i> sur le radical DPPH	63
Figure 27	Etude de l'évolution du poids corporel et gain du poids corporel (B) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.	65
Figure 28	Evolution du poids relatif du foie (%) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.	66
Figure 29	L'évaluation de l'activité enzymatique des transaminases sériques chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	68
Figure 30	L'évaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sérique chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	69
Figure 31	L'évaluation de la concentration sérique de la bilirubine totale chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	70
Figure 32	L'évaluation de la concentration de protéine γ GT chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	70
Figure 33	Variation du malon-di-aldéhyde (μ mol/mg de prot) dans le foie chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement	72

Figure 34	Variation de la teneur hépatique en glutathion réduit (nmol/mg de protéine) chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	73
Figure 35	variation de l'activité enzymatique de la glutathion –S- transférase (nmol/mg de protéines) chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	74
Figure 36	Variation de l'activité du catalase (UI/min/g prot) dans le foie chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement	75
Figure 37	Coupes histologiques du foie du ratte témoin sain: (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)	76
Figure 38	Coupes histologiques du foie du ratte intoxiquée par l'alloxane : (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)	76
Figure 39	Coupes histologiques du foie du ratte traité par <i>Marrubium vulgare</i> : (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)	77
Figure 40	Coupes histologiques du foie du ratte traité par <i>Marrubium vulgare</i> (100mg/kg pc): (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)	77
Figure 41	Coupes histologiques du foie du ratte traité par <i>Marrubium vulgare</i> (200mg/kg pc): (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)	78
Figure 42	Coupes histologiques du foie du ratte traité par <i>Marrubium vulgare</i> (4200mg/kg pc): (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)	78

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre	Page
Tableau 1	Critères diagnostiques d'une hépatite aiguë toxique et liste non exhaustive des principaux médicaments	15
Tableau 2	Mécanismes moléculaires pouvant aboutir à une lésion cellulaire hépatique toxique (ils sont souvent multiples et associés pour un même toxique)	21
Tableau 3	Propriétés chimiques d'alloxane.	23
Tableau 4	Espèces réactives de l'azote(ERN).	27
Tableau 5	Le rendement de l'extrait aqueux de <i>Marrubium vulgare</i> .	59
Tableau 6	Screening phytochimique réalisé sur les feuilles de <i>Marrubium vulgare</i>	59
Tableau 7	Contenu en polyphénols totaux dans l'extrait aqueux.	61
Tableau 8	Contenu en flavonoïdes dans l'extrait <i>Marrubium vulgare</i> .	62
Tableau 9	Valeur d'IC50 du DPPH des extraits aqueux de <i>Marrubium vulgare</i> .	63
Tableau 10	Variation du poids corporel et poids relatif du foie (g/100g de poids corporel) chez les rates témoins et traités après 21 jours de traitement.	64
Tableau 11	Variation de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline sérique et la variation de bilirubine totale, γ GT chez les lots témoin et les lots traités après 21 jours de traitement	67
Tableau 12	Variation de la teneur hépatique en glutathion (GSH), Malon-di-aldéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion -S-transférase (GST) et le catalase (CAT) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.	71

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATION

A : Absorbance

A : Alloxane

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AGPI : Acides gras poly-insaturés.

AlCl₃ :Aluminum chloride

ALT : L'alanine amino-transférase

AST : L'Aspartate amino-transférase

ATP :adénosine -5'- triphosphate

BD :bilirubine direct

BHT : Butylhydroxtoluene

BT :bilirubine totale

Ca : calcium

CAT : Catalase.

CCl₄ : tétrachlorure de carbone

CDNB :1-chloro 2, 4 dinitrobenzène

D.U : Dose unique

DMSO : Diméthyl sulfoxide

Do : densité optique

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

DTNB : Acide dithio-bis2-nitrobenzoïque

EAG : Equivalent d'acide gallique

EMTX : enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques

EQ :équivalent de Quercetine

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ES: Ecart-types.

FeCl₃ : Chlorure de fer

G:gramme

GPx: Glutathion peroxydase.

GR: Glutathion réductase

GSH:Glutathione réduit.

GSSG: Glutathionoxydé.

GSSG-Red : La glutathion réductase

GST : Glutathion S-transférase

H:heurs

H₂O₂ : peroxide d'hydrogène

HCL : Chlorure d'hydrogène

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance

I.P : Intra péritonéale

In : Inflammation

Nz : Nécrose zonale

L'eau Φ : L'eau distillé

L'IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50

LDL :Low density lipoproteins

MDA :Malondialdéhyde

MV : *Marrubium vulgare*

NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide **NADH**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NO• : monoxyde d'azote

O₂ : l'oxygène singulet

O₂• : l'anion superoxyde

OH• : radical hydroxyle

OHdG : 8-hydroxy-2-désoxyguanosine

PAL : La phosphatase alcaline

pc/j : Poids corporelle par jours

Pd : Pendent

pNPP : p Nitrophénylphosphate

RL : des radicaux libres

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RNS: Reactive nitrogen Spices (espèces réactive de nitrogène)

ROS: Reactive Oxygen Spices (espèces réactive de l'oxygène)

SBA : Sérum albumine bovin

SOD : superoxyde dismutase

T :témoin

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacétique

TGO : Glutamopyruvate Transférase

TGP : Glutamooxaloacétate Transférase

Zn :Le zinc

γGT : Gamma-Glutamyl Transférase.

INTRODUCTION

Générale

Introduction générale

Le foie est la plus volumineux des glandes annexes du tube digestif. Il est situé à la partie supérieure et droite de la cavité abdominale (**Bouchet ,1983**), Il a des fonctions métaboliques complexes indispensables à la vie (**Casing ,2008**). Essentiellement la production continue de bile et la mise en réserve les glucides sous la forme du glycogène et libère du glucose selon les besoins, et synthétise la plupart des protéines du plasma sanguine. (**Fawcett ,1997**).

L'hépatotoxicité des xénobiotiques provoqué par les agents chimiques comme l'Alloxane constitue une cause importante de maladies hépatiques. Celles-ci sont très diverses et recouvrent l'ensemble de la pathologie du foie.(**Larrey ,2009**)

Les concentrations élevées en espèces réactives de l'oxygène. induisent un stress oxydant, qui est due à un déséquilibre entre le système antioxydant et la molécule oxydante, celle-ci est considérée comme le moteur qui génère d'autre complication comme les maladies cardiovasculaires et les cancers. Et pour renforcer et améliorer la performance de système de défense antioxydant on utilise des plantes porte un grand intérêt comme source énorme d'antioxydants (**Bonnefont-Rousselot, 2010**).

La médecine traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies continue à être utilisée et au cours de ces dix dernières années sa popularité n'a fait qu'augmenter. Les pratiques de la médecine traditionnelle varient grandement d'un pays à l'autre et d'une région à l'autre (**Singh et al., 2012**).

L'Algérie, riche par sa biodiversité et son climat, est une plate-forme géographique très importante qui mérite d'être explorée dans le domaine de la recherche de molécules hypoglycémiantes et/ ou antioxydants originaires de plantes qui ont pour longtemps servi à une grande tranche de population comme moyen incontournable de médication.

Pour notre part, notre choix s'est porté sur le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* qui est une source très riche en tanins et flavonoides que l'on rencontre dans les feuilles. Elle est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est employée par les tradipraticiens contre le diabète, les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les affections bronchiques aiguës bénignes et les rhumes. Cependant, on en sait très peu au sujet de ses composants et de leur mode d'action pharmacologique. (**Sahpaz et al., 2002**) De plus, si les propriétés antioxydantes,

antihypertensives antimicrobiennes et anticancéreuses de *Marrubium vulgare* se confirment chez l'homme dans les années à venir, cette plante pourrait constituer une alternative de première intention dans la prise en charge des facteurs de risque de maladies graves à l'officine.

Ainsi donc, ses effets sur les diverses pathologies nous ont donc poussés à valoriser cette espèce endémique végétale qu'est le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* et à démontrer les activités biologiques de ses principes actifs.

Pour ce faire, nous avons structuré notre travail en deux parties; la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui comporte trois chapitres. Le premier chapitre est consacré sur l'hépatotoxicité. Nous avons ensuite abordé un deuxième chapitre sur le stress oxydatif et dans le troisième et dernier chapitre, nous présentons de plante médicinale étudié.

Quant à la deuxième partie est expérimentale, elle est réservée à l'ensemble des matériels et méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antihépatotoxique *in vivo*, chez des rats traités par l'alloxane. Enfin la discussion des résultats obtenus suivi par conclusion.

PREMIERE PARTIE

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I

L'HEPATOTOXICITE

I. 1. Le foie

I.1.1. Anatomie et physiologie du foie

Le foie représente l'organe interne le plus volumineux du corps humain et pèse en moyenne 1.5 kg chez l'adulte, se situe du côté supérieur droit de la cavité abdominale, entre le diaphragme et l'estomac, et s'avère responsable de plusieurs fonctions physiologiques vitales, il reçoit et gère la plupart des nutriments et des substances nocives provenant du métabolisme cellulaire et de circulation (Meeks R. G. et al, 1991)

Le foie est formé de deux lobes principaux, le droit et le gauche, ainsi que de deux petits lobes, à savoir, le lobe caudé à la face postérieure, et le lobe carré à la face inférieure, et chaque lobe se subdivise lui-même en un grand nombre d'unités fonctionnelles appelées lobules. ces lobules sont formés de cellules hépatiques, les hépatocytes (Thomson A. B. R., Shaffer E. A 2001), apport sanguin hépatique est double :

➤ La veine porte qui draine le territoire splachnique (veine splénique, veine mésentérique supérieure et veine mésentérique inférieure) et apporte les 2/3 du volume sanguin hépatique (Figure 1,2).

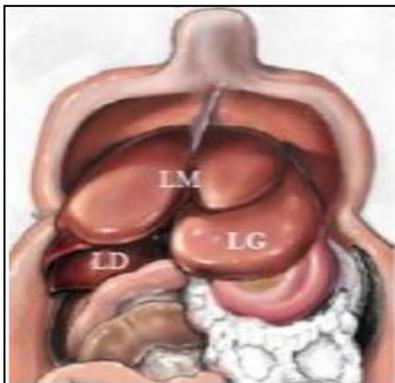


Figure 01 : vue supérieure d'un foie de rat LG
:lobe gauche, LM :lobe médian, LD :lobe droit

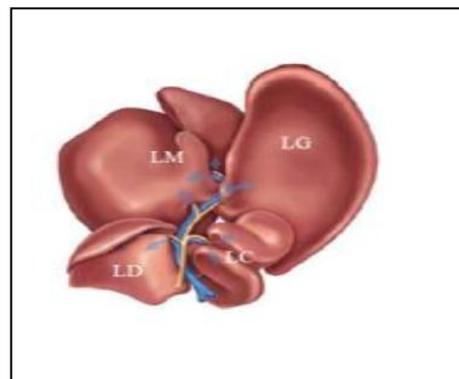


Figure 02 : représentation des différents lobes hépatiques et vascularisation chez le rat LG : lobe gauche , LM :lobe médian , LD :lobe droit

➤ L'artère hépatique issue du tronc coeliaque. L'ensemble veine porte - artère hépatique constitue, avec le canal cholédoque, le pédicule hépatique. La ramification de ce pédicule permet d'isoler 8 segments. La numérotation de ces segments a été déterminée par Couinaud, en partant du centre vers la périphérie (Figure 3).

➤ Le sang quitte le foie par trois veines sus-hépatiques principales (droite, médiane et gauche) et des veines accessoires qui drainent le segment 1 (ou lobe de Spiegel). Les veines sus-hépatiques principales délimitent 4 secteurs composés chacun de 1 à 2 segments : latéral gauche (segments 2 et 3) paramédian gauche (segment 4), paramédian droit (segments 5 et 8) et latéral (ou postérieur) droit (segments 6 et 7). Elles se jettent dans la veine cave inférieure (Shaffer E.A. , Myers R.P., 2005) (Figure3)

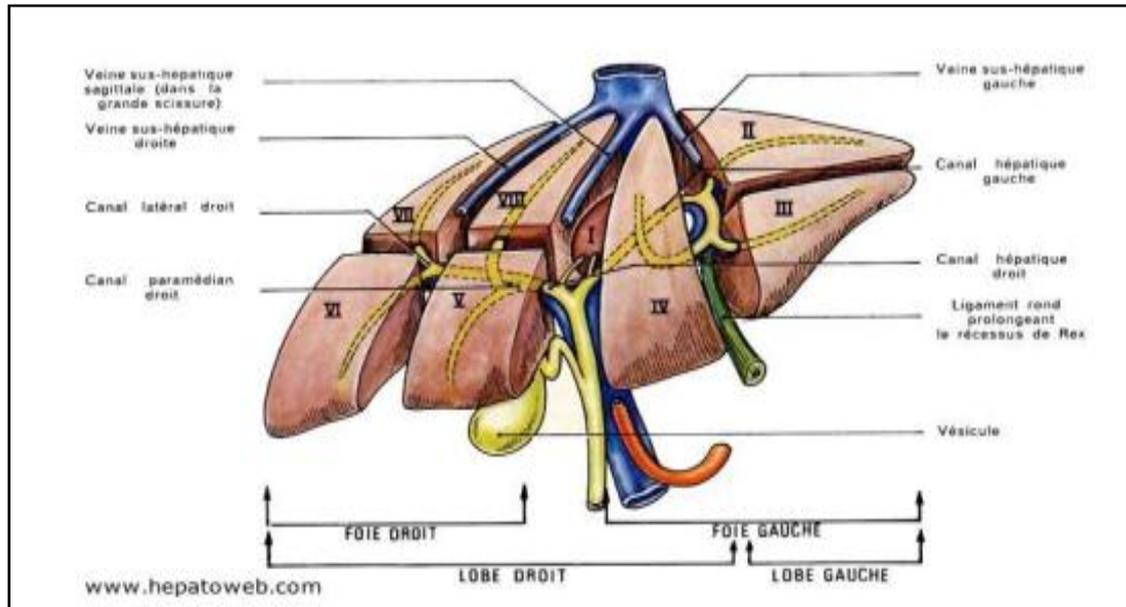


Figure 3: Segmentation hépatique (Dadoune *et al.*, 1990).

I.1.1.1. Le lobule hépatique

Le lobule hépatique correspond à l'unité structurelle du foie, c'est-à-dire aux travées dont les sinusoides se drainent dans la veine centrolobulaire. Toutefois, deux autres concepts, davantage adaptés à la physiologie et à la pathologie, ont été développés pour définir la subdivision de cet organe (Dadoune *et al.*, 1990).

En particulier, l'acinus de rattachement, qui est de forme losangique, est cloisonné par les veines centrolobulaires de deux lobules contigus et par les angles de jonction de ces derniers, dont l'un s'avère portal et l'autre non portal; il constitue l'unité artérielle car centrée sur une branche de l'artère hépatique. L'acinus se divise en trois zones définies selon la distance les séparant des vaisseaux nourriciers, donc selon le degré d'oxygénation. La zone la mieux oxygénée est appelée zone périportale (zone 1), alors que la moins oxygénée correspond à la zone centrolobulaire (zone 3). La région de transition entre les zones 1 et 3 se nomme zone médiolobulaire ou intermédiaire (Bioulac Sage et Le Bail, 1991) (Figure 4).

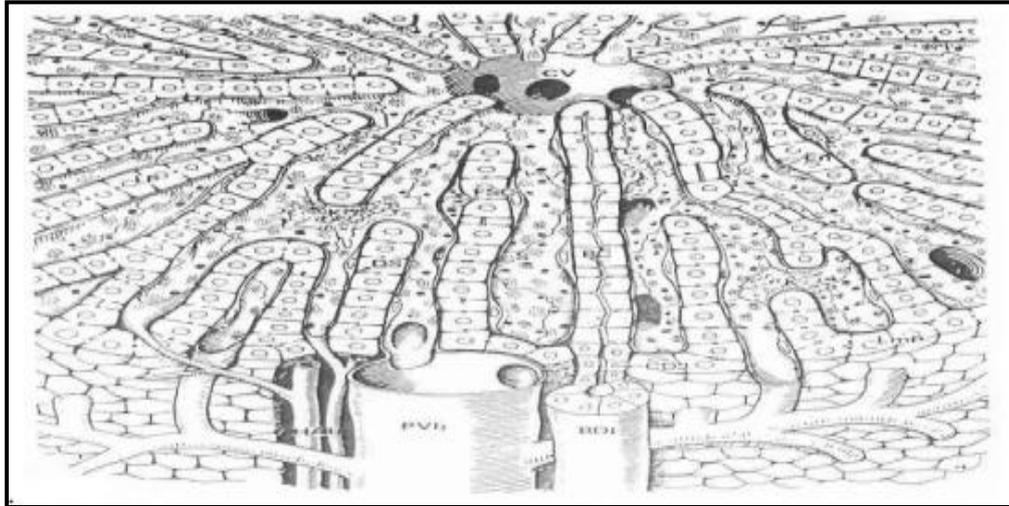


Figure 4: Schéma d'un lobule hépatique . CV: veine centrale; K:cellules de Kupffer; FSC: cellules de Ito; BC: canalicule biliaire; En: cellule endothéliale; S: sinusoïde avec fenestrations; DS: espace de Disse; HAb: branche de l'artère hépatique; PVb: branche de la veine porte; CDJ: canal de Hering ; BDI: canal biliaire; LmP: travée circonscrivant le lobule LP: travée hépatocyttaire (**Rey-Grobellet X. et all , 1996**)

I.1.1.2.Hépatocyte

Les hépatocytes sont les plus nombreuses des cellules du foie , Il s'agit de cellules épithéliales polygonales de grande taille, organisées en travées anastomosées irrégulières et unicellulaires rayonnant autour d'une veine centrale. Également, elles sont associées les unes aux autres par des jonctions lacunaires et séparées par les capillaires sinusoides (**Lullmann-rauch, 2008**)

Par ailleurs, les hépatocytes possèdent un noyau central, rond et volumineux, et certains sont binucléés, voire polynucléés .Également, leur cytoplasme est de type éosinophile granuleux puisque très riche en mitochondries et organites intracellulaires (ex.: appareil de Golgi et les réticulum endoplasmiques lisse et rugueux). Cette abondance en organites cytoplasmiques reflète une importante activité métabolique, ce qui explique d'ailleurs que ce type cellulaire en particulier ait été choisi comme modèle pour notre étude: les hépatocytes représentent le centre fonctionnel du foie (**Gebhardt, 1992**).

Les hépatocytes s'avèrent responsables de la biotransformation des composés potentiellement toxiques en composés non toxiques, excrétés dans les sécrétions biliaires et l'urine. C'est en fait principalement le système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450 qui permet la conversion des xénobiotiques, c'est-à-dire, de toutes les substances naturelles ou artificielles de faible poids moléculaire étrangères à l'organisme (médicaments, produits de l'alimentation,

substances polluantes de l'environnement) et souvent hydrophobes, en composés hydrosolubles facilement éliminés (**Jones A. L., Spring-Mills E., 1984**)

I.2. Hépatotoxicité

I.2.1. Définition d'hépatotoxicité

L'Hépatotoxicité est définie comme le pouvoir qu'a une substance (comme les médicaments) de provoquer des dommages au foie. La toxicité du foie se manifeste sous forme d'inflammation (on parlera d'hépatite) ou encore de nécrose (mort des cellules du foie), dans les cas plus sévères. La stéatose hépatique survient lorsqu'il y a accumulation des acides gras dans le foie (**Dana et al., 1993**)

I.2.2. L'hépatite

L'hépatite est une inflammation aigüe ou chronique du foie le plus souvent asymptomatique (**Liozon, 2010**). Elle est causée par des infections virales, mais également par des substances toxiques tel que l'alcool et certains médicaments, des maladies auto-immunes et des infections parasitaires ou bactériennes. La sévérité de l'hépatite dépend de l'étendue de la destruction des cellules hépatiques (hépatocytes). Elle se traduit par une perte de l'appétit, une couleur foncée des urines, une asthénie par fois accompagnée de fièvre. Le foie peut augmenter de volume et un ictère peut survenir. L'ictère résulte des dépôts de pigments biliaires dans la peau et les tissus conjonctifs (**Gimenez et al., 2000**)

I.2.2.1. Types d'hépatite

I.2.2.1.1. Stéatose

La stéatose ou dégénérescence graisseuse et l'accumulation anormale de triglycérides dans les cellules parenchymateuses (**Émile, 2010**). Elle est fréquemment observée dans les hépatocytes sous forme de vacuoles [figure 05] (**Schneck, 2014 ; Brunt, 2001**), fortement impliqués dans le métabolisme lipidique : stéatose hépatocytaire (**Émile, 2010**). Dans ce cas plus de 5 % des hépatocytes doivent être atteints. Il s'agit surtout d'une stéatose macro-vacuolaire qui est classée en trois grades en fonction du pourcentage d'hépatocytes atteints : **0**: < 5%; **1**: 5 à 33%; **2**: 34 à 66%; **3**: > 66%. Elle se développe initialement dans les zones peri-centrolobulaires [Figure 05] (**Schneck, 2014 ; Brunt, 2001**).

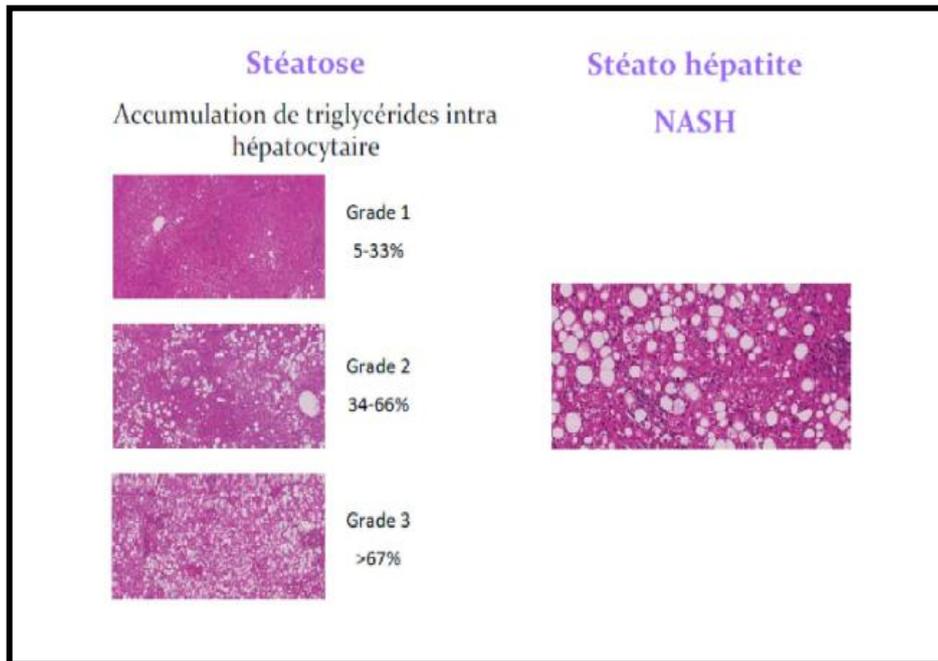


Figure 05 : Aspects histo-pathologiques des NAFLD et NASH (Schneck, 2014 ; Brunt, 2001).

Dans la stéatose importantes, le volume du foie est augmenté, sa consistance est molle, sa couleur est jaune, laissant à la coupe une marque de dépôts grasseeux [figure 06] (Emile, 2010).



Figure 06 : Aspect macroscopique de la stéatose hépatique : le foie est jaune, mou, de taille augmentée (Emile, 2010).

Dans un foie sain, le stocke de triglycéride qui résulte du métabolisme lipidique est tel qu'il n'est pas visible en microscopie optique dans le cytoplasme des hépatocytes. En revanche dans un foie stéatosique, l'examen microscopique montre des vacuoles optiquement vides dans le cytoplasme des hépatocytes, déformant la structure même du parenchyme hépatique. Schématiquement, on distingue deux type de stéatose, en fonction de la

morphologie et de la taille des gouttelettes lipidiques : la stéatose microvasculaire et la stéatose macrovasculaire (**Brunt, 2001**).

- La stéatose macrovasculaire est la plus fréquente, où les gouttelettes de stéatose refoulent le noyau en périphérie de la cellule et peuvent à l'extrême provoquer la formation de Kyste graisseux.
- La stéatose microvasculaire est rare, où le noyau reste centrale et/ou les vacuoles sont très petites et elles peuvent être difficiles à voir. Certaines étiologies en sont plus volontiers à l'origine : stéatose aigue gravidique, stéatose toxique médicamenteuse (**Emile, 2010**).

Les causes sont multiples : toxiques (alcool médicament), nutritionnelles, diabète, obésité, hypoxie (**Emile, 2010**).

I.2.2.1.2 Cholestase

La cholestase est définie par un défaut de transport des acides biliaires du foie vers l'intestin résultant en une accumulation des acides biliaires et d'autres constituants de la bile dans le foie ou dans les voies hépatobiliaires. Cette accumulation peut être en rapport avec une altération fonctionnelle de la synthèse de la bile au niveau des hépatocytes et/ou de son excrétion dans les conduits biliaires ou avec une pathologie des voies biliaires intra et/ou extra hépatiques (**Arrese & Trauner, 2003**).

La cholestase peut être intrahépatique lorsqu'il s'agit d'une diminution de l'excrétion canaliculaire et donc d'une accumulation des constituants de la bile dans le cytoplasme des hépatocytes ou extrahépatique quand il s'agit d'une obstruction qui empêche la progression de la bile au niveau des conduits biliaires. Elle est associée à une augmentation des taux sériques de la bilirubine conjuguée et de la phosphatase alcaline et peut se manifester par une jaunisse, un prurit et une stéatorrhée [figure07] (**Zimmerman, 1979**).

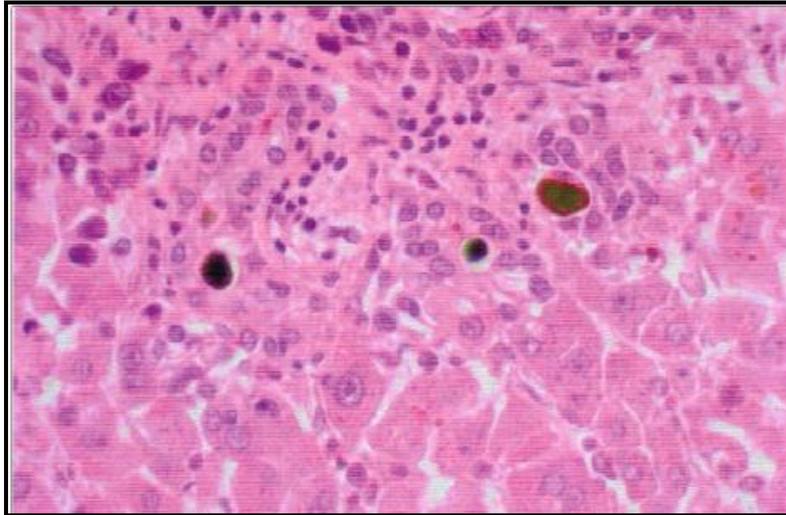


Figure 07 : Cholestase intrahépatocytaire et intracanaliculaire (**Emile, 2010**).

I.2.2.1.3 Cirrhose

Lorsqu'il existe une destruction répétée des hépatocytes, on assiste dans le foie à un phénomène de division cellulaire pour remplacer les cellules détruites (régénération) et à un dépôt de tissu collagène (cicatrisation). L'association d'une fibrose hépatique et d'une transformation de l'architecture hépatique normale en une structure nodulaire anormale « nodule de régénération » (**Guilford, 1996**) est appelée cirrhose.

Dans la cirrhose, les hépatocytes séparés d'un courant sanguin sinusoidale normal, ont une fonction réduite, par exemple synthétisent moins d'albumine et sécrètent moins de bile. La cicatrisation et l'interruption du système sinusoidale de bas débit ont de graves conséquences.

Le sang provenant de la veine porte n'est plus drainé hors du foie et une hypertension portale se développe (**Heath et al., 2006**). Il existe deux grandes causes de cirrhose : L'alcool et les virus. L'alcool est le plus souvent responsable d'une forme micronodulaire donnant des petits nodules de régénération, alors qu'une cirrhose d'origine virale donne le plus souvent des formes macronodulaires[**figure08**] (**Siberngal et Lang, 2000**).



Figure 08 : Cirrhose hépatique hypertrophique (vue macroscopique de la surface) (**Emile, 2010**).

I.2.2.1.4. Fibrose

La fibrose hépatique est la principale conséquence lésionnelle de toute agression chronique du foie. Le stade de fibrose est important à préciser dès le diagnostic d'une hépatopathie chronique et même au cours de l'évolution du fait de son impact sur l'incidence des complications et sur le suivi médical (**Jérôme et al., 2007**). Elle est caractérisée par une accumulation de matrice extracellulaire suite à une réaction inflammatoire, et si les mécanismes de dégradation de cette matrice deviennent insuffisants, cela peut aboutir progressivement à une fibrose (**Schuppan et al., 2001**). La fibrose peut évoluer vers une cirrhose, une insuffisance hépatique et une hypertension portale (**Gines et al., 2004**).

Les principales causes de la fibrose hépatique sont : les hépatites virales chroniques B et C, l'intoxication alcoolique, les stéatopathies non alcooliques et l'hémochromatose génétique. La cirrhose est le stade majeur du développement de la fibrose hépatique induite par la plupart des maladies chroniques du foie (**Sawadogo et al., 2007**).

I.2.2.1.5. Nécrose

C'est une altération profonde de l'ensemble de la cellule, noyau, organites intracellulaires et cytoplasme fondamental (**Cabanne et Bonenfant, 1980**). Elle est observable lorsque la cellule morte reste dans un environnement vivant, et doit donc être distinguée de l'autolyse [**figure09**] (**Emile, 2010**). C'est un phénomène irréversible et létal (de nicros = mort, cadavre), globalement, deux types essentiels de nécrose cellulaire peuvent être distingués par microscopie photonique : une nécrose de liquéfaction avec gonflement habituel de la cellule, limite imprécise, aspect trouble du cytoplasme ; une nécrose de

coagulation avec condensation homogène acidophile du cytoplasme (**Cabanne & Bonenfant, 1980**).

Les causes de nécrose hépatique sont nombreuses et variées : virus (calicivirus,...), intoxications bactériennes (*Bacillus pisiniformis*,...), intoxications endogènes par des bactéries intrinsèques, toxines émises par d'autres organes malades, aflatoxines végétales, nombreuses substances organiques, métaux lourds (plomb, sélénium), insecticides, hypoxie due à un choc, une anémie ou une thromboembolie lors d'insuffisance cardiaque congestive, et bien sûr, une grande quantité de médicaments (acide salicylique, acétaminophène « paracétamol »,...) (**Center, 1993 ; Petit, 1992 ; Van Shuigs, 1994 ; Wolf, 1989**).

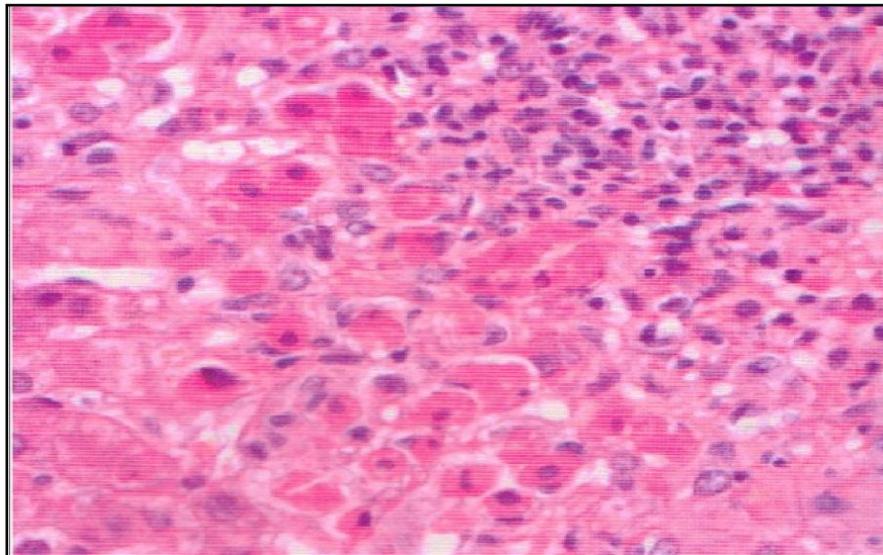


Figure 09 : Nécrose hépatocytaire, au cours d'une hépatite toxique (**Emile, 2010**).

I.2.3. Mécanismes de l'hépatotoxicité

Généralement, l'hépatotoxicité est dose-dépendante et donc prévisible, apparaissant après un court délai (1-12 semaines) après exposition au toxique (**Navarro VJ et Senior JR, 2006**) Plus rarement, elle est idiosyncrasique, dose-indépendante et apparaît avec une période de latence plus longue (jusqu'à 12 mois). Le mécanisme des lésions hépatiques n'est pas unique, mais est généralement spécifique du toxique en cause, avec une atteinte régiosélective du lobule hépatique . Il peut être cytolytique, cholestatique ou mixte .Différents mécanismes moléculaires peuvent y conduire (**Navarro VJ et Senior JR, 2006**) (**Lee WM, 2003**) (**Kaplowitz N, 2002**) (**Figure10**).

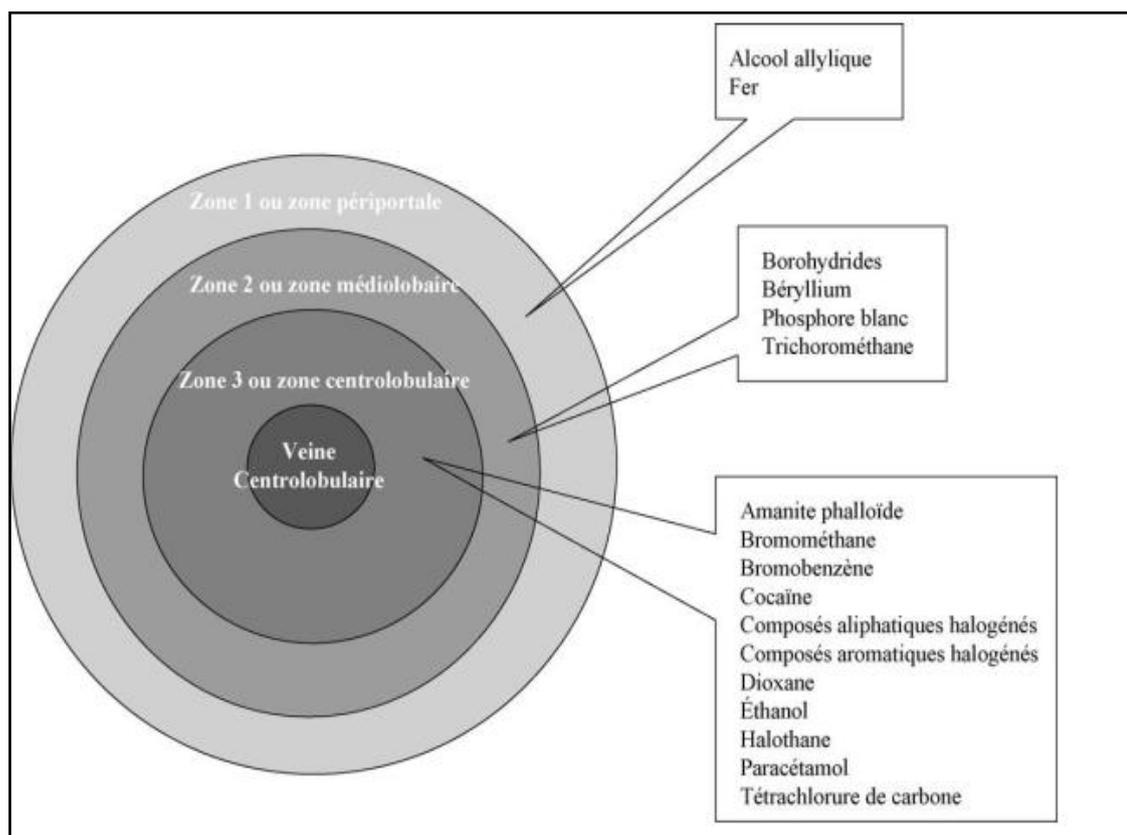


Figure 10: Localisation histologique préférentielle au sein du lobule hépatique, de certaines atteintes hépatiques toxiques (**Kaplowitz N, 2002**)

Un produit chimique (insecticide organochloré, raticide à base de phosphore ou dérivés trivalents d'arsenic) est une circonstance usuelle de découverte d'une hépatotoxicité. Une exposition à un produit chimique, dans un contexte professionnel ou domestique, peut aussi être à l'origine d'une toxicité hépatique, comme pour certains solvants à base de tétrachlorure de carbone (CCl₄), de phénol ou de nitrobenzène, certains herbicides contenant des dioxines ou certains matériaux plastiques utilisant des pH talâtes ou l'éthylène dichloré. Dans d'autres situations, seul un interrogatoire méticuleux permet de reconnaître une exposition à un toxique et notamment à un produit délivré sans ordonnance, une préparation médicinale traditionnelle ou une phytothérapie. Au total, plus de 1000 produits disponibles sur le marché sont potentiellement hépatotoxiques. Une liste non exhaustive des principaux d'entre eux est fourni (**Kaplowitz N,2002**) (**Lee WM, 2003**) (**Tableau1**).

Tableau 01 : Critères diagnostiques d'une hépatite aiguë toxique et liste non exhaustive des principaux médicaments. (Navarro VJ et Senior JR, 2006)

Critère diagnostique	Type d'hépatite
Augmentation des ALAT > 2N Augmentation des ALAT et Pal avec ALAT/Pal ≥ 5	Hépatite cytolytique
Augmentation des Pal > 2N Augmentation de la bilirubine conjuguée > 2N	Hépatite cholestatique
Augmentation des ALAT et Pal avec ALAT/Pal ≤ 2 Augmentation des ALAT et Pal avec ALAT/Pal de 2 à 5	Hépatite mixte
Principaux médicaments	Type d'hépatite
Acarbose Acide valproïque AINS (Diclofenac) Antiviraux nucléosidiques, Allopurinol, Amiodarone, Aspirine® Baclofène, Bupropion, Disulfiram, Fluoxétine, Flucytosine Furosémide, Halothane, isoflurane, enflurane, Herbes (Piper methysticum oukava), Hydralazine, Isoniazide Ketoconazole, fluconazole, voriconazole, Lisinopril, Losartan Méthotrexate, Méthyl dopa, Ofloxacine, norfloxacine, trovafloxacine Oméprazole, Paracétamol, Paroxétine, Pentamidine, Pyrazinamide Ranitidine, Rifampicine, Risperidone, Sertraline, Statines Sterptokinase, Sulfasalazine, Tétracyclines, Trazodone	Hépatite cholestatique
Amoxicilline , acide Clavulanique , Acide fusidique	Hépatite cytolytique

I.2.4. Les types de l'hépatotoxicité

I.2.4.1. l'hépatotoxicité des xénobiotiques

Le foie constitue le principal site de la biotransformation des xénobiotiques pénétrant intentionnellement (médicaments, produits de l'alimentation) ou non intentionnellement (ex: polluants environnementaux) dans l'organisme, et ce processus se déroule spécifiquement dans les hépatocytes (Meeks R.G, *et all* 1991) (Berry, M. N., Edwards, A. M. , 2000).

Certains xénobiotiques peuvent traverser la bicouche lipidique des cellules, et leur biotransformation a pour principale conséquence la formation de métabolites qui sont ensuite retirés du corps (Meeks R.G, *et all* 1991) (Berry, M. N., Edwards, A. M. , 2000). Étant donné la variabilité importante de la nature chimique des xénobiotiques, de nombreuses enzymes et isoenzymes se montrent nécessaires pour leur métabolisme; il s'agit des enzymes du métabolisme et du transport des xénobiotiques (EMTX), réparties en différentes phases (Meeks R.G, *et all* 1991) (Ortiz de Montellano P. R , 1995) .

Habituellement, il y a premièrement transport du xénobiotique du sang vers l'intérieur de la cellule «(métabolisme de phase 0) (Figure 6), puis la substance est tout d'abord oxydée, mais aussi parfois réduite ou hydrolysée, principalement par le système enzymatique monooxygénase du cytochrome P450 (métabolisme de phase 1) (Figure 6); elle est ensuite conjuguée à des molécules hautement polaires telles que le glutathion, la cystéine et le sulfate (métabolisme de phase 2) (Figure 6). Les métabolites, devenus hydrosolubles, sont ensuite transportés à l'aide de protéines de transport directement vers les canalicules biliaires puis excrétés dans la bile, ou sont à nouveau libérés dans le système sanguin et excrétés dans l'urine via les reins (métabolisme de phase 4) (Figure 6). De plus, le métabolisme de phase 3 correspond au transport intracellulaire des xénobiotiques (Figure 6) (Berry, M. N., Edwards, A. M. , 2000).

Enfin, bien que le système de biotransformation se retrouve également dans d'autres sites (poumons ,reins ,intestins, peau et organes endocrines) quantitativement ,celui du foie demeure plus important (Clement *et al.*, 2010)

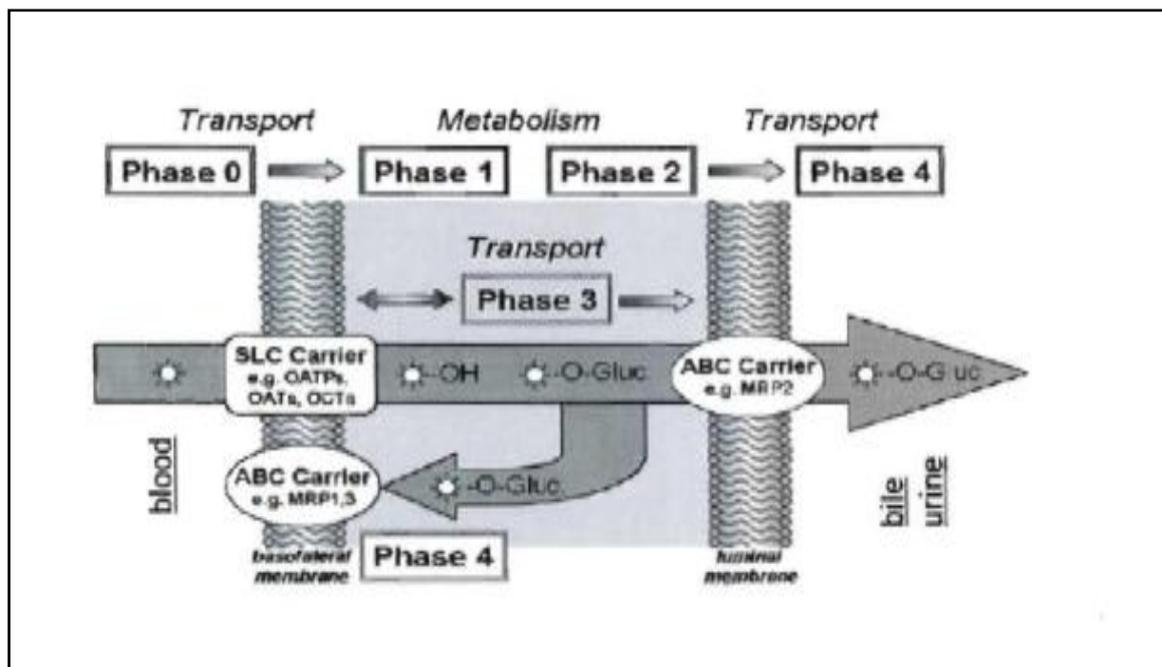


Figure 11 : Les 5 phases de la biotransformation des xénobiotiques par les hépatocytes.

(Petzinger E., Geyer 1 , 2006)

I.2.4.2. L'hépatotoxicité des substances récréatives

Le cannabis n'est pas impliqué dans la survenue d'une hépatopathie aiguë ou chronique. En revanche, d'autres substances récréatives sont de plus en plus souvent responsables d'atteintes toxiques aiguës en particulier hépatiques. Les circonstances d'utilisation et les différents produits pris sont variés. Il peut s'agir de substances utilisées de façon illégale comme la cocaïne ou les amphétamines (Ecstasy) .ou de médicaments dont l'usage est détourné comme la buprénorphine Pour l'ecstasy(Peyriere H , 2009) l'hépatotoxicité peut survenir après l'ingestion d'un ou deux comprimés ou après une utilisation régulière pendant plusieurs semaines ou mois. On distingue deux formes d'hépatotoxicité .

- 1/ La première est directement liée au produit qui supprime la sensation de fatigue
- 2/ Le besoin de sommeil. Il en résulte que la personne consommatrice peut faire des efforts physiques très importants sans ressentir le besoin de repos ou de réhydratation.

On peut alors observer une hépatite de type ischémique, dans un délai court, de l'ordre de 48 heures le plus souvent après la prise . Ce type de complication se voit fréquemment au décours d'une « rave- 15 party ». Le second type d'hépatotoxicité avec l'Ecstasy résulte de la contamination du produit utilisé par un autre agent potentiellement hépatotoxique .

Dans ce cas, l'atteinte hépatique est souvent plus tardive, une à deux semaines plus tard après la prise avec des manifestations d'hépatite aiguë cytolytique qui peuvent s'associer à des phénomènes allergiques, l'hépatotoxicité liée à la prise d'Ecstasy représentait la deuxième cause d'hépatite aiguë sévère chez les moins de 25 ans. Le traitement était symptomatique et la résolution totale de l'hépatite était obtenue en trois à 12 mois. Quelques cas de recours à la transplantation hépatique ont été décrits dans la littérature. En pratique, une hépatotoxicité induite par l'Ecstasy doit être évoquée systématiquement chez un sujet jeune devant un ictère inexpliqué associé à une hépatomégalie et une altération de la fonction hépatique (**Larrey D.,2007**)

I.2.4.3. L'hépatotoxicité des produits chimiques

L'exposition à des produits chimiques est un problème croissant dans les sociétés industrielles. Le risque est plus difficile à apprécier que pour les médicaments car il n'existe pas de réseaux spécifiques qui recueillent les effets secondaires. De plus, les effets à long terme à des expositions à doses variables, susceptibles de produire des maladies chroniques du foie et des cancers, restent peu connus. La période de latence entre l'exposition et l'événement peut durer des années.

L'évaluation du risque nécessite l'étude systématique et coordonnée entre l'épidémiologie, la toxicologie, les études cliniques de fac, on à prendre les mesures les plus appropriées. On estime que moins de 30 % des agents chimiques potentiellement toxiques sont correctement testés et qu'il persiste une exposition dans l'environnement et au travail, à des produits hépatotoxiques connus comme le chlorure de vinyle (**Tolman KG, Dalpiaz AS,2007**) Les atteintes causées par les agents industriels posent un problème spécifique particulier de mode d'exposition. La structure et la liposolubilité du produit sont des déterminants majeurs du mode de transport à travers les membranes cellulaires, Les voies principales d'exposition sont transcutanées, gastro-intestinales par ingestion et pulmonaire par inhalation (**Berry, M. N., Edwards, A. M.,2000**) La voie parentérale reste possible mais rare.

L'exposition industrielle survient principalement par inhalation ou par contact cutané alors que les agents environnementaux agissent principalement par inhalation et par voie digestive. La voie de contamination influence la toxicité du produit chimique. Lorsque le produit est détoxifié dans le foie, l'exposition par inhalation expose à un risque toxique plus grand que par ingestion puisque l'agent chimique va éviter une partie de la détoxification la voie trans- hépatique. Beaucoup de produits polluants inhalés sont toxiques pour la peau, les

poumons, le rein, la moelle alors que l'hépatotoxicité est relativement rare (**Tolman KG, Dalpiaz AS, 2007**) Comme pour les médicaments, les agents chimiques peuvent entraîner pratiquement l'ensemble des maladies hépatiques connu. l'âge, le sexe, le niveau nutritionnel, une prédisposition génétique, l'exposition à d'autres xénobiotiques et éventuellement l'existence d'une maladie sous jacente sont les facteurs de susceptibilité individuelle aux risques hépatiques liés aux agents chimiques . Il y a plus de 25 ans, il y a eu une épidémie d'ictère chez des adolescents utilisant des détachants en inhalation à visée récréative. L'ictère a été attribué à l'association tétrachlorure de carbone et le trichloroéthylène . Dans cette association, le produit toxique était le tétrachlorure de carbone et le promoteur, par induction enzymatique, le trichloroéthylène. Un autre exemple concerne les dioxines qui sont des inducteurs potentiels du CYP1A2 et qui contaminent certaines rivières (**Bolt HM. Vinyl chloride, 2005**).

Les mécanismes de toxicité des agents industriels sont similaires à ceux des médicaments classiques avec la formation de métabolites réactifs, de radicaux libres entraînant différentes lésions cellulaires . Cela est bien caractérisé pour le tétrachlorure de carbone et le chlorure de vinyle (**Bolt HM. Vinyl chloride, 2005** .L'Agence nationale américaine responsable du contrôle des agents chimiques a récemment listé 667 agents chimiques dont 228 sont référencés comme potentiellement toxiques pour le foie, soit sur la base d'expérimentations animales ou bien d'observations cliniques (**NIOSH, 1994**).

I.2.4.4. L'hépatotoxicité des Métaux

l'Arsenic

L'arsenic en intoxication aiguë chez l'animal provoque des cytolyses hépatiques . Une fibrose hépatique entraînant une hypertension portale mais n'évoluant pas vers la cirrhose a été observée lors d'intoxication chronique chez des souris (**Lauwerys RR, 1999**)

Le Plomb

Le plomb était traditionnellement utilisé dans le secteur de l'imprimerie. Chez l'homme, les observations d'atteinte hépatique liée à l'intoxication au plomb sont très rares, du fait des mesures de prévention prises. Elles sont pour la majorité anciennes. En 1995, a été rapporté un cas d'hépatite aiguë cytolitique au cours d'un saturnisme. Il s'agissait d'un homme de 27 ans, sans antécédents, ayant été exposé au plomb pendant un mois, Il présentait des douleurs abdominales et une fièvre qui ont conduit à une appendicectomie. Le bilan hépatique était perturbé avec une augmentation des transaminases. (**D'Alteroche L. et all, 1995**).

I.2.4.5. L'hépatotoxicité des Produits industriels

➤ Hydrocarbures aliphatiques halogénés chlorés

✚ Dichlorométhane (Chlorure de méthylène)

Le dichlorométhane est un solvant utilisé dans de nombreuses applications industrielles. chez l'homme, des cytolyses hépatiques ont été observées à la suite d'intoxications aiguës, ont décrit une augmentation sérique des transaminases à plus de 10 fois la normale à la suite d'une intoxication aigue (**Lauwerys RR,1999**).

✚ Trichlorométhane (Chloroforme)

L'utilisation du trichlorométhane ou chloroforme est actuellement très limitée. Le chloroforme n'est plus employé comme anesthésique du fait du risque d'atteinte hépatique et d'hyperexcitabilité cardiaque 92. Chez l'homme, les décès résultant d'une intoxication au chloroforme observent le plus souvent dans des cas de suicides, d'accidents et quelque fois d'homicides. Une nécrose centrolobulaire et une stéatose sont observées lors d'une intoxication aiguë (**Lauwerys RR,1999**)

I.2.4.6. L'hépatotoxicité des médicaments

L'hépatotoxicité induite par les médicaments constitue un problème majeur de santé publique dans la majorité des pays occidentaux, puisqu'elle y représente la principale cause d'insuffisance hépatique aigue . La toxicité est le plus souvent due à la transformation du médicament en métabolite réactif toxique principalement par le cytochrome P450 et ses isoenzymes. Ces métabolites réactifs sont transformés en métabolites aréactif par différents systèmes de protection en particulier la conjugaison au glutathion et les époxydes. Lorsque ces mécanismes sont insuffisants, les métabolites réactifs peuvent se lier de façon covalente sur certains constituants des hépatocytes et entraîner la mort cellulaire ou en déclenchant des réactions immunologiques , Mais cette toxicité est liée à une susceptibilité individuelle constitutionnelle appelée idiosyncrasie (**Keeffe E. B., 2005**)

Tableau 2 : Mécanismes moléculaires pouvant aboutir à une lésion cellulaire hépatique toxique (ils sont souvent multiples et associés pour un même toxique) (Mégarbane B. *et al*, 2007)

Mécanisme	Commentaires et exemples
Formation de liaisons covalentes	Formation d'adduits par liaison d'un toxique ou de son métabolite réactif à des protéines ou autres macromolécules intracellulaires à l'origine de lésions directes (exemple : paracétamol en phase initiale) ou d'une réactivité immunologique (exemple : halothane)
Peroxydation lipidique	Réaction de radicaux libres avec les acides gras polyinsaturés des membranes, à l'origine de troubles de la fluidité, de la perméabilité et de la stabilité des membranes (exemple : tétrachlorure de carbone)
Déplétion en ATP	Découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale (exemple : acide valproïque) ou altération de l'homéostasie calcique cytoplasmique (exemple : fer)
Apoptose	Voies du récepteur au TNF- α /Fas/caspases ou par d'autres cytokines pro-inflammatoires (exemple : paracétamol en phase tardive)
Lésion des organelles intracellulaires	Réticulum (exemple : tétrachlorure de carbone), lysosome (exemple : amiodarone) ou mitochondrie (exemple : hydrazine)
Inhibition enzymatique directe	Blocage d'une enzyme (exemple : amanite phalloïde)
Ischémie	Trouble de l'apport d'oxygène, de nutriments et/ou réduction du débit sanguin hépatique (exemple : cocaïne)

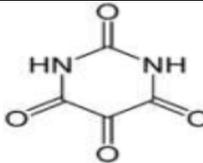
I.3.L'hépatotoxicité de Produit chimique étudié : Alloxane

I.3.1.L'alloxane

I.3.1.1Définition

L'alloxane est un composé organique basé sur un squelette de l'hétérocyclique de la pyrimidine (**Grankvist *et al.*, 1981**). C'est le produit chimique le plus couramment utilisé pour l'induction du diabète expérimental. C'est un agent bien connu largement utilisé pour induire un diabète de type 1 chez les animaux tels que : les lapins, les rats, les souris et les chiens (**Etuk, 2010**). C'est un dérivé de l'urée qui provoque sélectivement une nécrose pancréatique des cellules β des îlots de Langerhans (**Etuk, 2010**).

Tableau 3: Propriétés chimiques d'alloxane (**Hashemi, 2009**).

<p>La Structure chimique:</p>	
<p>Nom chimique: 2, 4, 5,6(1H, 3H)-pyrimidine tétraone monohydrate.</p>	
<p>La formule chimique: C₄H₂N₂O₄</p>	
<p>Masse moléculaire: 160,09 g/mol.</p>	
<p>Point de fusion: 253°C.</p>	

I.3.1.2.Historique

En 1818, le Brugnatelli italien a obtenu une substance à partir de l'oxydation de l'acide urique qu'il nommé ossieritrico. Ce nom, du grec « à faire rouge», fait référence à la propriété de la substance pour colorer la peau une couleur rouge caractéristique (**Lenzen *et al.*, 1996**).

L'alloxane resté uniquement dans le domaine de la pharmacie jusqu'en 1943, lorsque Dunn *et al.*, ont signalé que cette substance provoque une nécrose des îlots pancréatiques lorsqu'il est administré à des lapins ou des rats (**Lenzen *et al.*, 1996**). L'alloxane est sélectivement toxique pour les cellules β du pancréas, ce qui provoque le diabète chez les animaux de laboratoire. Cette substance est alors devenue d'un grand intérêt pour les diabétologues, devenant un outil standard pour l'induction du diabète chez les animaux (**Lenzen *et al.*, 1996**)

I.3.1.3.Mode d'action

L'alloxane, par une analogie structurale au glucose, pénètre à travers les transporteurs de glucose GLUT2 des cellules β pancréatiques. Au cytosol, l'Alloxane est réduit en acide dialurique. Cette réduction est assurée par plusieurs agents tels que le glutathion réduit, la cystéine, l'acide ascorbique et les groupements SH des protéines (**Diniz,2008**)

L'alloxane a un groupe 5 carbonyles centraux qui réagissent très avidement avec des groupes thiol. La glucokinase est l'enzyme thiol le plus sensible de la cellule β . À des concentrations élevées, l'alloxane peut inhiber nombreuses enzymes fonctionnellement importants, ainsi que d'autres protéines et fonctions cellulaires (**Kebièche ,2011**) . L'alloxane se relie avec deux groupements thiol du site actif de la glucokinase formant un pont disulfure et inactivant l'enzyme (**Lenzen *et al.*, 1988**). L'inhibition de la glucokinase, réduit l'oxydation du glucose et la génération de l'ATP, ce qui supprime le signal d'ATP, qui déclenche la sécrétion d'insuline. L'inhibition de la glucokinase est atteinte en 1 min d'exposition à l'alloxane. Cet effet peut être expliqué par une réduction initiale de la consommation d'ATP, résultante d'un blocus de la phosphorylation du glucose par la glucokinase, ce qui produit une augmentation transitoire de l'ATP dans la cellule β et déclenche une libération transitoire de l'insuline (**Lenzen, 2008**). L'acide dialurique formé est ré-oxydé en alloxane, ce qui génère des espèces réactives oxygénées et active à la réaction de Fenton (**Ankur et Shahjad, 2012**). L'alloxane inhibe la sécrétion de l'insuline glucose-dépendante et augmente la perméabilité des membranes des cellules β (voir figure 12 et 13) (**Watkins *et al.*, 1964**)

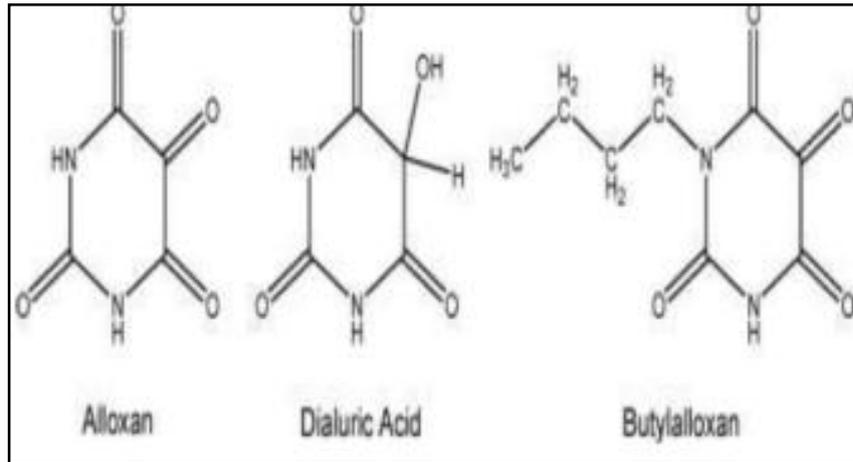


Figure 12: Formules chimiques de l'Alloxane, l'acide dialurique et butyl-alloxane (Grankvist *et al.*, 1981).

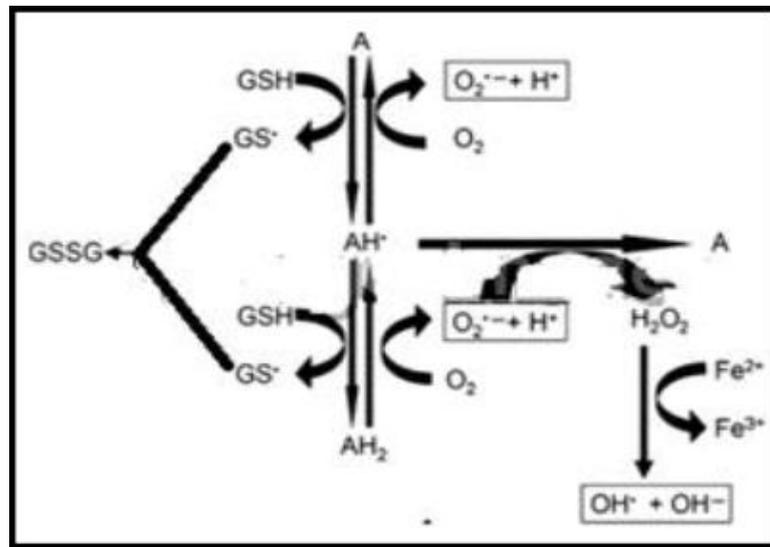


Figure 13: Réactions redox cyclables entre l'acide dialurique et l'alloxane (Lenzen, 2008).

En outre, la perturbation de l'homéostasie de calcium intracellulaire, également été signalé à constituer une étape importante dans l'action diabétogènes de l'alloxane. Il a été noté que l'alloxane cytosolique libre augmente la concentration du Ca^{2+} dans les cellules β pancréatique. L'afflux de calcium est entraîné la capacité de l'alloxane de dépolariiser les cellules β du pancréas, qui s'ouvre en outre tension les canaux calciques voltage-dépendants et améliore l'entrée du calcium dans des cellules pancréatiques. La concentration accrue d'ion Ca^{2+} contribue davantage à supra-physiologique la libération d'insuline qui avec ERO a été noté finalement causer des dommages des cellules β des îlots pancréatiques (Ankur et Shahjad, 2012).

L'alloxane exerce son action diabétogène quand il est administré par voie parentérale: intraveineuse, intra péritonéale ou sous-cutanée. La dose requise de l'alloxane pour induire un diabète dépend de l'espèce animale. Les îlots de l'espèce humaine sont nettement plus résistants à l'alloxane que ceux du rat et de la souris. La dose intra-péritonéale inférieure à 50 mg / kg en poids brut peut être insuffisante pour induire un diabète chez le rat. Animaux à jeun sont plus sensibles à l'alloxane, alors que l'augmentation du glucose dans le sang fournit une protection partielle (**Szkudelski, 2001**)

CHAPITRE II

Le Stress oxydatif

II. Les stress oxydatifs

II.1. Définition

Le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes donc c'est un déséquilibre de la balance antioxydants/prooxydant en faveur des pro-oxydants. Se définit aussi comme un état dans lequel le niveau de l'oxygène réactif toxique intermédiaires surmonte les défenses antioxydantes endogènes de l'hôte ; Il se développe lorsque il y a une surproduction des radicaux libres et un déficit en antioxydantes, c'est-à-dire les molécules oxydants sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme, donc l'origine du stress oxydatif sont les radicaux libres principalement(**Koppenol., 2001**)

II.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe et capable d'existence indépendante (**Leverve et al., 2001**). Ils sont paradoxalement indispensables au maintien de la vie cellulaire et jouent un rôle important dans la lutte contre les infections (**Tessier et Marconnet., 1995**). Les radicaux libre sont produit par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes: phagocytose, chaîne respiratoire mitochondriale, cellules endothéliales, cellules micro gliales, métaux lourds, rayonnements ultraviolets ou ionisants, oxydation dans l'organisme des catécholamines, des pesticides ou certains médicament...etc (**Leverve et al., 2001**). Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN) (**Delattre et al., 2005**). Dans les cellules, On peut distinguer les radicaux primaires qui jouent un rôle particulier en physiologie. Les autres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le radical hydroxyle OH^{\cdot} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\cdot} (**Favier., 2003**). Généralement les espèces réactives de l'oxygène ERO sont divisées en :

- -Des radicaux oxygénés caractérisés par un électron non apparié (l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, les radicaux hydroxyles HO^{\cdot} , peroxyde ROO^{\cdot} , alkoxyde RO^{\cdot}).

- Des dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, l'oxygène singulet ¹O₂ et le nitroperoxyde (ONOOH) mais qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Favier., 2003).

Il existe plusieurs types des espèces réactives de l'azote (tableau 2).

Tableau 04:Espèces réactives de l'azote(ERN) (Halliwell., 1996).

Radicalaire	Non radicalaire
Oxyde nitrique NO•	Acide nitreux (HNO ₂)
Dioxyde d'azote NO ₂ •	Tétraoxyde de diazote (N ₂ O ₄)
	Trioxyde d'azote (N ₂ O ₃)
	Peroxydinitrite (ONOO ⁻)
	Nitroperoxyde(ONOOH)
	L'ion nitronium (NO ₂ ⁺)

En effet, les EOA produites en permanence dans l'organisme et exercent deux types d'action: des effets physiologiques, ils sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie cellulaire prolifération cellulaire normale, métabolisme normal, état redox normal pour l'expression de gènes ou de la défense de l'organisme(Defraigne et Pincemail.,2007), et des effets délétères affectant différentes macromolécules et pouvant s'accumuler avec l'âge pour conduire à des pathologies et aux manifestations du vieillissement (Barouki ., 2006).

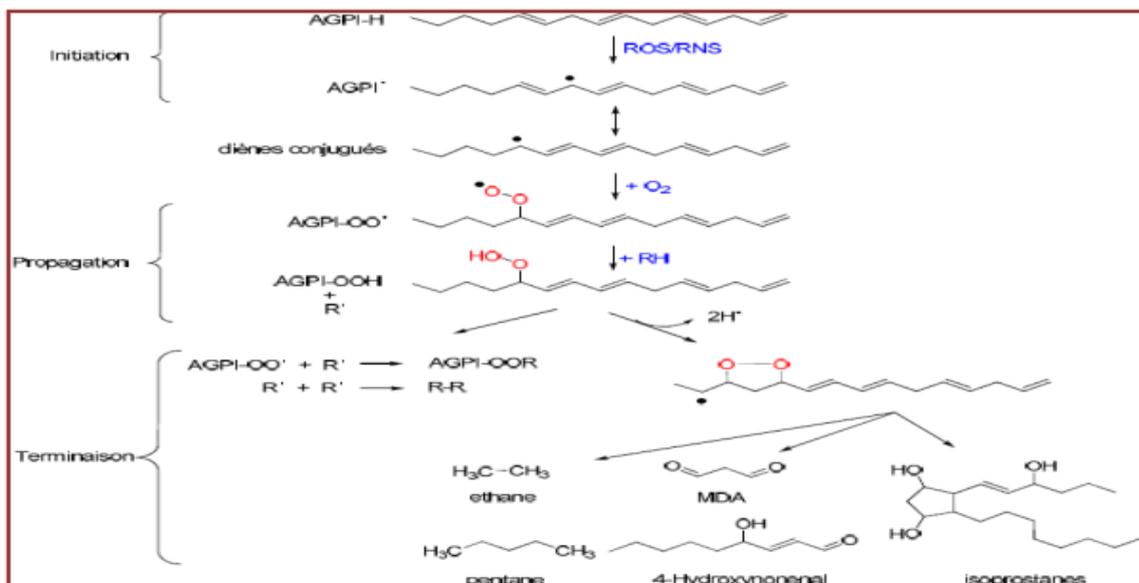


Figure 14:Origine des différents radicaux libres oxygénés(Hazout et al., 2008).

II.3. Les conséquences du stress oxydatif

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides, l'acide désoxyribonucléique et glucides. (**Favier, 2003**)

II.3.1. Oxydation des lipides

Les lipides et précisément leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les EOR, réaction appelée peroxydation lipidique. Ses conséquences seront différentes:

- ❖ L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation des LDL oxydées, qui captées par des macrophages forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (**Durand et Beaudoux.,2011**).
- ❖ L'attaque des phospholipides membranaires entraîne la perte d'acides gras polyinsaturés, modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier., 2003**).

La première étape, dite d'initiation consiste en l'arrachement par le radical libre d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène (-CH₂-) surtout s'il est adjacent à deux double liaisons (**Girotti ., 1998**). La phase de propagation débute lorsqu'une molécule d'O₂ attaque le radical acide gras (AGPI•) pour former un radical peroxy (AGPI-OO•) qui peut arracher un H• à un autre donneur RH et créer un nouveau radical, qui s'oxydera et ainsi de suite (**Sivanandham., 2011**). La phase de terminaison consiste en la recombinaison de deux radicaux pour former des composés plus ou moins stables. Du fait de leur instabilité, les peroxy (AGPI-OO•) issus des AGPI se décomposent et libèrent de nombreux produits tels que des aldéhydes (malonate-dialdéhyde, 4-hydroxynonéal ...) (**Durand et Beaudoux., 2011**)

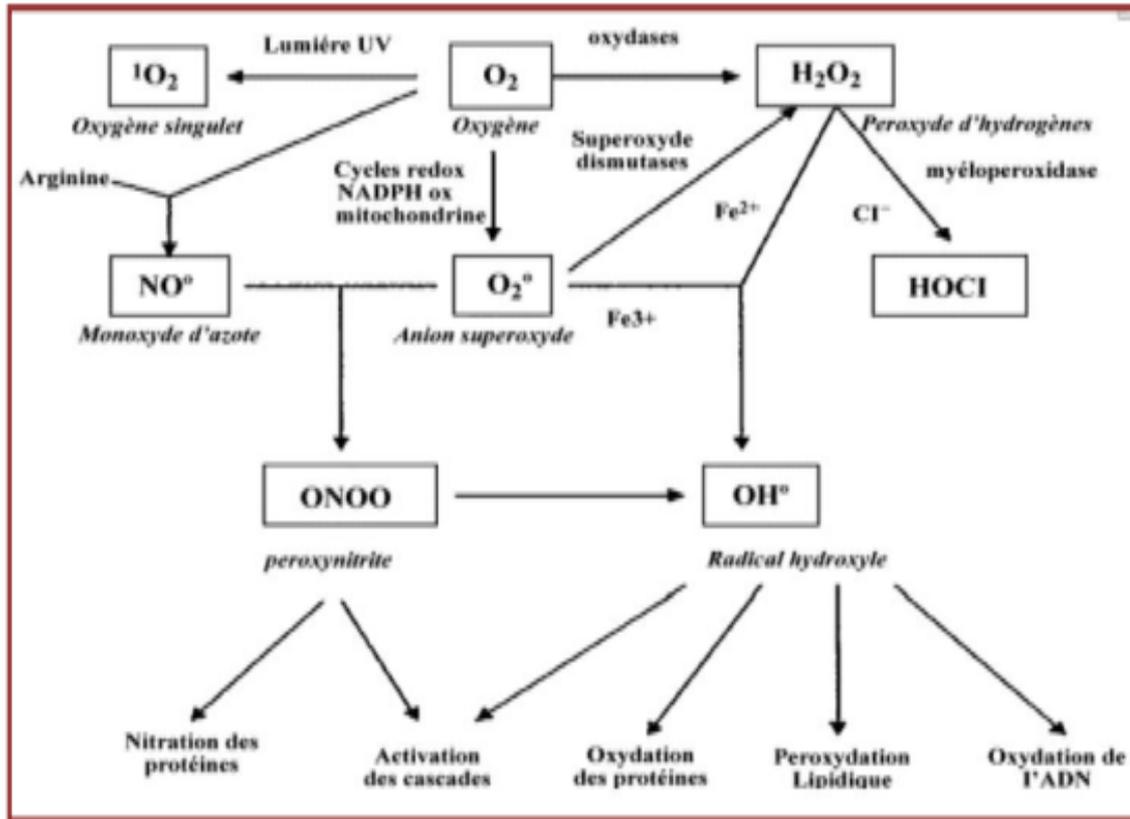


Figure 15: Peroxydation des acides gras polyinsaturés (Toussaint *et al.* 2003).

II.3.2. Oxydation de l'ADN

Les dommages oxydatifs à l'ADN peut être le plus dangereux pour la cellule car il affecte le cycle cellulaire et conduit à des mutations et le cancer. L'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) à 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG), qui a finalement conduit à GC → TA transversions lors de la réplication de l'ADN suite. Altération de l'ADN a été suggérée d'être responsable en partie dans les processus de vieillissement, le diabète sucré, les maladies inflammatoires et les maladies du foie (Floyd., 1990).

II.3.3. Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines par ROS / RNS peut produire une gamme de produits stables ainsi que réactifs tels que les hydroperoxydes de protéines qui peuvent générer des radicaux supplémentaires en particulier lors de l'interaction avec des ions de métaux de transition. Bien que la plupart des protéines oxydées qui sont fonctionnellement inactifs soient rapidement retirés, certains peuvent progressivement s'accumuler avec le temps et de contribuer ainsi aux dommages liés au vieillissement ainsi que diverses maladies (Devasagayam *et al.*, 2004).

II.3.4. Oxydation des glucides

Le glucose peut s'oxyder dans conditions physiologique en présence de traces métalliques en libérant des cèto-aldéhydes, H_2O_2 et $OH\cdot$. Son oxydation entraine la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cèto-aldéhyde. Les protéines glyquées extraites du sérum de bœuf présentent un grand nombre de résidus tryptophanes oxydes, témoignant d'une atteinte radicalaire (Hunt et Wolf., 1991).

II.4. Systèmes de défense antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO (Favier.,2003). Il existe une quantité innombrable d'antioxydants et ceux-ci peuvent être non enzymatiques ou enzymatiques (You et al., 2003).

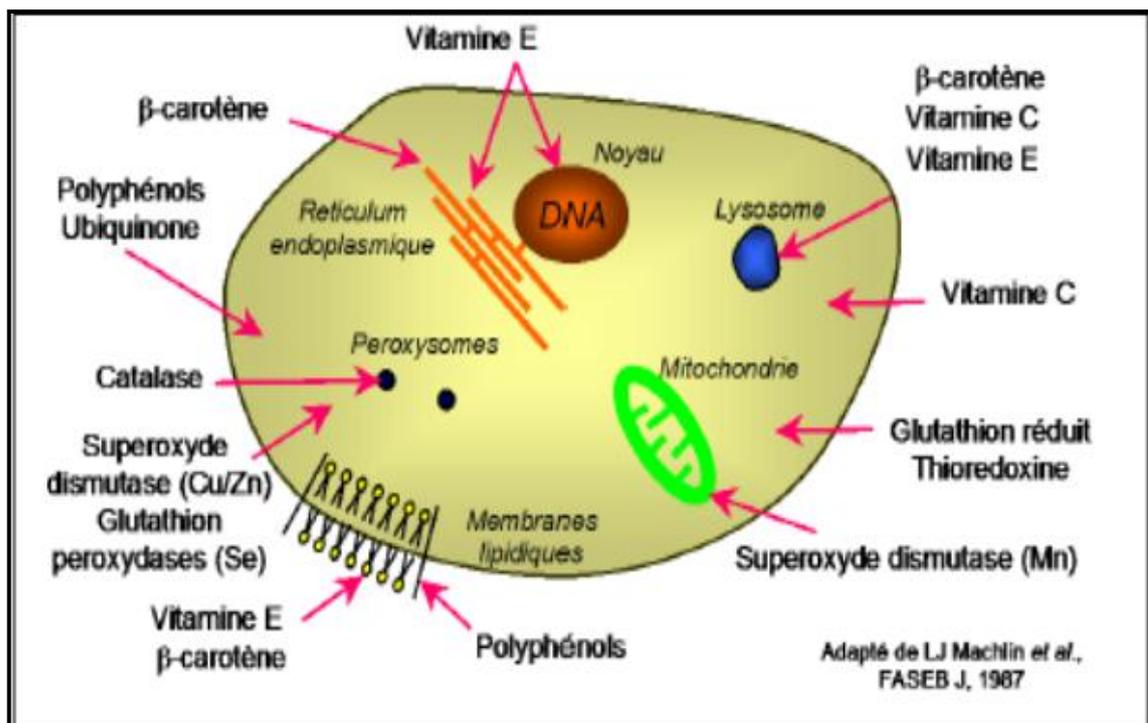


Figure 16 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Mn-SOD) : superoxyde dismutase mitochondriale, (Cu/Zn-SOD) : superoxyde dismutase cytosolique, (GPx) : glutathion peroxydase, (GSH) : glutathion réduit (Garait., 2006).

II.4.1. Antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques reposent sur superoxyde dismutase SOD, catalases et glutathion peroxydases (**Leverve., 2009**).

II.4.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

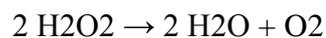
Superoxyde dismutase (Ec1,15,1,1)est une metalloenzyme qui dismute l'anion superoxyde(O₂•-) en oxygène moléculaire O₂et peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (**Faraci et Didion., 2004**)



Chez l'homme, trois isoformes de la superoxyde dismutase (SOD): cytosolique ou SOD cuivre-zinc (CuZn-SOD), et une forme extracellulaire de CuZn-SOD (EC-SOD),qui utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, et SOD manganèse (Mn-SOD) localisée dans les mitochondries(**Afonso et al., 2007**).

II.4.1.2.Catalases

Catalase (Ec 1,11,1,6 ; H₂O₂ oxydoréductase) joue un rôle important dans les voies de défense antioxydantes (**Linford et al., 2006**).C'est un tétramère localises surtout dans les peroxysomes, dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et le protège contre l'inactivation (**Kirkman et al.,1999**), et il agit en tant que catalyseur dans la décomposition de H₂O₂ en eau et oxygène moléculaire (**Goudable et Favier., 1997**).



II.4.1.3.Glutathion peroxydase (GPx)

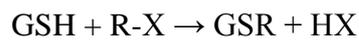
Les Glutathion peroxydases(GPx) sont des enzymes(EC 1.11.1.9) tétramériques à sélénium localise dans le cytosol ainsi que dans la mitochondrie (**Lacolley., 2007**). La glutathion peroxydase (GPx): détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques. La réduction de ces dérivés réactifs est couplée avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR) a pour rôle la régénération de GSH à partir du GSSG tout en présence du cofacteur NADPH (**Sorge., 2004**).

II.4.1.4. Glutathion réductase

La glutathion réductase (GSSG-Red) régénère le glutathion réduit à partir du GSSG tout en utilisant le NAD(P) H comme cofacteur (**Deaton *et al.*,2003**), est localisée avec la glutathion peroxydase, réduit le GSSG en GSH. Elle se trouve dans le cytosol et les mitochondries (**Butterfield *et al.*, 2002**).

II.4.1.5. Glutathionne-S-transférase

Glutathion S-transférase (GST EC 2.5.1.18) est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (**Renuka *et al.*, 2003**). La glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (**Zhihua *et al.*, 2004**).L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



II.4.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les EOR comme les vitamines C et E, les polyphénols,...etc (**Leverve., 2009**). Aussi, le maintien de ces systèmes enzymatiques nécessite la présence d'un certain nombre d'oligoéléments : cuivre, manganèse, zinc et sélénium en particulier (**Jacotot., 1994**).

II.4.2.1. Vitamine E

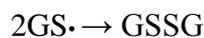
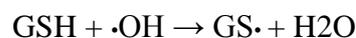
La vitamine E est regroupée la famille des tocophérols (α , β , δ , γ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls α et δ tocophérols possèdent les propriétés antioxydants les plus intéressantes Il agit aussi par au moins deux mécanismes différents : directement piège ROS et régleme antioxydant enzymes telles sont GPX, CAT de foie, SOD, GST, GR et activités quinone réductase (DT-diaphorase) (**Vertuani *et al.*, 2004**).

II.4.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO• ou O₂•-(et leur forme protonée HO₂•), ce qui est tout à fait remarquable puisque ces derniers sont connus pour être très peu réactifs. Elle peut recycler l'α-tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides (**Gardes-Albert *et al.*, 2003**).

II.4.2.3. Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion est un tripeptide (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) (**Li *et al.*, 2005**), joue un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydoréduction. En fait, le GSH participe à l'élimination du H₂O₂ et des LOOH, en servant de co-substrat à l'enzyme GSH-Px (**FERRARI *et al.*, 1991**). Le GSSG formé par cette première réaction est à nouveau réduit en GSH par la GSH réductase, une enzyme qui utilise le NADPH comme cofacteur. Le GSH peut inhiber la peroxydation des lipides et s'avère efficace comme piègeur direct de certains ERO, tels les radicaux OH• et l'oxygène singulet ¹O₂ (**Halliwell., 1996**). Il est antioxydant par son caractère nucléophile et radicalaire :



II.4.2.4. Oligo-éléments

Ces oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres (l'homéostasie radicalaire). Parmi ces oligo-éléments, le zinc, le sélénium, le cuivre...ect, ont une action définie (**Favier et Hininger-Favier., 2005**).

II.4.2.4.1. Zinc

Le zinc (Zn) joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn SOD (**Powell., 2000**). Le zinc inhibe la production des espèces radicalaires de l'oxygène ERO par les métaux de transitions (**Favier et Hininger-Favier., 2005**), en entrant en compétition avec le fer et le cuivre dans la réaction de Fenton. Il protège les groupements thiols (SH) des protéines contre l'oxydation induite par le fer, en empêchant la formation de ponts disulfure intramoléculaires. L'activité antioxydant du zinc pourrait également passer par l'induction de metallothionéines pouvant piéger les ERO (**Delattre *et al.*, 2005**).

II.4.2.4.2.Sélénium

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes, et à l'activité biologique anti-radicalaire des sélénoprotéines (Burk., 2002).

II.4.2.4.3.Cuivre

Le cuivre est un oligo-élément indispensable, essentiel dans de nombreuses réactions enzymatiques et dans la synthèse de neurotransmetteurs (Trocello *et al.*, 2010). Il est un Cofacteur de divers enzymes à activité antioxydant. Elément catalyseur pour efficacité de la SOD (De Moffarts *et al.*, 2005).

II.4.2.5. Polyphénols

Les polyphénols sont des antioxydants ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyl, superoxyde et peroxy. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre *et al.*, 2005).

CHAPITRE III

Marrubium vulgare

III. *Marrubium vulgare*

III.1. Définition

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des lamiacées, comprenant plus de 30 espèces différentes largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie (Boudjelal et al,2012).

Marrubium vulgare en Arab est connue par le nom Marrioua (Al kadi, 1989) Au Maroc c'est Merrîwt (Novak et al, 1966), un autre en Tunis Marroubia (Bellakhdar, 1997), en français : Marrube blanc et en Anglais : Harehound, En Italien : Marrubbio (Quezel et Santa, 1962, 1963)



Figure 17: *Marrubium vulgare*(Novak et al, 1966)

III.2. Classification botanique : Selon (APG III).

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

III.3. Description morphologique

Le marrube blanc est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 80 cm de hauteur, à tige quadrangulaire cotonneuse. Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies, à limbe crénelé sur les bords sont blanchâtres et duveteux sur la face inférieure. Les fleurs petites de 12 à 15 mm de long, blanches, avec un calice à dents crochues sont groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles. Le fruit est un tétra-akène. Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère (**Aouadhi, 2010**).

III.4. Composition chimique

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires tels que les diterpènes dont la marrubine responsable de la majorité des propriétés biologiques du *Marrubium vulgare* (**Çitoğlu et Aksit, 2002**). Les flavonoïdes (apigénine et lutéoline) .(**Nawwar et al,1989**), ainsi que plusieurs phénylpropanoïdes esters tels que les verbascosides (**Papoutis et al,2006**)

III.5. Répartition géographique

Cette plante est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe en dehors de l'extrême Nord, Australie et New Zélande (**Baba aïssa, 1999**). Elle se trouve aussi au Maroc et en Tunisie, surtout en région méditerranéenne (**Bonnier, 1990**)

III.6. Utilisations de la plante

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antidiabétique, diurétique et en cas d'infections respiratoires. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité (**Dellile, 2007**). Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmées par des essais scientifiques . (**Masoodi et al, 2008**) ; le marrube blanc est considéré comme antidiabétique. (**Boudjelal et al,2012**)

III.7. Toxicité

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

DEUXIEME PARTIE

Matériels et Méthodes

L'étude suivante a été menée dans le but de vérifier l'hypothèse suivante: l'effet de *Marrubium vulgare* sur la toxicité hépatique induite par l'alloxane.

Le but de cette étude est d'évaluer, chez des rattes, les variations des paramètres biochimiques sanguins, enzymes anti oxydantes tissulaires, les produits de la peroxydation lipidique, avec traitement par l'alloxane, avec traitement par différentes doses de *Marrubium vulgare*

I. Matériels

I.1. Matériels végétales *Marrubium vulgare*

I.1.1. Récolte de *Marrubium vulgare*

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est la partie aérienne de plants *Marrubium vulgare* récoltée au mois de Octobre 2017 dans la Wilaya de Souk Ahras. Après la récupération de plante, les feuilles sont lavé puis séchés à l'air libre et à l'ombre pendant 15 jours, afin de préserver au maximum l'intégrité de sa composition chimique, ces parties sont soumis à différentes méthodes d'extraction aux solvants organiques.



Figure 18 : la plante *Marrubium vulgare* (photo originale)

I.2. Matériels Animale

Le matériel animal choisi est le rat blanc de sexe féminin et d'une type *Wistar (Rattus norvegicus alvinus) Albinos*, provenant de l'institut Pasteur d'Alger (centre d'élevage EL-Kouba, Alger) (fig. 19). A leur arrivées, ces rattes pesaient entre 150 et 160 grammes, et au début de l'expérimentation, ils pesaient en moyenne 229.3 grammes.



Figure 19 : Rattes blanche de la souche *Wistar Albinos* (photo originale)

I.2.1.condition d'élevage

Les rats sont élevés dans un cages en matière plastique. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours. Les rats sont acclimatés pendant six semaines aux conditions de l'animalerie au niveau de la faculté des sciences de la nature et la vie à l'université Echahid Hamma Lakhdar d'EL-OUED, à une température ambiante et un taux humidité 64.5% avec un cycle photopériodique de 12 heures de lumière/obscurité. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture.

I.3.Etude l'effet d'extrait de *Marrubium vulgare*

I.3.1.Induction du l'hépatotoxicité

Après une mise à jeun pendant une nuit (privation de la nourriture pendant 16 heures mais pas de l'eau). L'hépatotoxicité a été induite par injection intrapéritonéale de l'alloxane monohydrate (98%) (Sigma-Aldrich, USA) dissous a une solution de chlorure de sodium à 0.9 % stérile avec une dose de 120 mg/kg pc. Après l'injection, les biberons d'eau ont été remplacés par des bouteilles contenant une solution de glucose 5% pendant 24 heures afin de surmonté l'hypoglycémie induite par l'alloxane à la destruction des cellules β pancréatiques et la libération massive d'insuline. Cette hypoglycémie peut être fatale pour les rattes. Pour les témoins, un volume équivalent de chlorure de sodium à 0.9 % a été administré par voie intrapéritonéale.

I.3.2 Traitement des souris

Après une période d'adaptation de 15 jours nous avons commencé le traitement. Ces rattes sont été répartir en six (06) lots égaux à raison de cinq (05) rats par lot, il s'agit:

Lot I ou Témoin sain (T): rattes témoins ont reçu quotidiennement une eau physiologique par gavage gastrique pendant 21 jours.

Lot II Traité par (MV): rattes ont reçu par gavage gastrique à une dose de 100 mg/ kg pc/j de MV pendant 21jours.

Lot III (A) : rattes ont reçu une dose unique d'alloxane ($C_4H_4N_2O_5$), de 120 mg/kg pc par injection intra péritonéale (**Rotruck et al., 1973**).

Lot IV(A+MV₁₀₀): rattes ont reçu une injection intra péritonéale d'alloxane à une dose unique de 120 mg/kg (**Rotruck et al., 1973**), puis un traitement par le MV à une dose de 100 mg/kg pc/j par gavage gastrique pendant 21 jours.

Lot V(A+MV₂₀₀):: rattes ont reçu une injection intra-péritonéale d'alloxane à une dose unique de 120 mg/kg (**Rotruck et al., 1973**), puis un traitement par le MV à une dose de 200 mg/kg pc/j par gavage gastrique pendant 21 jours.

Lot VI (A+MV₄₀₀): rattes ont reçu une injection intra péritonéale d'alloxane à une dose unique de 120 mg/kg (**Rotruck et al., 1973**), puis un traitement par le MV à une dose de 400 mg/kg pc/j par gavage gastrique pendant 21 jours.

I.3.3. Sacrifices et prélèvements d'organes

Les rattes sont anesthésiées par chloroforme (94%) après 16h de jeûne et sont sacrifiés (par décapitation). Au moment du sacrifice, le sang est collecté sur des tubes secs pour les analyses biochimiques .Après, centrifugation du sang à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Le sérum est utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques(TGO, TGP, phosphatase alcalin, bilirubine totale, γ GT)

Après la dissection, le foie est soigneusement prélevé, rincé avec l'eau physiologique 0.9% (0.9g de NaCl dissout dans 100 ml d'eau) , et ensuite pesés. Une partie dorgane est utilisé pour la préparation de l'homogénat et l'autre est conservé dans le formol de 10% pour faire des coupes histologique. Lhomogénat de foie est utilisée pour le dosage des paramètres du stress oxydatif (protéines, glutathion, MDA, catalase).

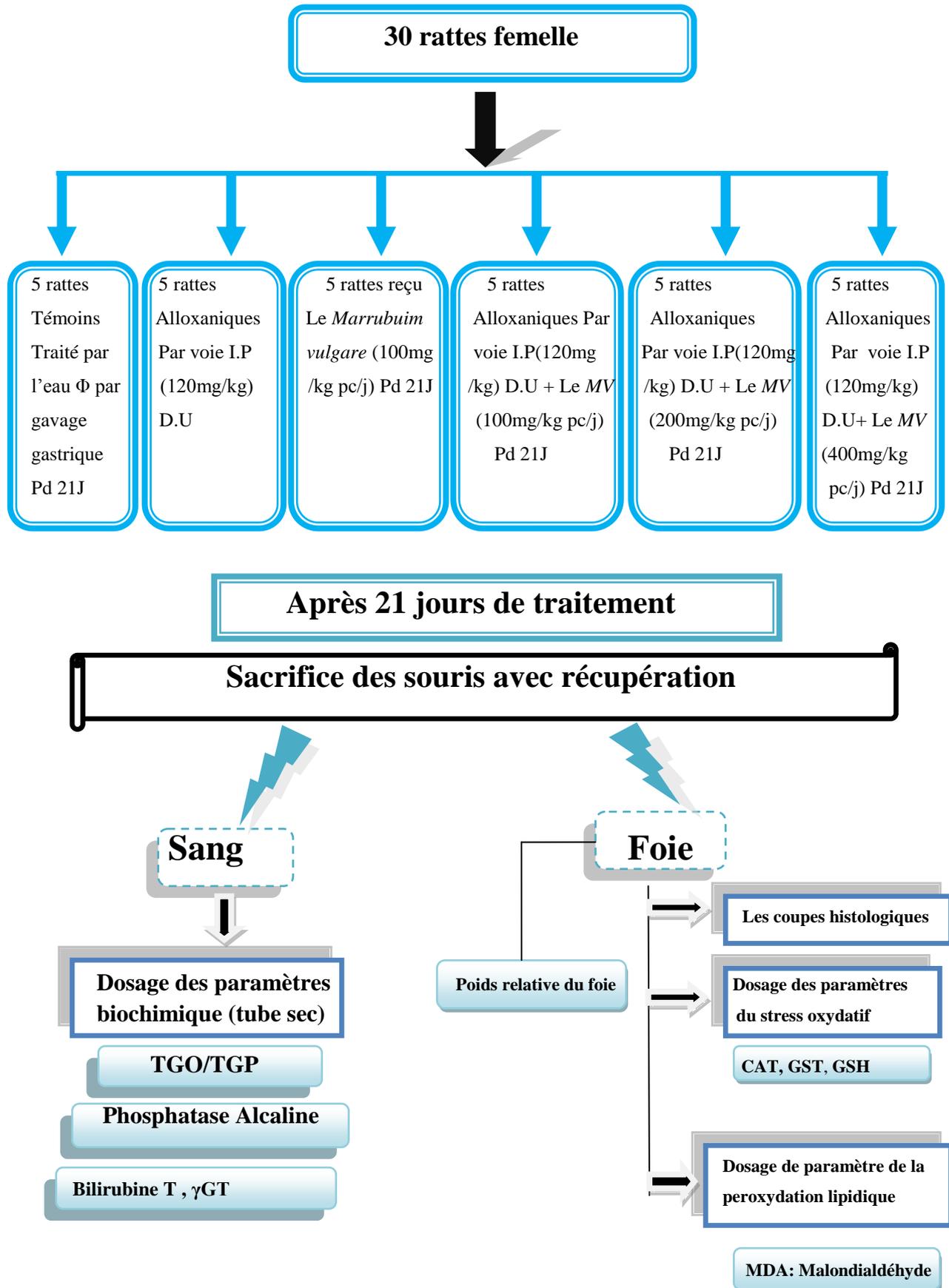


Figure 20: Schéma récapitulatif de protocole expérimental.

I.4. Produits chimiques

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: $AlCl_3$; magnésium; Folin Ciocolteu; 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH); acide ascorbique; acide galique; acide sulfurique (H_2SO_4); $FeCl_3$; acide acétique; acétate de sodium; alloxane; acide trichloroacétique (TCA); Acide thiobarbiturique (TBA); acide salicylique; butylhydroxytoluène (BHT); acide dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) = réactif Ellman; glutathion réduit (GSH); tris; NaCl; bleu de comassie; sérum albumine bovin (SBA); acide phosphorique (H_3PO_4); eau oxygénée (H_2O_2); méthanol; chlorure d'hydrogène (HCl); liqueur de Fehling; Méthanol ; Chloroforme ; réactif de Mayer ; le réactif de Wagner.

Les Kit de réactif de bilirubine totale, les kit de réactif de protéine γ GT, les kits des réactifs de TGO et TGP et PAL, sont achetés du SPINREACT (Espagne).

I.5. Matériels du laboratoire

- ❖ Centrifugeuse horizontale de type SIGMA.
- ❖ Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240.
- ❖ Étuve de type MEMMERT.
- ❖ Évaporateur rotatif de type Büchi Rotavapor R- 200.
- ❖ Agitateurs magnétiques à plaque chauffante.
- ❖ Bain-marie de type MEMMERT.
- ❖ Balance électrique de type KERN EMB 2200-O.
- ❖ Balance analytique de type KERN ABJ/ABS.
- ❖ Microscope optique de type OPTIKA lié à un appareil photo.
- ❖ Micropipette
- ❖ Hown
- ❖ Verreries(bücher, erlenmeyer, éprouvette, tubes à essai, Pipette graduée...).

II. Méthodes

II.1. Préparation d'extrait aqueux

20g de poudre des feuilles de *Marrubium vulgare* dissous dans 300 ml d'eau distillée chaude à macérer pendant 24h à température de la chambre, Après filtration sur un tissu mousseline, puis sur papier filtre, ce filtrat a ensuite été évaporé à sec sous pression réduite à $65^\circ C$ à l'aide d' un évaporateur rotatif. (Majhenic *et al.*, 2007)

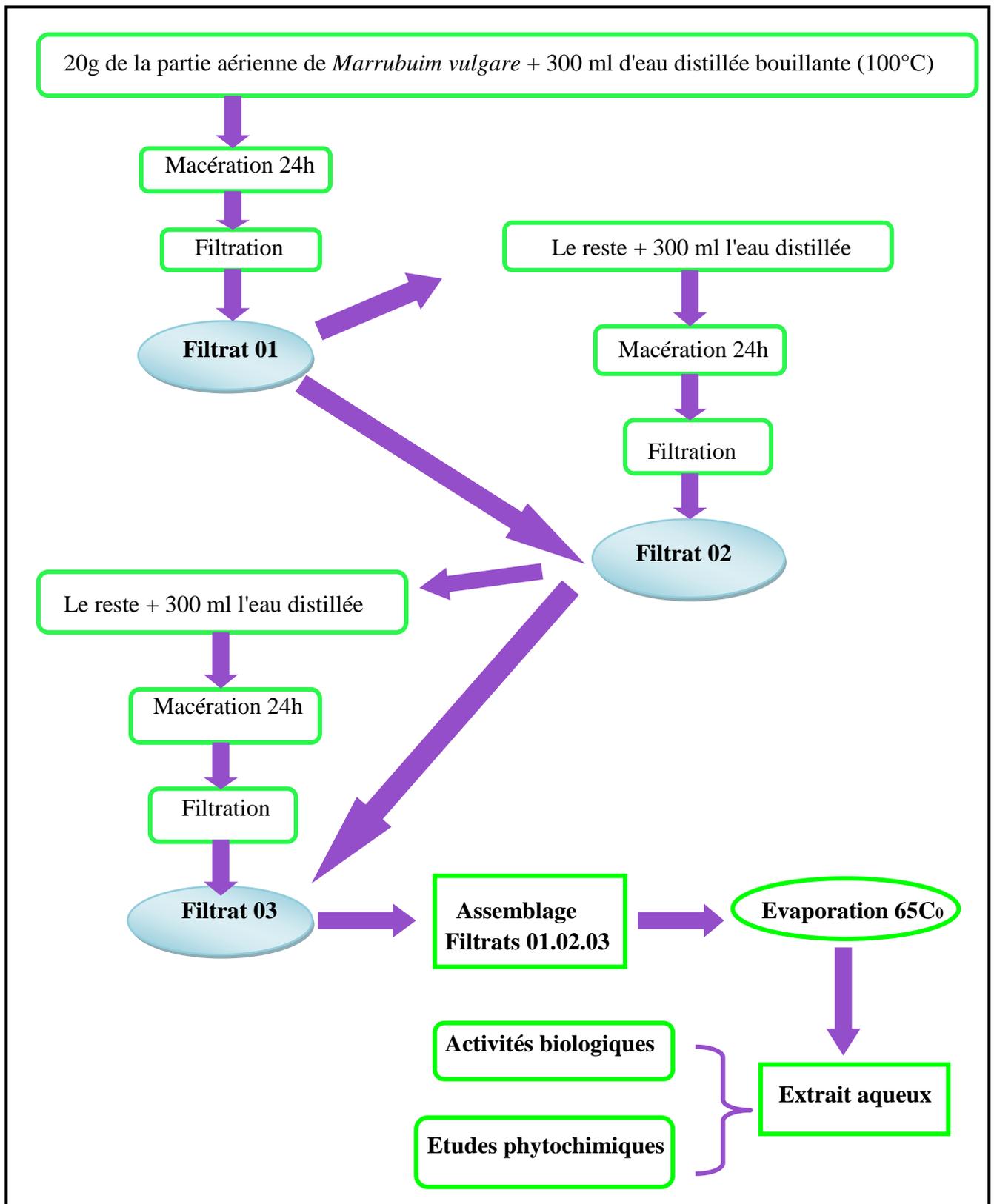


Figure 21: Protocole de préparation de l'extrait aqueux de la *Marrubium vulgare*.

II.2. Calcul des rendements en extrait sec

Le rendement de la plante en extrait est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de la plante à traiter (**Harborne, 1998**). Le rendement qui est exprimé en pourcentage a été calculé par la formule suivante:

$$\text{Rdt \%} = [\text{PE} / \text{PA}] \times 100$$

Où

R = Rendement de l'extrait en pourcentage;

P_E = Poids de l'extrait en gramme ;

P_A = Poids de la plante en gramme.

II.3. Tests phytochimiques

Les extraits de chacune des plantes ainsi obtenus, sont soumis à des tests phytochimiques spécifiques permettant de mettre en évidence la présence ou l'absence de leur principaux constituants, utilisant les méthodes classiques décrites précédemment par (**Harborne, 1998**). Ces tests de caractérisations sont réalisés sur d extrait sec remis en solution dans l'eau.

❖ Les flavonoïdes

A 5 mL d'extrait, sont ajoutés 2 à 3 gouttes d'HCl concentré et quelques copeaux de tournures de magnésium. La présence de flavonoïdes est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge, orange ou rose (**Athamena ,2009 ; Benzahi, 2001**).

❖ Les alcaloïdes

Ajouter 5 mL d'acide chlorhydrique (1%) à 1 mL d'extrait, le mélange est incubé au bain marie pendant 10 minutes, puis la solution obtenue est divisée en deux parties. Dans un tube le réactif de Mayer est ajouté et dans l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes (**Bruneton, 1993**).

❖ **Les tanins**

A 2 mL d'extrait sont additionnés 2 ou 3 gouttes FeCl₃ (1%). L'apparition d'une couleur verte-noire indique la présence des tanins catéchiques, et la couleur bleu-noire indique la présence des tanins galliques (**Badiaga, 2011**).

❖ **Les terpénoïdes**

A 5 mL d'extrait on ajoute 2 mL de chloroforme puis on ajoute 1 à 2 mL de l'acide sulfurique concentré, la présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase (**Chebrouk, 2009**).

❖ **Les saponosides : Test de mousse**

A 1 mL d'extrait est ajouté 2 mL d'eau chaude, après agitation (2 min) l'apparition d'une mousse persistante plus de 5 min, indique la présence de saponosides (**Makhloufi, 2013**).

❖ **Les composés réducteurs**

A 1 mL d'extrait dans un tube, sont ajoutés 2 mL de liqueur de Fehling (1ml réactif A et 1ml réactif B) et mis à incuber l'ensemble pendant 8 min dans un bain-marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs (oses, holosides, mucilages) (**Boual, 2009**).

II.4. Détermination des teneurs en principes actifs

II.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits est réalisé par la méthode de Singleton et Ross en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Ghouini, Lamini, 2015). Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolibdique (H₃PMo₁₂O₄₀), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption environs 750- 765nm (**Bonnaillie et al., 2012**).

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits phénoliques a été déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu. A 200µl de chaque solution d'extrait est ajoutée 1ml de réactif de Folin Ciocalteu (1/10) puis 0,8ml d'une solution de bicarbonate de sodium (7,5%) a

été ajoutée. Après 30min, le contenu phénolique a été mesuré à 765nm avec UV-Vis spectrophotomètre (Vuorela, 2005).

La courbe d'étalonnage a été réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations (50 -500mg/ml), dans les mêmes conditions de dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg d'EAG/g). Toutes les mesures sont répétées 3 fois (Bonnaillie et al., 2012).

II.4.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes des extraits ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996); 1 ml de chaque échantillon (préparés dans l'eau distillée ou dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la quercétine (0-50 mg/ml), a été préparée dans le méthanol et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine par gramme du poids d'extrait (mg EQ / g).

II.5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits par la méthode de DPPH (effet scavenger)

L'activité anti-radicalaire des différents extraits a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune (fig. 21), en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Cuendet et al., 1997). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

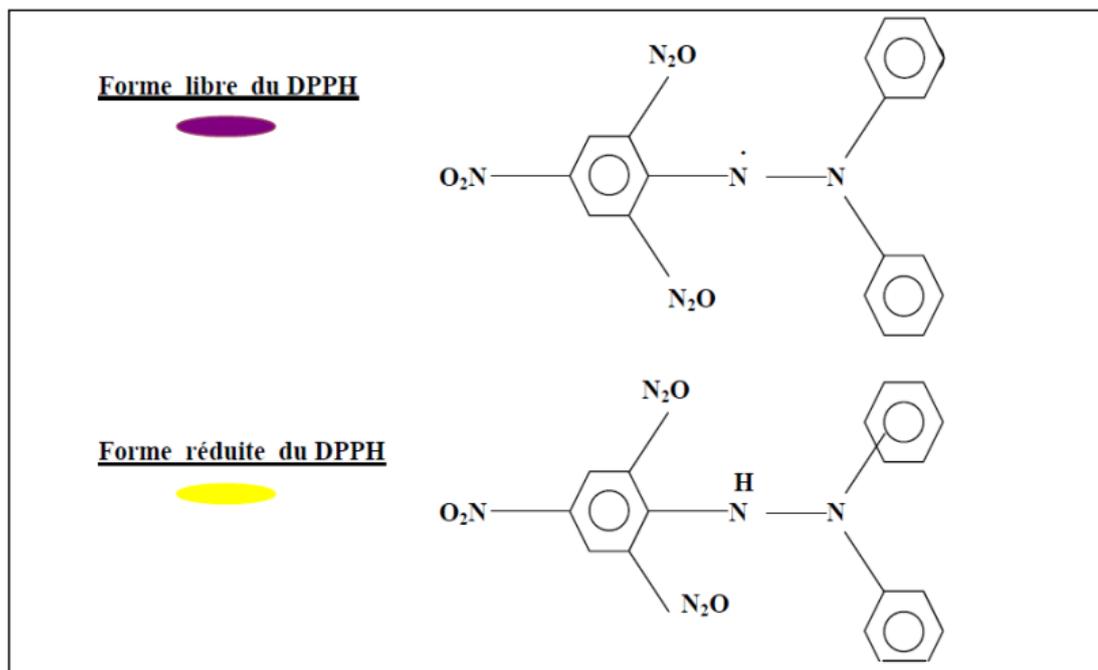


Figure 22 : Forme réduite et libre du DPPH (Mohammedi, 2006).

La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol absolu. 200 μ l de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 800 μ l de DPPH. Des solutions d'antioxydant de référence ou acide ascorbique sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm.

$$\text{Activité Scavenger (\%)} = (A \text{ contrôle} - A \text{ échant} / A \text{ contrôle}) \times 100$$

AC: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC₅₀) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en μ g / ml et comparée avec celle du acide ascorbique (Cuendet *et al.*, 1997).

II-6. Méthode de dosage des paramètres biochimiques sérique

II-6-1. Méthode de dosage de bilirubine totale

✚ Principe

La bilirubine totale a été déterminée suivant la méthode d'acide sulfanilique. Réaction entre la bilirubine et l'acide sulfanilique diazoté qui conduit à un composé, l'azobilirubine, coloré en milieu très acide ou basique. Principe de Malloy-Evelyn modifié par Walters et al : en solution aqueuse, seule la BD réagit. Pour doser la BT il est nécessaire de rompre la liaison entre la bilirubine indirecte et l'albumine. Cette étape est réalisée par l'addition de diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'absorbance de l'azobilirubine ainsi produite est proportionnelle à la concentration en bilirubine et est mesurée à 550 nm (530-580) (Walters & Gerarde., 1970).

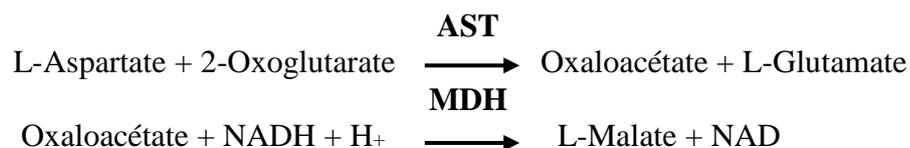
✚ Mode opératoire

	Etalon		Echantillon	
	Blanc	Dosage	Blanc	Dosage
Etalon R4	50µl	50 µl		
Echantillon			50 µl	50 µl
Réactif R1	1ml		1ml	
Solution de travail (B.T)		1ml		1ml
Mélanger et incuber exactement 5 minutes à 37°C lire l'absorbance (A) de l'étalon et l'échantillon contre leurs blancs.				

II-6-2.Méthode de dosage de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST)

✚ Principe

Le dosage de l'activité de l'Aspartate aminotransférase (AST ou TGO) est selon une méthode développée par Karmen et optimisée par Henry (Conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant:



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD et proportionnelle à l'activité AST dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P5P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (**Henry., 1960**).

✚ Mode opératoire

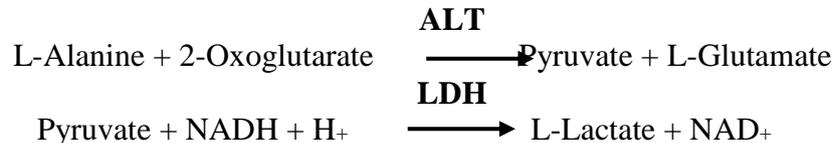
Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

Solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25,30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélange et incuber 1 minute .		
Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minute.		

II-6-3. Méthode de dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT)

✚ Principe

Le dosage de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT ou TGP), est selon une méthode développée par Wroblewski et La Due, et optimisée par Henry et Bergmeyer (conforme aux recommandations de l'IFCC). Le schéma réactionnel est le suivant :



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD⁺ et proportionnelle à l'activité ALT dans le spécimen, est mesurée à 340 nm. L'absence de P5P contribue à une forte amélioration de la stabilité du réactif reconstitué (**Bergmeyer., 1978**).

✚ Mode opératoire

- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.

Solution de travail	1 ml	3 ml
Préincuber à la température choisie (25,30 ou 37°C)		
Echantillon	100 µl	300 µl
Mélange et incuber 1 minute .		
Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minute		

II-6-4. Méthode de dosage de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL)

+ Principe

L'activité de la phosphatase alcaline a été déterminée suivant une méthode cinétique p-Nitrophénylphosphate DGKC. La phosphatase alcaline (PAL) catalyse l'hydrolyse du p-nitrophénylphosphate (pNPP) à pH 10,4 libérant du p-nitrophénole et du phosphate en fonction de la réaction suivante:

PAL



La vitesse de formation du p-Nitrophénole, déterminée par photométrie, est proportionnelle à la concentration catalytique de phosphatase alcaline dans l'échantillon testé (**Rosalki, 1993**)

+ Mode opératoire

- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.
- Mélanger et introduire dans une cuve thermostatée, attendre 1 minute puis mesurer l'augmentation moyenne de la D.O par minute pendant 1 à 3 minutes.

Dans un tube à hémolyse introduire :

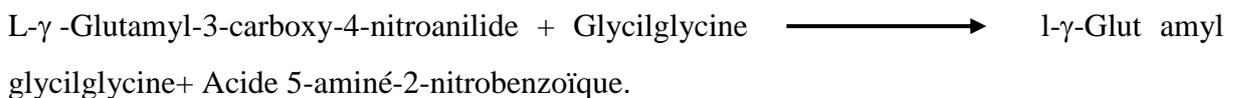
Solution de travail	1 ml
Equilibrer à 25,30 °C ou 37 °C	
Echantillon	20 µl

II-6-5. Dosage de gamma-glutamyl transférase (γ -GT)

+ Principe

-gamma-glutamyl transférase (GT) catalyse le transfert d'un γ-glutamyl-p-nitroanilide au dipeptide accepteur γ-glutamyl de la γgroupe glycylglycine d'après la réaction suivante :

γ -GT



La vitesse de formation de l'acide 5-aminé-2-nitrobenzoïque déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de γ- GT dans l'échantillon testé. (**Szasz, 1969**).

Mode opératoire

1. Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air ou l'eau distillée.
2. Mélanger et introduire dans une cuve thermostatée, attendre 1 minute.
3. Lire l'absorbance (A) initiale de l'échantillon, mettre en marche le chronomètre et lire l'absorbance chaque minute pendant 3 minutes.
4. Calculer la moyenne de la différence d'absorbance par minute (A/min).

II-7. Méthode de dosage des paramètres de stress oxydatif

II-7-1. Préparation de l'homogénat d'organe

Pour préparer l'homogénat , un gramme de tissu de foie est broyé dans la solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène pour chaque ratte. L'homogénat est centrifugé à 3900 t/min pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré puis conservés à -4°C. Cette surnageant est utilisé pour le dosage des paramètres de stress oxydatif.

II-7-2. Méthode de Dosage des protéines tissulaire

- **Principe**

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie (G 250) comme réactif. Les groupements amines (-NH₂) des protéines réagissent avec un réactif à base de l'acide orthophosphorique, de l'éthanol et de bleu de Coomassie pour former un complexe de couleur bleue. L'apparition de cette couleur reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité établit la concentration des protéines dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

- ❖ Prélever 0,1 ml de l'homogénat.
- ❖ Ajouter 5 ml du réactif de Bradford.
- ❖ Agiter et laisser reposer 5 min pour la stabilisation de la couleur.
- ❖ Lire la densité optique à 595 nm, contre le blanc.
- ❖ La densité optique obtenue est rapportée sur une courbe d'étalonnage préalablement tracée.

- ❖ La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA) (1 mg/ml) réalisée dans les mêmes conditions (annexe)

II.7.3. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm (Yagi, 1976).

- **Mode opératoire**

Pipeter dans les tubes à essai en verre et à vis, 100µl d'échantillon, 400µl de réactif TBA et fermer hermétiquement. Chauffer le mélange au bain Marie à 100°C pendant 15 minutes. Puis refroidir dans un bain d'eau froide pendant 30 minutes en laissant les tubes ouverts pour permettre l'évacuation des gaz formés lors de la réaction. Centrifuger à 3000 tours/minutes pendant 5 minutes et lire l'absorbance du surnageant à 532nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- **Méthode de calcul**

La concentration de TBARS a été déterminée en utilisant le coefficient d'extinction

moléculaire du MDA ($\epsilon = 1.53 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Les résultats ont été exprimés en µmol/l.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/mg de protéine}) = (\text{Do échantillon} / 1,53 \times 10^5) \text{ mg de protéine.}$$

II .7.4. Dosage du Glutathion réduit (GSH)

- **Principe**

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de Wekbeker et Cory (1988). Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2- nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

- **Mode opératoire**

- ❖ Prélever 0,8 ml de l'homogénat.

- ❖ Déprotéiniser en ajoutant 0,2 ml d'une solution d'acide sulfosalicylique 0,25 %.
- ❖ Agiter le mélange et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ❖ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ❖ Prélever 0,5 ml du surnagent.
- ❖ Ajouter 1 ml du tampon Tris (tris 0.4mol, NaCl 0.02mol, pH 9,6).
- ❖ Mélanger et ajouter 0,025 ml de DTNB à 0,01M (dissous dans le méthanol absolu).
- ❖ Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- ❖ Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

➤ **Méthode de calcul**

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$(\text{GSH})(\text{nM /mg de pro}) = (\text{D.O} \times 1 \times 1.525) / (13133 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg de proteine})$$

13133 : constante d'absorption des groupes SH à 412 nm.

DO : la lecture d'absorbance par le spectrophotomètre.

1.525 ml : volume total de mélange.

0.5ml : volume de solution surnagent.

1 : volume de mélange de protéine.

0.8ml : volume de solution homogène sans protéine existe dans 1ml.

(GSH) : concentration de glutathion.

II.7.5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

- **Principe**

L'activité enzymatique du catalase est déterminée dans les tissus cellulaires selon la méthode de (**Flohe et al., 1984**), Le dosage de l'activité enzymatique du catalase est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du superoxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la catalase.

➤ **Mode opératoire**

Dans des tubes à essais en mélanger 1ml de tampon phosphate (KH₂ PO₄, 0.1 M, pH7.2), 0.975 ml de H₂O₂ fraîchement préparé (0.091 M) et de 0.025 ml de la source d'enzyme (homogénat). L'absorbance est lue à 560nm chaque minute pendant 2 minutes (Aebi., 1984).

➤ **Expression des résultats**

L'activité enzymatique est calculée en termes d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI/min/g de protéine), selon la formule:

$$UI/g = (2.3033/T) \times (\log A1/A2) /g \text{ de protéine.}$$

A1 : Absorbance à la première minute.

A2 : Absorbance à la deuxième minute.

T : Intervalle de temps en minute.

II-7-6. Mesure de l'activité de Glutathion S-Transférase (GSTs)

• **Principe**

La méthode utilisée dans cette étude pour doser les GSTs est celle de **Habig et al (1974)** ; celle-ci consiste à faire agir les GSTs contenus dans l'homogénat sur un mélange (GSH + CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6.5. la variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 1 minute durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm (**Habig et al., 1974**).

➤ **Mode opératoire**

Réactifs	Blanc (µl)	Essai µl)
▪ Tampon phosphate (0.1M) pH 6.5	850	830
▪ CDNB (0.02M)	50	50
▪ GSH (0.1M)	100	100
▪ Homogénat	-	20

CDNB: 1 chloro 2, 4 di nitrobenzène

La valeur de la densité optique du blanc (conjugaison spontanée du substrat) a été ensuite retranchée à la valeur de chaque essai afin de mesurer la variation due uniquement à l'activité de l'enzyme.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GST (nmol GST/min/mg protéine)} = (\text{DO échant/min} - \text{DO blanc/min}) / (9.6 \times \text{mg de protéine})$$

II-8. Technique histologique

L'analyse histologique a été réalisée au niveau d'une clinique privée de BEN BORDI. La technique utilisée est celle décrite par (Houlot., 1984) qui comporte les étapes suivantes:

II-8-1. Fixation des échantillons

Après sacrifice des ratte, les reins et le foie sont immédiatement introduisent pendant 12 heures dans le formol à 10% permettant l'immobilisation et la fixation des structures et constituants cellulaires puis mise de ces échantillons tissulaires dans des cassettes spéciales à parois tournées afin de permettre le passage du Bouin alcoolique (26ml Formol, 7ml Acide acétique, 45ml Acide picrique 1% dans l'éthanol à 95% et 22ml eau distillée) et sont coupés à l'aide de couteaux tranchant à fin de réaliser des prélèvements pour l'étude histologique avec une surface de 1 à 2 cm² et une épaisseur de 1.5 mm.

II-8-2. Déshydratation

Les échantillons sont ensuite déshydratés à l'aide d'un appareil automatique pendant 12 heures au minimum pour éliminer l'eau des tissus et cette opération nécessite le passage du tissu dans des bains d'éthanol de concentration croissante (70%, 80%, 90% et 100%). La déshydratation peut être accélérée par l'agitation rapide grâce à des automates spécieux.

II-8-3. Inclusion

Les tissus sont alors plongés dans des bains de paraffine liquide (sous l'effet de la chaleur). Les tissus étant maintenu et imbibés de paraffine, viennent alors l'étape de l'enrobage qui consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc de paraffine qui, en se solidifiant, va permettre sa coupe. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion »

II-8-4. Confection des coupes histologiques

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet,

puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

II-8-5. Colorations

Assure la fixation permanente du colorant sur des groupements acides ou basiques des constituants cellulaires (à un pH donné) (Coloration HES (hématoxyline / Eosine / Safran)

- Réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.
- Les coupes doivent d'abord subir une réhydratation (**Gérard., 2012**).
- Après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (100°, 95°, 70°) puis dans l'eau distillée.
- Afin de distinguer les différents tissus, on peut avoir recours à différents colorants.

II-8-6. Montage et observation

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une préparation microscopique (appelée « lame ») prête à être observée les résultats par l'agrandissement x 20 au microscope optique (MO).

II-9. Méthode d'analyse statistique

Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne de cinq répétitions pour chaque groupe (moyenne \pm écart type moyen (ES)), et pour mieux visualiser les résultats on utilise la représentation graphique, les histogrammes, en utilisant **EXCEL 2007**. Aussi, On utilise **test T de student** à un facteur, avec $\alpha \leq 0.05$ pour les analyses significatives des résultats, et pour les comparaisons des moyennes en utilisant logiciel **MINITAB** (Version 13Fr). Si $P \leq \alpha / \alpha = 0.05$, il y a des différences significatives entre les moyennes et on rejette l'hypothèse d'égalité.

Les différences sont considérées

* : significatives à $p < 0.05$.

** : hautement significatives à $p < 0.01$.

*** : très hautement significative à $P < 0.001$.

NS : Différence non significative à $P > 0.05$.

TROISIEME PARTIE

Résultats et Discussion

I. Résultats

❖ Etudes phytochimiques

Les rendements moyens en extrait aqueux ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de plante *Marrubium vulgare*.

Tableau 05: Le rendement de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare*.

Plantes	Mode de séchage	Rendement %
<i>Marrubium vulgare</i> .	Ombre	19.6%

Selon le tableau 05 l'extrait aqueux *Marrubium vulgare* a de rendement de 19.6%.

I.1. Criblage phytochimiques

Le screening phytochimique réalisé sur la partie aérienne *Marrubium vulgare* permis d'avoir les résultats présentés dans le tableau n° 06.

Tableau 06: Le screening phytochimique réalisé sur la partie aérienne *Marrubium vulgare*

Composée	Réactifs	<i>Marrubium vulgare</i>
Flavonoïdes	H ₂ SO ₄	(++)
Tanins catéchiques	FeCl ₃	(+++).T. catéchiques
Alcaloïdes	Mayer, Wagner	(+)
Saponines	Test de mousse	(+)
Terpénoïdes	Test de Slakowski	(+)
Sucre réducteur	Liqueur de Fehling	(++)

(+) trace

(++) positif

(+++) très positif

D'après les résultats obtenus, nous avons noté que l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* est riche en flavonoïdes, tanins et sucre réducteurs, il renferment aussi des différents proportions des alcaloïdes, saponosides et terpénoides.

I.2. Analyse quantitative des composés phénoliques

I. 2.1. Teneurs en polyphénols totaux (PPT)

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de **Singleton et Rossi(1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et les nourritures (**Athamena, 2009**).

Les résultats présentés dans la figure n° 23 et le tableau n° 07 sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g MS), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique, ayant l'équation: $Y=0.008x+0.484$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0.995$. fig n°23

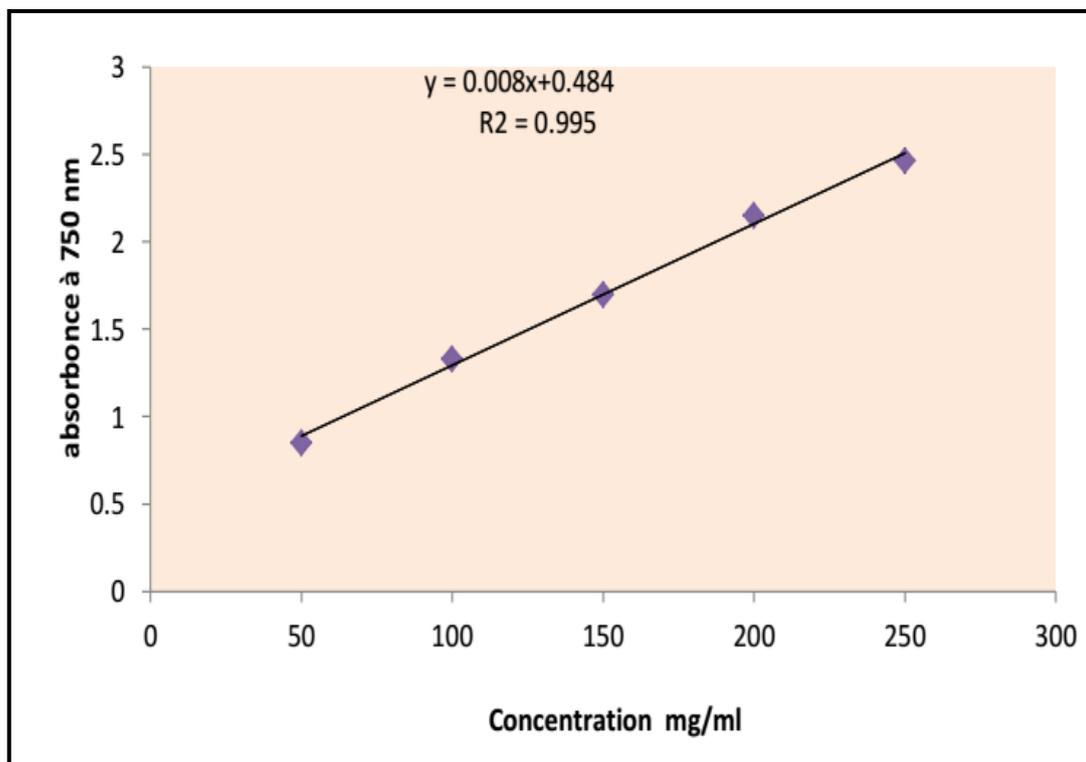


Figure 23: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

Tableau07:Contenu en polyphénols totaux dans l'extrait aqueux

Extraits	Polyphénols (mg d'EAG/g MS)
L' extrait aqueux <i>Marrubium vulgare</i>	13.25

Le résultat obtenu lors du dosage des polyphénols montrent que la teneur de ces derniers dans l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* soit 13.25 mg éq d'acide gallique /g.

I.2.2.Teneurs en flavonoïde total (FVT)

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et l'étalon été la quercétine. La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de MS). Les taux des flavonoïdes des extraits ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage de quercétine, selon l'équation suivante: $Y=23.45x+0.121$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0.9924$ fig n°24.

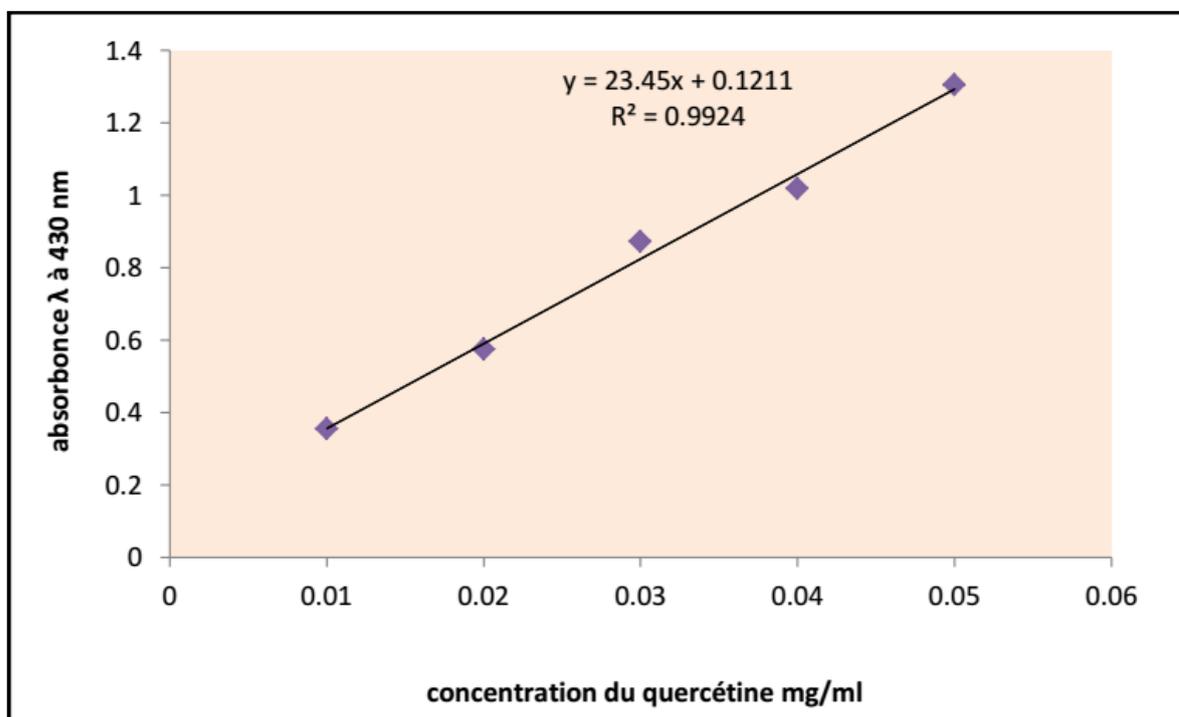


Figure 24: Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Tableau 08: Contenu en flavonoïdes dans l'extrait *Marrubium vulgare*

Extraits	Flavonoïdes (mg de Querc /g MS)
L' extrait aqueux de <i>Marrubium vulgare</i>	9.15

Le tableau ci dessus montre que le teneur en flavonoides de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* 9.15 éq de quercétine / g) .

I. 3. Activité anti-radicalaire d'extrait aqueux de *Marrubium vulgare*

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité.. L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisée (**Cuendet *et al.*, 1997**).

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Dans ce test on a utilise l'acide ascorbique comme standard, les résultats obtenus (pourcentage d'inhibitions I%) sont représentés dans le tableau n°09, selon l'équation: $Y=2553x+21.20$ avec un coefficient de corrélation $R^2=0.998$. fig n°25.

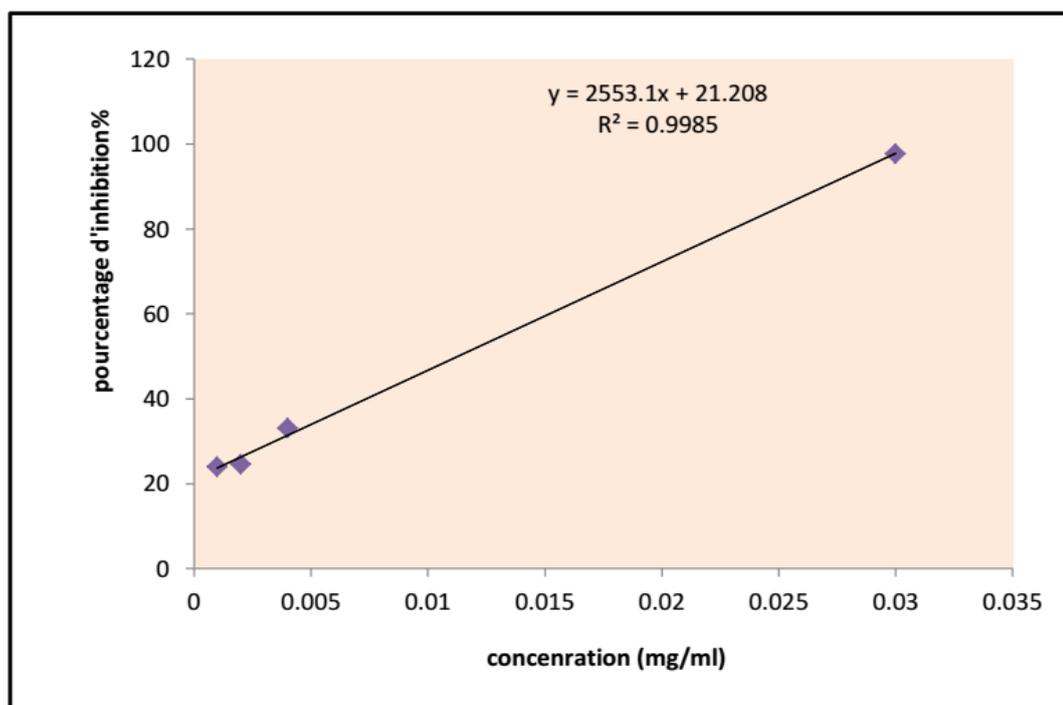


Figure 25: Courbe d'inhibition d'acide ascorbique

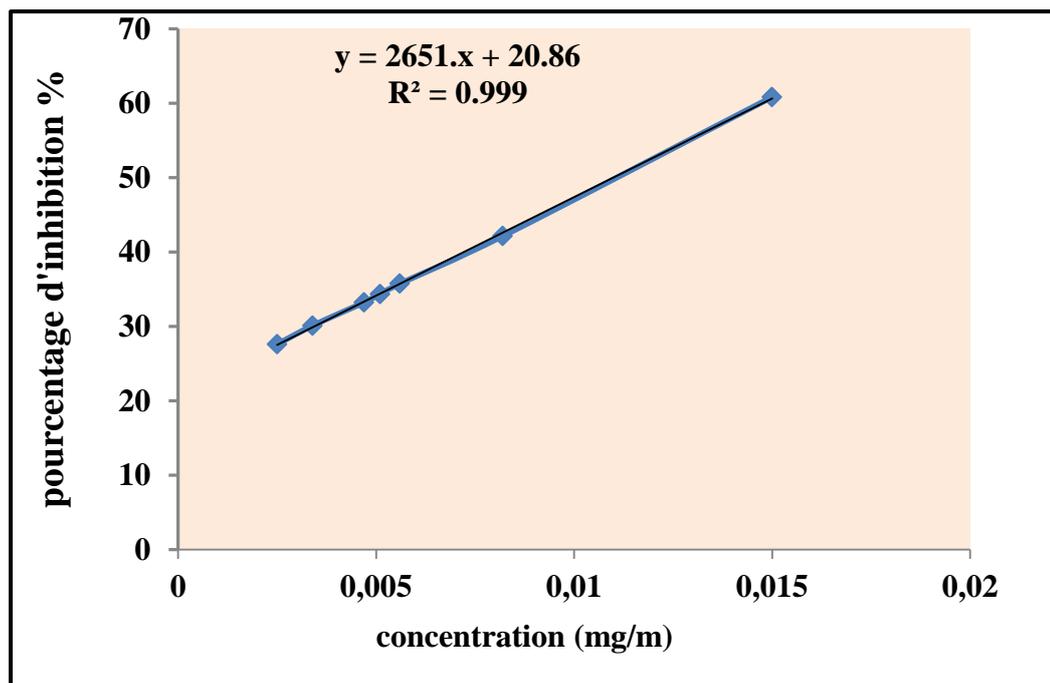


Figure 26: Effet d'extrait de *Marrubium vulgare* sur le radical DPPH

Tableau 09: Valeur d'IC₅₀ du DPPH des extraits aqueux de *Marrubium vulgare*.

Extraits	Valeurs des IC ₅₀ (mg/ml)
l'acide ascorbique	0.011
L' extrait aqueux de <i>Marrubium vulgare</i>	0.010

L'extrait de *Marrubium vulgare* a représenté une valeur d'IC₅₀ = 0.010 mg/ml, ce qui est l'extrait le plus puissant d'inhiber ou de piéger le radical DPPH. cette valeur est plus importante en comparaison avec celle de l'acide ascorbique (0.011mg/ml).

❖ Etudes biologiques

I.4. Étude du poids corporel et poids relatif du foie

Les résultats obtenus par cette étude sur l'évolution du poids corporel et du poids relatif du foie sont mentionnés sur le tableau 10.

Tableau 10 : Variation du poids corporel et poids relatif du foie (g/100g de poids corporel) chez les rates témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètre	Lots expérimentales					
	T N=5	MV (100mg/kg pc/jr) N=5	Alloxane (D.U=120 mg/kg pc) N=5	A+MV ₁₀₀ (100mg/kg pc/jr) N=5	A+MV ₂₀₀ (200mg/kg pc/jr) N=5	A+MV ₄₀₀ (400mg/kg pc/jr) N=5
Poids initiales(g)	229.40±1.83	229.20±3.68	228.40±3.6	226±4.85	233±4.36	229.80±4.36
Poids finales(g)	233.80±1.85 ^{***}	232.80±3.47 [*]	237±3.41 ^{**}	232.6±5.12 ^{**}	236.60±4.01 ^{**}	235 ±4.72 ^{**}
Gain de poids(g)	0.2188 ±0.0118	0.1804 ±0.0180 a^{NS}	0.3900 ±0.0350 a^{**}	0.1996 ±0.0180 a^{NS}b^{**}	0.1712 ±0.0323 a^{NS}b[*]	0.1996 ±0.0180 a^{NS}b^{**}
Poids relatifs de foie (%)	3.734±0.097	3.430±0.125 a^{NS}	2.580±0.224 a^{**}	3.488±0.262 a^{NS}b[*]	3.714±0.100 a^{NS}b^{**}	3.924±0.049 a^{NS}b^{**}

Les valeurs sont exprimées en Moy ± ES avec un nombre d'échantillon (n =5).

a : comparaison avec le groupe Témoin.

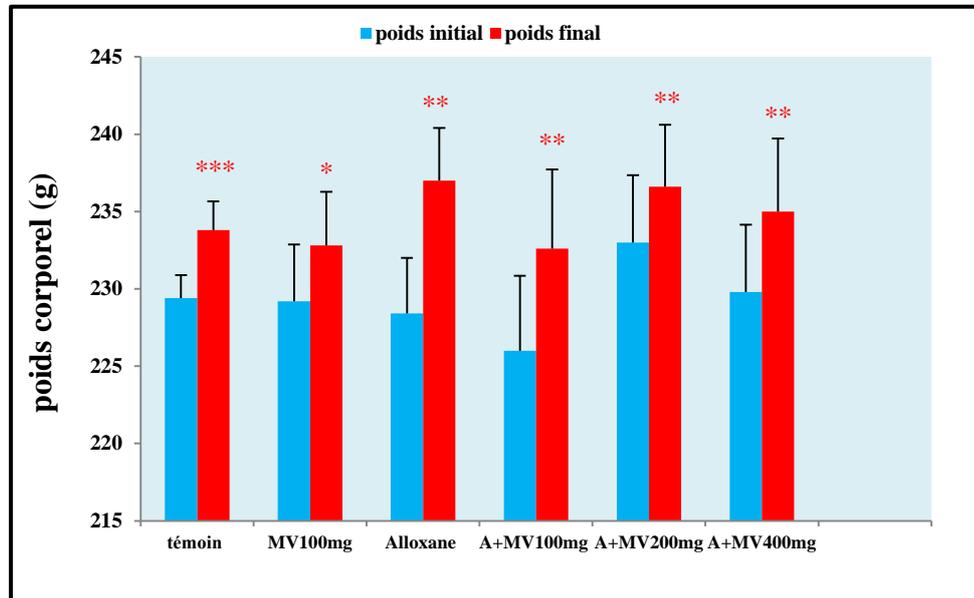
b : comparaison avec le groupe traité par l'alloxane (120mg/kg/pc).

P : seuil de signification ; ***** : Différence significative (P ≤0,05), ****** : Différence hautement significative (p≤0.01), ******* : Différence très hautement significative (P ≤0,001), **NS** : Différence non significative p > 0.05.

I.4.1.Poids corporel

En mesurant ce paramètre, nous voulions savoir est ce que le *Marrubium vulgare* à un effet sur l'évolution du poids corporel des sujets sains et des sujets traité par l'alloxane :

A



B

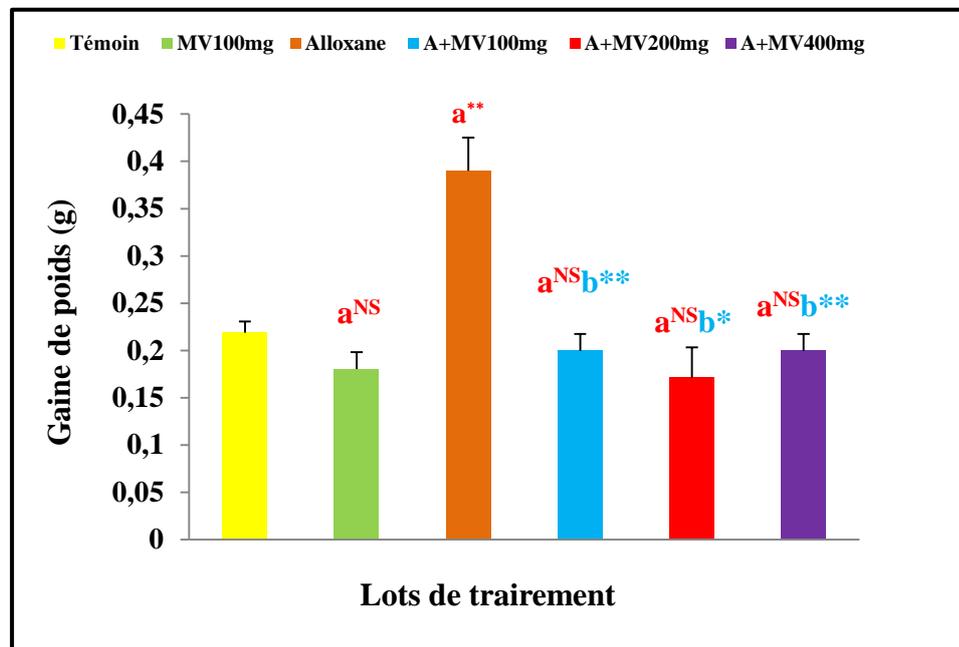


Figure 27 : Etude de l'évolution du poids corporel et gain du poids corporel (B) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.

La figure 27 (A) montre toujours l'existence d'une différence significative entre le poids initial et final chez les différents lots de traitement. Mais il existe une augmentation

hautelement significative ($P \leq 0,01$) de la gaine du poids corporel chez les groupes traités par l'alloxane à une dose 120mg/kg (D.U) comparant au groupe témoin et les autres lots traités.

I.4.2.Poids relatif du foie

Les résultats obtenus (Tab 10, Fig 28) montrent qu'il y a une diminution hautelement significative ($P \leq 0,01$) du poids relatif du foie chez le groupe traités par l'alloxane à une dose 120mg/kg (D.U) comparé au témoin, le groupe traité par l'alloxane (120mg/kg) D.U + le MV (200 mg/kg pc/j), le groupe traité par l'alloxane (120mg/kg) D.U + le MV (400 mg/kg pc/j). De plus on observe une diminution significative ($P \leq 0,05$) du poids relatif du foie chez le groupe alloxanique par rapport au groupe traité par Le MV (100mg/kg pc/j).

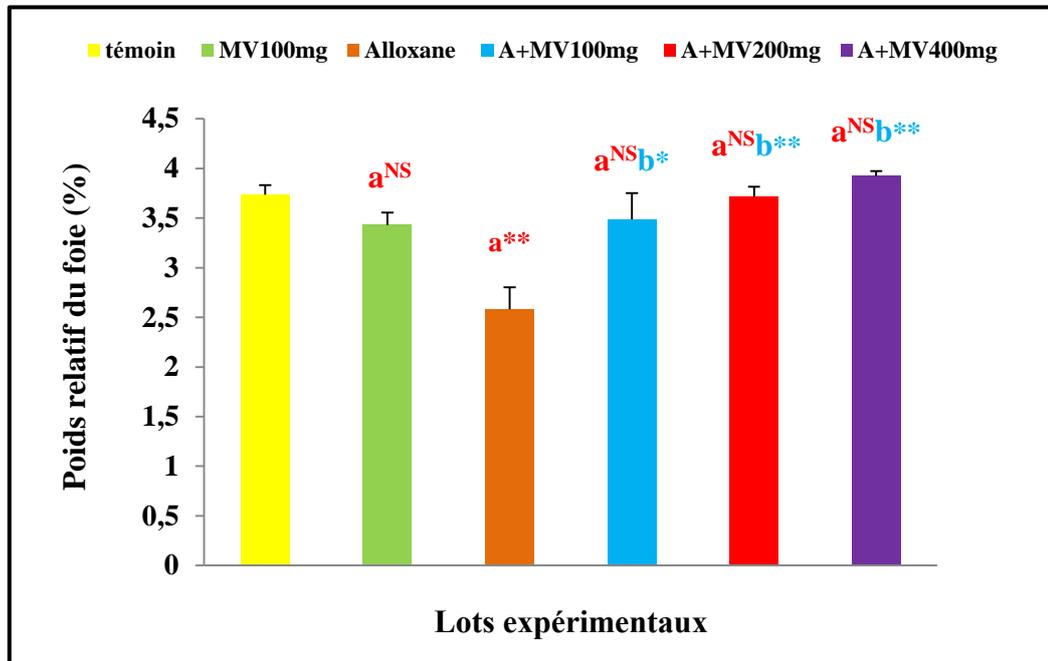


Figure 28: Evolution du poids relatif du foie (%) chez le lot témoin et les lots traités pendant 21 jours de traitement.

I.5. Etude des paramètres biochimiques sanguins

Tableau 11 : Variation de l'activité enzymatique des transaminases et de la phosphatase alcaline sérique et la variation de bilirubine totale, γ GT chez les lots témoin et les lots traités après 21 jours de traitement

Paramètre	Lots expérimentales					
	T N=5	MV (100mg/kg pc/jr) N=5	Alloxane (D.U=120m g/kg pc) N=5	A+MV ₁₀₀ (100mg/kg pc/jr) N=5	A+MV ₂₀₀ (200mg/kg pc/jr) N=5	A+MV ₄₀₀ (400mg/kg pc/jr) N=5
TGO(U/L)	78.60±5.53	52.80±3.75 a**	186.8±14.8 a***	102.4±4.5 a* b**	60.6±7.4 a^{NS} b***	47.6±4.8 a* b**
TGP(U/L)	56.80±2.27	43.00±2.55 a*	87.80±1.77 a***	61.60±4.23 a^{NS} b**	54.00±1.84 a^{NS} b***	66.60±3.37 a^{NS} b**
PAL(U/L)	120.20±5.57	88±5.15 a***	256.8±12.3 a***	158±6.8 a* b**	128.6±4.4 a^{NS} b***	162.4±5.7 a* b**
γ GT(U/L)	1.000±0.000	0.200±0.200 a**	5.000±0.316 a***	2.200±0.583 a^{NS} b***	0.600±0.245 a^{NS} b***	1.400±0.510 a^{NS} b***
Bilirubine Totale (mg/l)	3.080±0.107	1.94±0.298 a*	6.48±0.353 a***	3.900±0.696 a^{NS} b*	2.96±0.051 a^{NS} b***	3.68±0.227 a* b**

Les valeurs sont exprimées en Moy ± ES avec un nombre d'échantillon (n =5).

a : comparaison avec le groupe Témoin.

b : comparaison avec le groupe traité par l'alloxane (120mg/kg/pc).

P : seuil de signification ; * : Différence significative (P ≤0,05), ** : Différence hautement significative (p≤0.01), *** : Différence très hautement significative (P ≤0,001), **NS** : Différence non significative p > 0.05.

I.5.1. Transaminases

Les résultats rassemblés dans le tableau (11) montrent une augmentation très hautement significatives ($p < 0.001$) de l'activité sérique de TGP, TGO chez les lots des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins saines. En ce qui concerne les lots des rattes alloxanique (D.U=120mg/kg pc) traitées par *Marrubium vulgare* de 200mg/kg pc/jr, on a observé une diminution très hautement significatives ($p < 0.001$) de l'activité sérique de TGP, TGO et par rapport aux rattes alloxanique non traités.

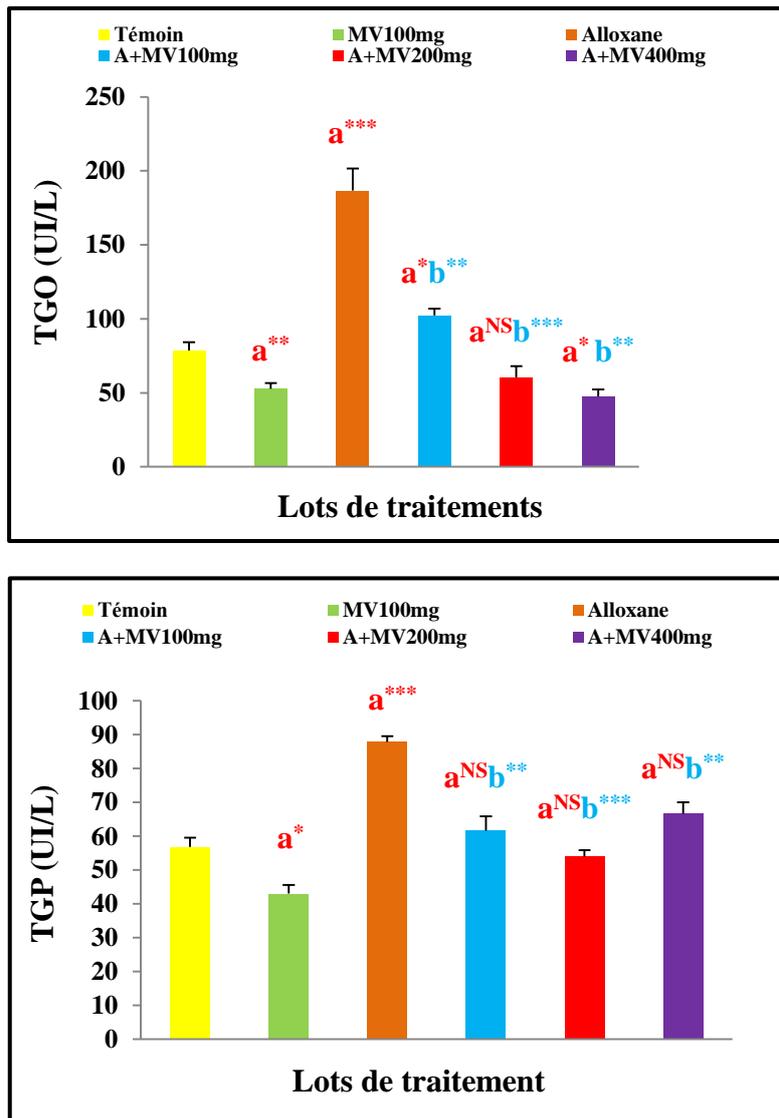


Figure 29 : L'évaluation de l'activité enzymatique des transaminases sériques chez les rattes témoins et traités après 21 jours de traitement, a : comparaison avec le lot Témoin , b : comparaison avec le lot traité par l'alloxane D.U, P :Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.5.2. Phosphatase alcaline

Les résultats rassemblés dans le tableau (11) montrent une augmentation très hautement significatives ($p < 0.001$) de l'activité de phosphatase alcaline sérique chez les lots des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins . En ce qui concerne l'effet de l'extrait aqueux de la *Marrubium vulgare*, on observe une diminution de la phosphatase alcaline sérique avec une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) chez le lot A+MV₂₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxanique non traités (Tab 11, Fig30)

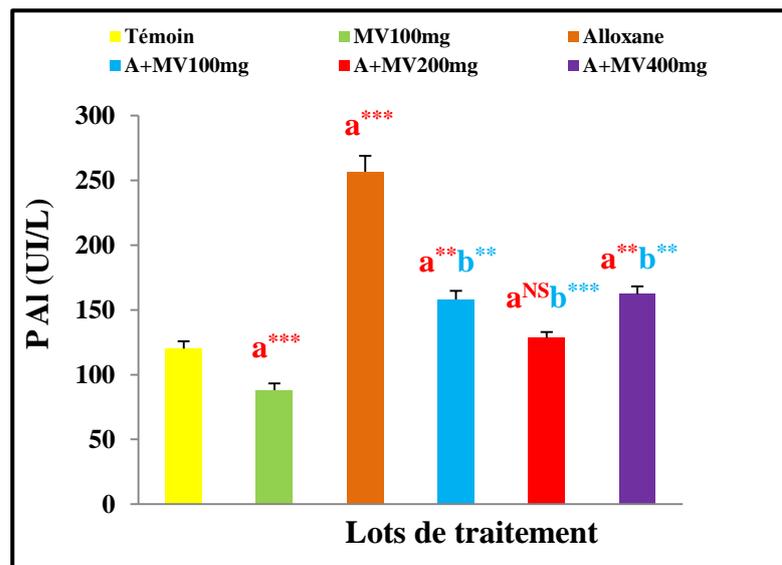


Figure 30 L'évaluation de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sérique chez les différents lots.

a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par l'alloxane D.U, P :
Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.5.3 Bilirubine Totale

Nos résultats dans le tableau (11) indiquent une augmentation de la concentration de la bilirubine totale par façon très hautement significatives ($p < 0.001$) chez les lots des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins . l'administration par gavage de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* induit une diminution de concentration de la bilirubine totale avec une différence très hautement significatives ($p < 0.001$) chez le lot A+MV₂₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxanique non traités. (Tab 11, Fig31)

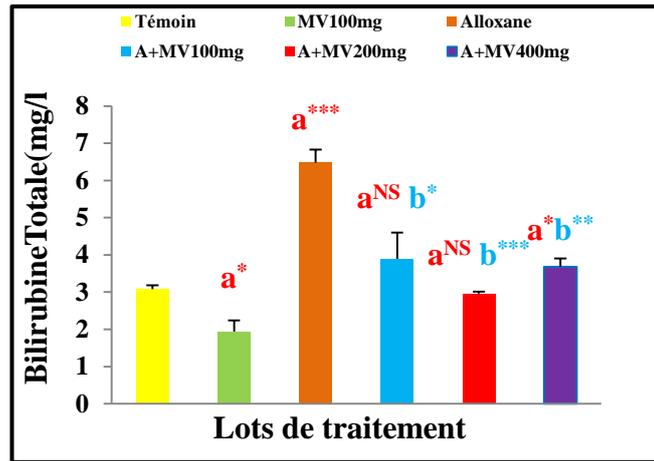


Figure 31 : L'évaluation de la concentration sérique de la bilirubine totale chez sérique chez les différents lots.

a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par l'alloxane D.U, P :
Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.5.4. Le protéine γ GT

Concernant le taux plasmatique de protéine γ GT est augmenté de façon très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins. En ce qui concerne l'effet de l'extrait aqueux de la *Marrubium vulgare*, on observe une diminution de taux plasmatique de protéine γ GT avec une différence très hautement significatives ($p < 0.001$) chez le lot A+MV₂₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxanique non traités. (Tab 11, Fig32)

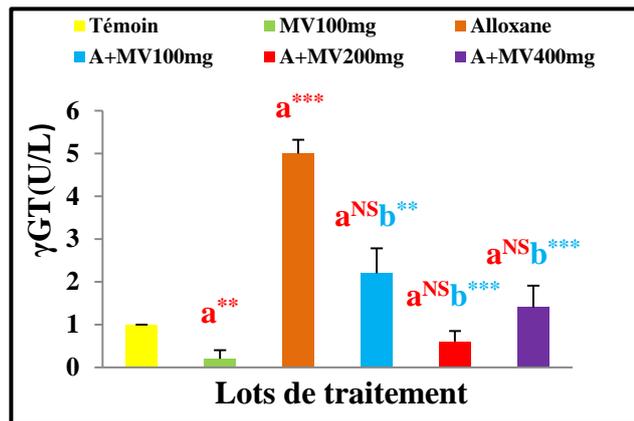


Figure 32 : L'évaluation de la concentration de protéine γ GT chez sérique chez les différents lots.

a : comparaison avec le lot Témoin, bc : comparaison avec le lot traité par l'alloxane D.U, P :
Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.6. Détermination du statut oxydant/antioxydant

Tableau 12: Variation de la teneur hépatique en glutathion (GSH), Malon-di-aldéhyde (MDA), l'activité enzymatique de la glutathion -S- transférase (GST) et le catalase (CAT) chez les souris témoins et traités après 21 jours de traitement.

Paramètre	Lots expérimentales					
	T N=5	MV (100mg/kg pc/jr) N=5	Alloxane (D.U=120m g/kg pc) N=5	A+MV ₁₀₀ (100mg/kg pc/jr) N=5	A+MV ₂₀₀ (200mg/kg pc/jr) N=5	A+MV ₄₀₀ (400mg/kg pc/jr) N=5
MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot)	1.288 \pm 0.071	0.572 \pm 0.121 a**	2.380 \pm 0.168 a**	1.508 \pm 0.135 a^{NS} b**	1.176 \pm 0.219 a^{NS} b**	1.128 \pm 0.213 a^{NS} b**
GSH (nmol/mg prot)	0.575 \pm 0.027	0.793 \pm 0.070 a*	0.343 \pm 0.053 a**	0.697 \pm 0.054 a* b**	0.558 \pm 0.089 a^{NS} b**	0.615 \pm 0.104 a^{NS} b**
GST (nmol/min/ mg prot)	3.02 \pm 0.073	2.14 \pm 0.196 a**	4.54 \pm 0.246 a**	2.30 \pm 0.259 a^{NS} b**	2.90 \pm 0.122 a^{NS} b**	3.16 \pm 0.067 a^{NS} b**
Catalase (UI/g prot)	59.92 \pm 0.235	62.64 \pm 0.479 a**	48.00 \pm 1.87 a**	57.00 \pm 1.30 a^{NS} b**	60.08 \pm 0.312 a^{NS} b**	59.66 \pm 1.33 a^{NS} b**

Les valeurs sont exprimées en Moy \pm ES avec un nombre d'échantillon (n =5).

a : comparaison avec le groupe Témoin.

b: comparaison avec le groupe traité par l'alloxane (120mg/kg/pc).

P : seuil de signification ; * : Différence significative (P \leq 0,05), ** : Différence hautement significative (p \leq 0.01), *** : Différence très hautement significative (P \leq 0,001), **NS** : Différence non significative p > 0.05.

I.6.1. Malondialdéhyde (MDA)

D'après les résultats obtenus (Tab 12, Fig 33) on observe une augmentation avec une différence hautement significative (p \leq 0.01) du taux de MDA dans l'organe du foie chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins. l'administration par gavage de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* induit une diminution du taux de MDA hépatique avec une différence hautement significative (p \leq 0.01) chez les lots

de A+MV₁₀₀ mg/kg/j, A+MV₂₀₀ mg/kg/j et A+MV₄₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxanique non traités(Tab 12, Fig33).

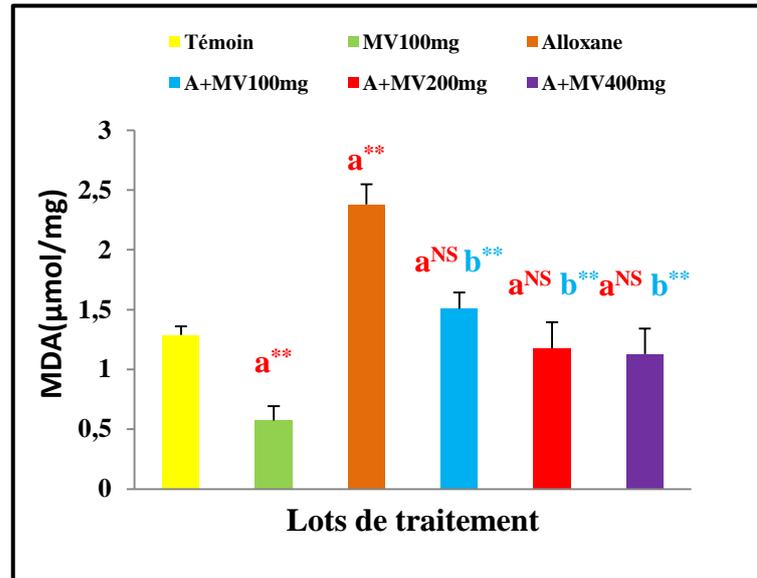


Figure 33 : Variation du malon-di-aldéhyde ($\mu\text{mol/mg}$ de prot) dans le foie chez les rattes témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, P : Seuil de signification (* : $p\leq 0.05$, ** : $p\leq 0.01$, *** : $p\leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.6.2. Glutathion réduit (GSH)

Les résultats rassemblés dans le tableau (12) montrent une diminution hautement significatives ($p < 0.01$) de la teneur hépatique de glutathion chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins

En ce qui concerne l'effet de l'extrait aqueux de la *Marrubium vulgare*, on observe une augmentation de la teneur hépatique de glutathion avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les lots de A+MV₁₀₀ mg/kg/j, A+MV₂₀₀ mg/kg/j et A+MV₄₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxanique non traités(Tab 12, Fig 34)

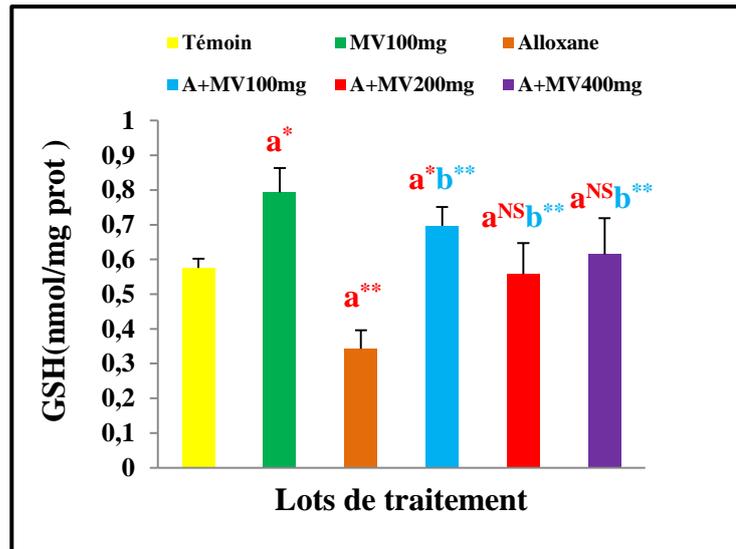


Figure 34 : Variation de la teneur hépatique en glutathion réduit (nmol/mg de protéine) chez les rattes témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par le alloxane D.U, P : Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.6.3. Glutathion - S- transférase (GST)

Une augmentation de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) hépatique avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins .

Concernent l'administration par gavage de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* induit une diminution de l'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST) hépatique avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les lots de A+MV₁₀₀ mg/kg/j , A+MV₂₀₀ mg/kg/j et A+MV₄₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxanique non traités (Tab12, Fig 35)

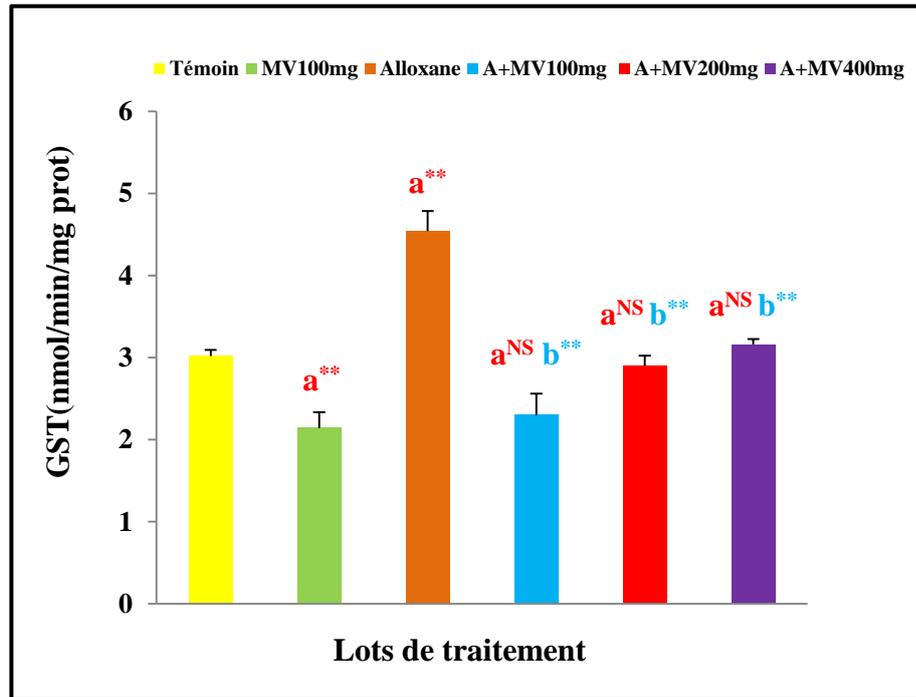


Figure 35 : variation de l'activité enzymatique de la glutathion –S- transférase (nmol/mg de protéines) chez les rattes témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par l'alloxane D.U, P : Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.6.4.Catalase (CAT)

Nos résultats (Tab 12, Fig 36) montrent une diminution de l'activité enzymatique de la catalase hépatique avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins.

Concernant l'administration par gavage de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* induit une augmentation de l'activité enzymatique de la catalase hépatique avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les lots de A+MV₁₀₀ mg/kg/j, A+MV₂₀₀ mg/kg/j et A+MV₄₀₀ mg/kg/j par rapport aux rattes alloxaniques non traitées (Tab 12, Fig 36).

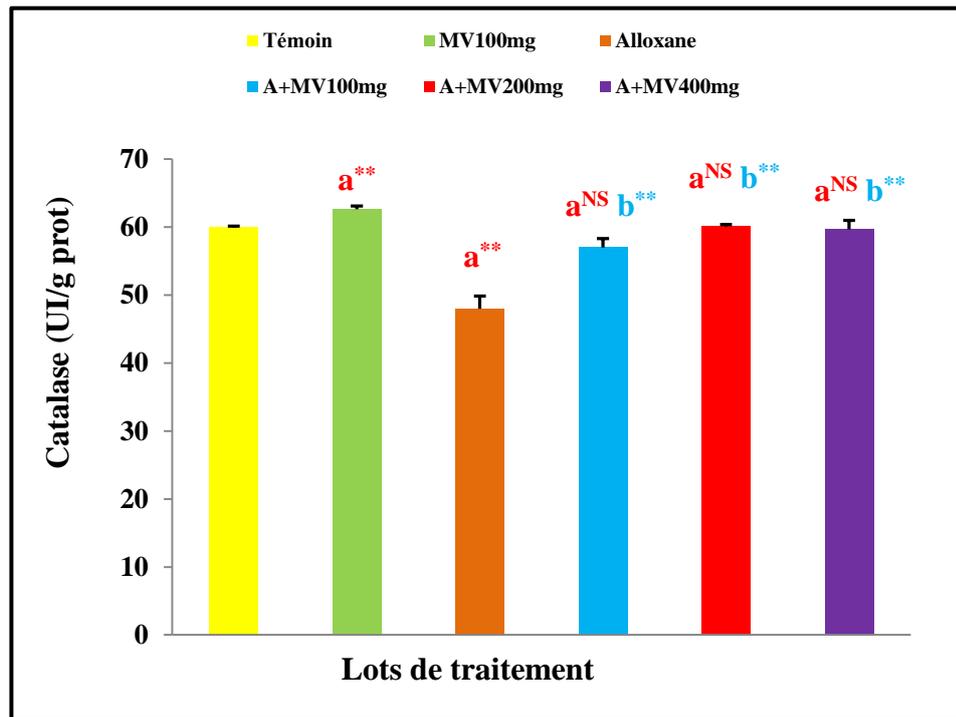


Figure 36 : Variation de l'activité du catalase (UI/min/g prot) dans le foie chez les rattes témoins et traités après 21 jours, a : comparaison avec le lot Témoin, b : comparaison avec le lot traité par l'alloxane D.U, P : Seuil de signification (* : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, NS : $p > 0.05$).

I.7. Etude histologique

Les observations des coupes histologiques nous ont permis d'avoir une idée générale sur le pouvoir de détoxification de l'extrait de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de l'intoxication par l'alloxane. Globalement, une diminution des inflammations et des nécroses provoquées au niveau du tissu hépatique après l'emploi de l'extrait aqueux .

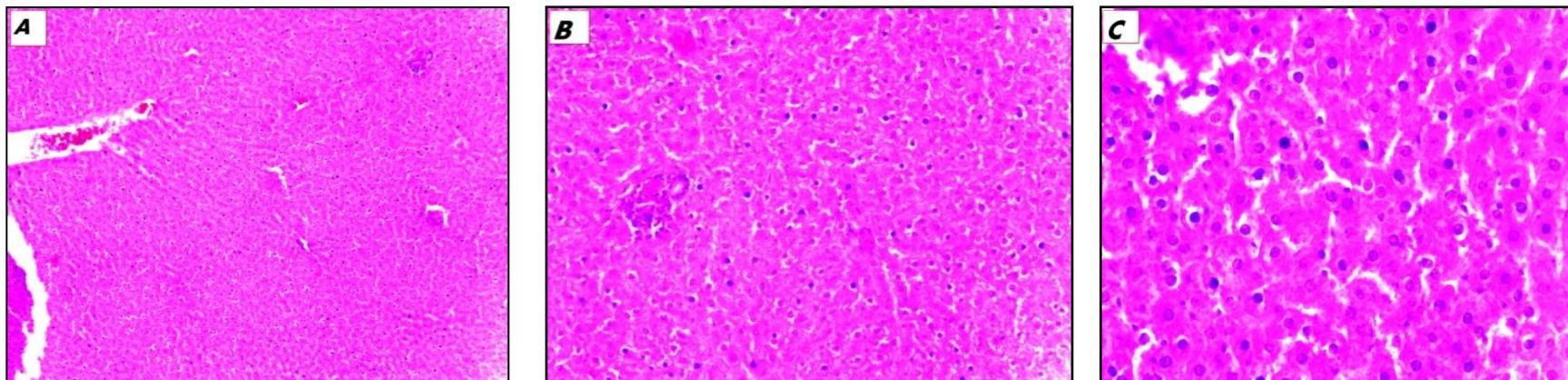


Figure 37 : Coupes histologiques du foie du ratte témoin sain : (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20
(Photo original,2018)

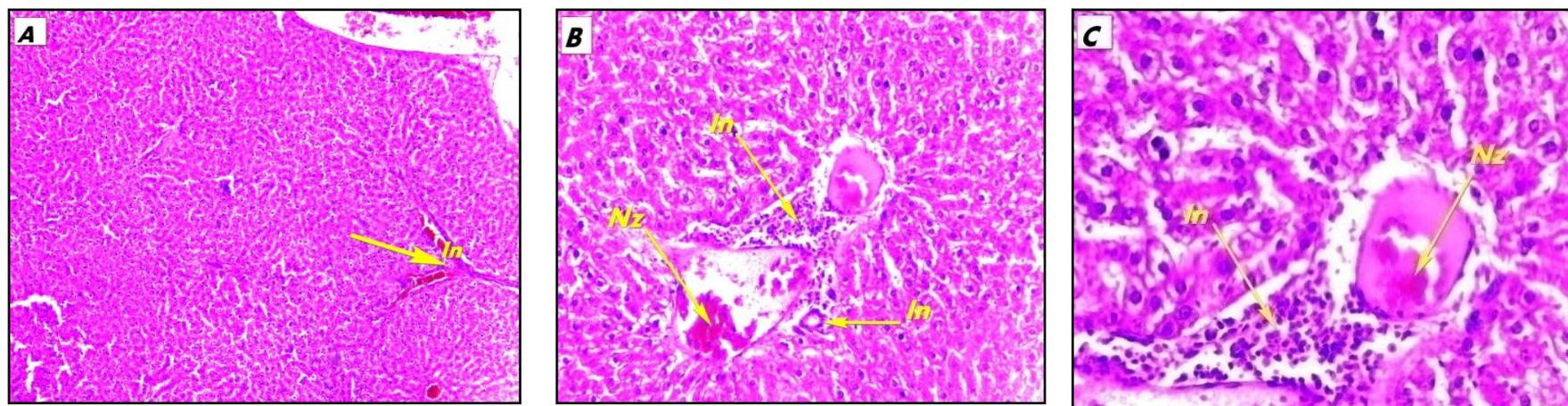


Figure 38 : Coupes histologiques du foie du ratte intoxiquée par l'alloxane : (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018) (In :inflammation Nz : nécrose zonale)

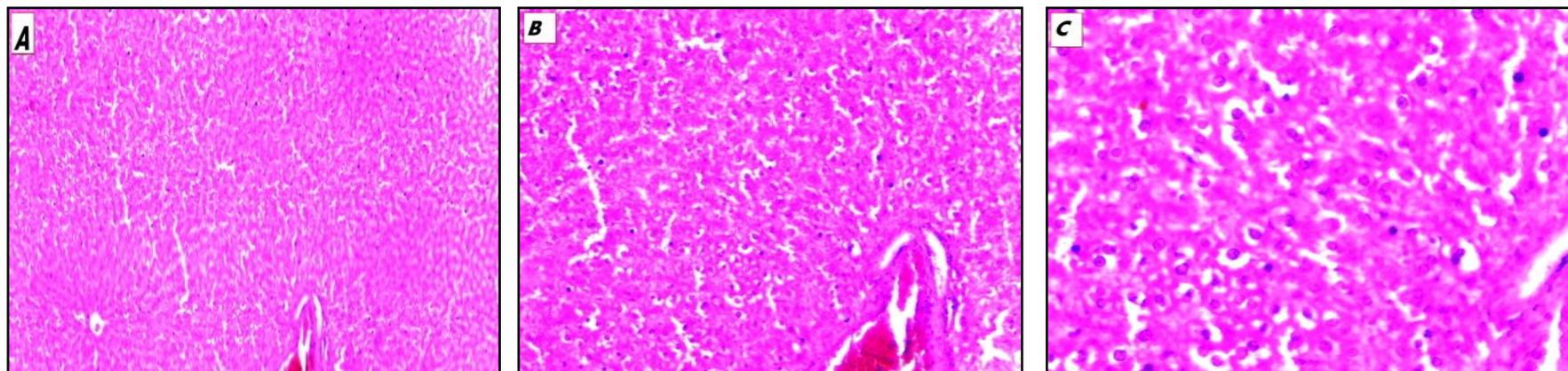


Figure 39 : Coupes histologiques du foie du ratte traité par *Marrubium vulgare* : (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)

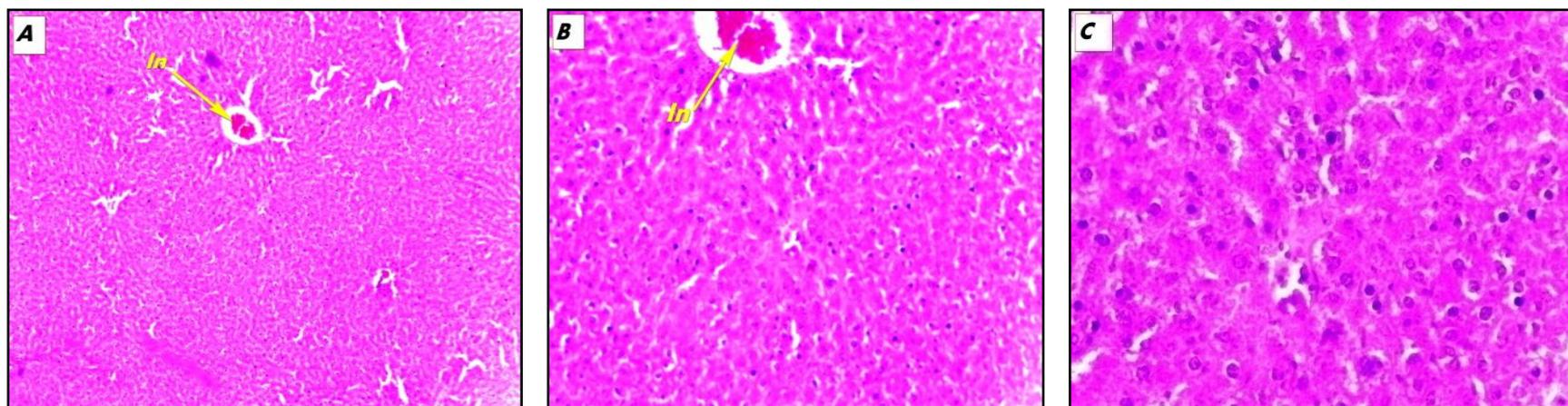


Figure 40 : Coupes histologiques du foie du ratte traité par *Marrubium vulgare*(100mg/kg pc): (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018) (*In* :inflammation)

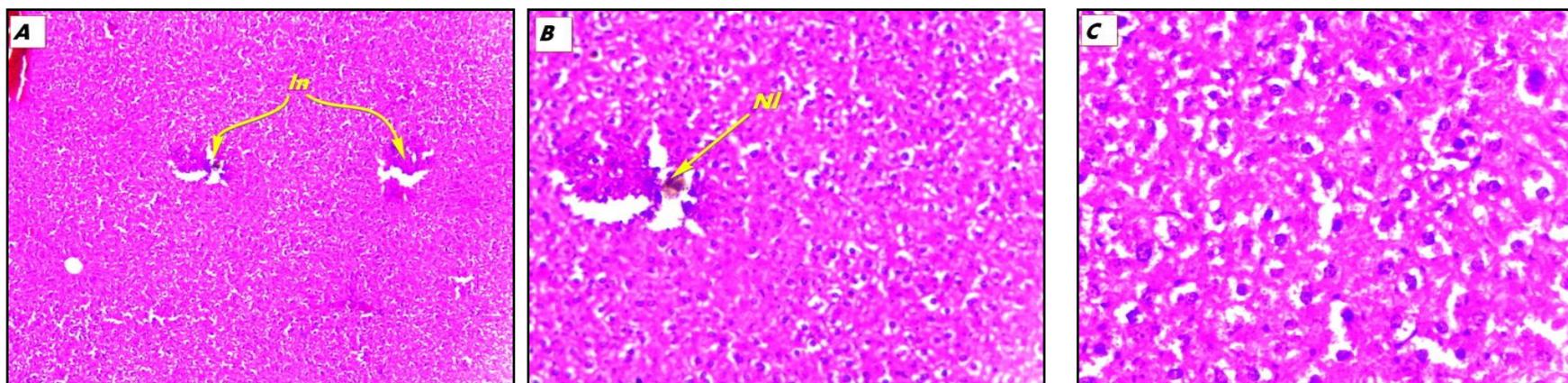


Figure 41 : Coupes histologiques du foie du ratte traité par *Marrubium vulgare*(200mg/kg pc): (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018) (*In* :inflammation)

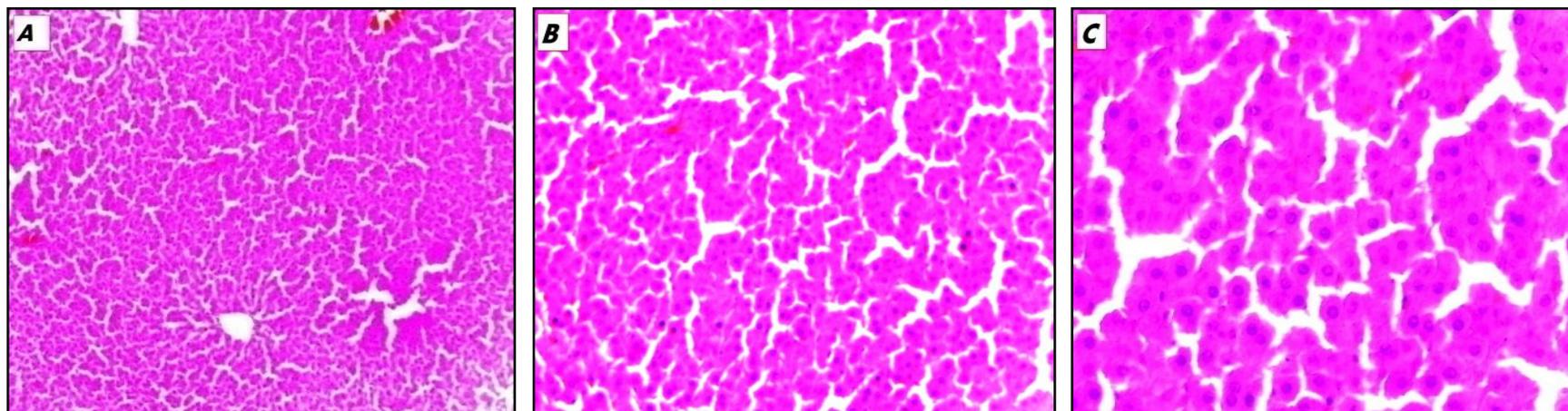


Figure 42 : Coupes histologiques du foie du ratte traité par *Marrubium vulgare*(400mg/kg pc): (A) faible grossissement x4, (B) grossissement x10, (C) grossissement x20 (Photo original,2018)

Discussion

Le stress oxydant qui résulte d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres (RL) et leur élimination par les défenses anti oxydantes, contribue à l'initiation et à la progression de plusieurs maladies. Les RL sont très réactifs et peuvent attaquer, s'ils ne sont pas détruits, différentes cibles telles que les protéines, l'ADN et surtout les acides gras poly insaturés (peroxydation lipidique) (Collier *et al.*, 1990).

Devant l'augmentation considérable du nombre de personnes ayant une hépatotoxicité dans le monde et des plusieurs facteurs qui y contribuent, de nombreux chercheurs ont évalué l'action pharmacologique des plantes traditionnelles et donc leur intérêt en médecine traditionnelle.

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de médecine de plus en plus utilisée à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche des nouvelles substances à activités biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques (Djedioui, 2010).

L'objectif primordial assigné par cette étude vise à rechercher les principes actifs obtenus par macération des feuilles de la plante *Marrubium vulgare* grâce à des tests phytochimiques, ainsi que, ses effets sur certains paramètres biochimiques plus spécifiquement le bilan hépatique et le statut redox chez un modèle de rattes rendus intoxiqué par l'injection de 120 mg/kg pc d'alloxane.

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuée sur l'extrait aqueux de feuilles sèches de *Marrubium vulgare* ont montré la présence de certains composés bioactifs, telle que des saponines, des tanins, des terpénoïdes, les alcaloïdes et sucres réducteurs dans l'extrait.

Les tanins sont responsables des propriétés hémostatiques (Asquith et Butler, 1986), et leurs présence de tanins suggéré la capacité de cette plante à jouer un rôle majeur comme un agent anti-diarrhéique et antihémorragique (Awoyinka *et al.*, 2007). Egalement, les saponines agissent comme anti-hyperlipidémie, hypotensive et ont des propriétés cardio-dépressive (Price *et al.*, 1987). Par conséquent, la concentration de ce composé peut contribuer de manière synergique dans le pouvoir antioxydant important de cette plante et peut ainsi soutenir l'usage local pour le traitement des maladies liées par des radicaux. La présence des alcaloïdes peut expliquer des activités biologiques diverses (Milcent et Chau, 2003). Ils

jouent ; à faibles doses, le rôle d'anesthésique locaux, d'analgésique, d'antibiotiques, d'antiparasitaires, d'antipaludique, d'anti-tumoraux et d'amoebicides (**Chenni, 2010**).

Le dosage des phénols totaux de l'extrait aqueux a révélé des teneurs considérables dans *Marrubium vulgare* (13.25 mg d'EAG/g MS) En effet, les composés phénoliques sont bien connus comme des agents antioxydants dirigés contre les radicaux libres associés aux dommages oxydatifs (**Wang et Ng, 1999**). La présence de ces composés, tels que des tanins, des flavonoïdes, et des phénols dans l'extrait de *Marrubium vulgare* susceptibles de donner une crédibilité à son utilisation locale pour la gestion d'affection induit par le stress oxydatif.

D'autre part, le dosage des flavonoïdes a montré que le *Marrubium vulgare* présente de teneur à de l'ordre de (9.15 mg de EQ/g MS). Les résultats que nous avons obtenus est plus élevés par rapport aux travaux réalisés par **Ghedadba1 et al, (2014)** qui ont montré que les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait aqueux du *Marrubium vulgare* sont respectivement de 3.07 mg EAG/mg MS et de 4.34 mg EQ/mg MS. Cette différence peut être liée à la distribution des métabolites secondaires, qui peut changer pendant le développement de la plante ; Aussi aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse et salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**). En plus l'organe analysé, la région, la date de la récolte et la méthode d'extraction (**Tirichine, 2010**).

L'activité antiradicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Par exemple l'extrait méthanolique préparé par macération qui représente la teneur la plus faible en polyphénols totaux et en flavonoïdes, possède le pouvoir antioxydant la plus faible par rapport aux autres extraits (**Ghedadba1 et al., 2014**).

La réduction du DPPH par dosage spectrophotométrique UV a mis en évidence, des valeurs d'IC₅₀ les plus faibles dans notre extrait, allant à 0.010 mg/ml. Ce dernier résultat est rapproché avec l'étude réalisée par **Fadel (2016)**, qui a montré que l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique de *Marrubium vulgare* préparé par macération, récoltée à Batna durant le mois de février 2015, est de l'ordre de 0.020 mg/ml.

Les résultats ci-dessus montrent clairement que les valeurs d'IC₅₀ que nous avons obtenus sont inférieures par rapport aux études réalisées par **Ghedadba1 et al., (2014)** et

Boudjelal (2012), notre plante possède le pouvoir antioxydant le plus puissant par rapport les travaux de **Boutlelis (2014)**.

La comparaison de ces valeurs avec celle de l'antioxydant standard, l'acide ascorbique (0,011 mg/ml), nous a permis de déduire que le pouvoir antioxydant de l'extrait testé est plus importante que celui de l'acide ascorbique.

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré une augmentation hautement significative du poids corporel des rattes traitées par l'alloxane (120 mg/kg pc) par rapport aux témoins, Cet effet peut être dû à l'augmentation de l'anabolisme, plus particulièrement des lipides. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par une l'étude de (**Zidi, 2009**) réalisée sur les rats.

En revanche, le traitement des rattes par la combinaison l'alloxane (120 mg/kg pc) avec *Marrubium vulgare* (100 et 200 et 400 mg/kg pc/j) a diminué le poids corporel jusqu'à la normalité, cette diminution est due à l'effet protecteur du *Marrubium vulgare* riche en flavonoïdes, contre les effets oxydants de l'alloxane ce qui en accord avec le résultat obtenus par (**Boudjelal, 2012**).

En ce qui concerne l'effet sur le poids relatif du foie, nous avons remarqué une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les rattes traitées par l'alloxane (120mg/kg pc) par rapport aux témoins. Cette diminution du poids relatif probablement due à une dégradation des cellules hépatiques, en forme des ilots de nécrose et dégénérescence graisseuse de la cellule hépatique, Ces signes de dégénérescence apparaissent très rapidement, quelques heures après l'injection d'alloxane, ce qui en accord avec les travaux de (**Anne marie, 1954**) sur le foie de cobaye.

Le traitement des rattes alloxanique par le *Marrubium vulgare* (les trois doses) a entraîné une amélioration du poids relatif du foie, cette amélioration est due à l'effet protecteur du l'extrait aqueux de la plante contre les effets indésirables de l'alloxane. Ceci est confirmé par les travaux de (**Zidi, 2009**).

Le foie est le principal organe de détoxification, il est capable de neutraliser toutes les substances toxiques. Vu son rôle dans la transformation des xénobiotiques à titre d'exemple l'alloxane, où le foie présente un grand risque de dommages.

Nos résultats révèlent une augmentation de l'activité enzymatique de TGO, TGP et de la PAL chez les rattes traitées par l'alloxane (120mg/kg) par rapport aux témoins. L'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques sériques est expliquée par la destruction des cellules hépatiques par les substances toxiques (effet hépato toxique de l'alloxane) (**Barbosa, 2006 et Michailova, 1998**). Ainsi, des taux élevés des enzymes du foie, notamment TGO et TGP, sont fréquemment attribués aux effets métaboliques et/ou toxiques de différentes drogues comme les psychotropes (**Himmerich et al., 2005**), l'alcool (**Liappas et al., 2006**) et les agents polluants tels que les résidus de l'industrie (**Michailova et al., 1998**).

Dans notre cas, une variation dans les taux sériques de TGP, TGO et PAL entre les lots des rattes intoxiquées par l'alloxane et traitées par les trois doses de l'extrait aqueux de la plante (taux relativement faibles) et ceux des rattes intoxiquées mais non traitées (concentrations élevées). Nos résultats sont en accord avec les investigations de **Elberry et al. (2010)** sur des rats intoxiqués et non traités qui signalent une augmentation de la concentration sérique de TGP. Cette augmentation est moins accrue chez les sujets intoxiqués et traités.

Une activité antihépatotoxique certaine de l'extrait brut de la plante étudiée, puisque chez les animaux ayant reçus les doses d'extrait, il y a moins de TGO et TGP dans le sang par rapport aux animaux non traités. D'autre part, en tenant compte du retour très précoce à la normale du taux de TGP par rapport à celui de la TGO, nous pouvons déduire que l'extrait aqueux exerce une action réparatrice plus précoce sur le cytoplasme que sur les organites cellulaires (localisation essentielle de la TGO) (**Boutlelis, 2014**).

D'après nos résultats, la concentration de la bilirubine totale augmentée de façon très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins et le lot des rattes traités par MV₁₀₀ mg/kg/j. La bilirubine est un pigment de couleur jaune qui provient de la dégradation de l'hémoglobine. On la retrouve principalement dans la bile et en faible quantité dans le sang (**Haleng et al., 2007**). Une élévation plus importante de la bilirubine témoigne d'une hémolyse (**Nicole et al., 2009**).

En ce qui concerne l'activité anti-hépatotoxique de l'extrait aqueux de le *Marrubium vulgare* on observe une diminution à façon très hautement significative ($p < 0.001$) (200mg/kg

pc) de concentration de la bilirubine totale jusqu'à la normalité. Cet résultat accord avec l'étude de (**Rim et al., 2016**).

L'évolution des concentrations sériques de γ -GT montre, elle aussi, une élévation de façon très hautement significative ($p < 0.001$) chez le lot des rattes traités par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) par rapport au lot des rattes témoins et le lot des rattes traités par MV₁₀₀ mg/kg/j. Ce résultat traduit également une certaine protection du foie sous l'effet de l'extrait naturel et en particulier les voies biliaires. En effet, selon **Rousseau (1978)**, l'augmentation de la concentration sérique de la γ -GT est un bon indicateur de l'atteinte des cellules épithéliales des canaux biliaires. Cette enzyme microsomiale est un marqueur de cholestase hépatique.

En outre, nos résultats montrent que le traitement des rattes alloxanique par l'extrait aqueux de le *Marrubium vulgare* (les trois doses) induit une diminution très hautement significative ($p \leq 0.001$) de la concentration sériques de γ -GT. Nos résultats sont en accord avec l'étude réalisé par **Boutlelis (2014)**. cette diminution est due à l'effet hépato-protecteur du l'extrait aqueux de la plante grâce à leur composés phénoliques notamment les flavonoïdes (**Akther et al., 2013**)

Le stress oxydant dans les cellules ou les tissus se réfère à renforcer la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou la déplétion dans le système de défense antioxydant, les ERO générés dans les tissus sont efficacement piégés par le système enzymatique antioxydant comme le catalase et, ainsi que les antioxydants non enzymatiques comme le GSH (**Schlorff et al., 1999**). Le glutathion agit comme un antioxydant physiologique de protection dans des systèmes biologiques (**Fatima et Mahmood, 2007**). Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde desmutase (**Morin et al., 2001**). Pour la protection le GSH porte une fonction thiol qui constitue un système antioxydant de la première défense en se liant par sa fonction SH aux métabolites toxiques (**Morin et al., 2001**).

Du fait de la difficulté de la mesure des radicaux libres (réactivité intense, demi-vie extrêmement courte, très faible concentration); des marqueurs indirects sont déterminés. Ces marqueurs sont les produits secondaires de la peroxydation lipidique. Il s'agit de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) (**Favier, 1997**).

Au cours de notre étude nous avons enregistré une augmentation très hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux de Malondialdéhyde (MDA) dans le foie, chez les rattes alloxaniques par rapport aux témoins. Le traitement par l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* le à diminuer par façon hautement significativement ($p \leq 0.01$) le taux de l'MDA dans le tissu hépatique.

Alors l'hyperperoxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox cellulaire dans le foie en faveur des peroxydant, car l'alloxane s'est avéré générateur de radicaux libres qui est par leur pouvoir oxydant, sont à l'origine de l'oxydation de l'ADN, de lipides aboutissant ainsi à la mort des cellules β et l'installation du diabète (Quinlan et Gutteridge, 1988 ; Huk *et al.*, 1998). Ces résultats sont confirmés par l'étude de (Kebieche Mohamed, 2009).

Au cours de notre étude, nos résultats montrent une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) du taux de glutathion réduit (GSH) dans le tissu hépatique chez le lot traité par l'alloxane par rapport au témoin suite à leur action de neutralisation des radicaux libres générés par l'alloxane (Huk *et al.*, 1998). Ce phénomène aussi provoque sa déplétion et facilite la peroxydation des lipides et l'oxydation des groupements thiols des protéines ce résultat a été confirmé par (Lopez-Lazaro *et al.*, 2000 et Vessal *et al.*, 1992).

Le GSH est l'un des tripeptides les plus abondants, largement distribué au niveau des hépatocytes. Ses fonctions sont principalement concernées par le déplacement de radicaux libres tels que H_2O_2 et radicaux de superoxyde (Fang *et al.*, 2003, Ogeturka *et al.*, 2005). Le glutathion constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres (Ogeturka *et al.*, 2005) mais ces processus de défense ne sont pas complètement efficaces.

Une bonne partie des ERO et des radicaux libres est donc neutralisée par des antioxydants exogènes présents dans les organismes végétaux autotrophes (plantes). En conséquence le traitement des rattes par l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* a empêché la diminution de GSH avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$) chez les rattes alloxaniques traité, celle-ci est expliquée par sa effet scavengeur, c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par l'alloxane se neutralisent par le GSH ils vont plutôt être captés par les composés phénoliques en maintenant ainsi le taux normal de glutathion des cellules hépatiques ce qui en accord avec les travaux de (Ghlissi *et al.*, 2015). Des études scientifiques

montrée l'effet antiradicalaire des flavonoïdes contre la peroxydation lipidique, et donc de la formation des radicaux libres chez les rattes alloxaniques (**El-Missiry et al., 2000**).

Concernant la glutathion S-transférase (GST), cette enzyme joue un rôle important dans la désintoxication des xénobiotiques et/ou dans la protection contre des métabolites nocifs (enzyme de la phase 2 du conjugaison) générés après la dégradation des macromolécules suite à leur exposition au stress oxydant (**Mulder et al., 1999**). D'après nos résultats on observe une augmentation hautement significative de la GST dans le foie chez le lot alloxanique par rapport aux témoins. L'augmentation de l'activité de cette enzyme est une réponse physiologique (effet protecteur) pour compenser les altérations qui sont dus aux radicaux libres (**Moussa, 2008**).

Après le traitement par l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* pendant 21 jours, l'activité enzymatique de la GST, revient presque à la normale chez les rattes alloxaniques traité. Ceci est dû à l'effet protecteur de cette plante contre les dommages oxydatifs induits par l'alloxane. Ce résultat est confirmé par d'autres études (**Ghissi et al., 2015. Boutlelis, 2014**)

Les espèces réactives de l'oxygène sont susceptibles d'épuiser l'activité des systèmes enzymatiques antioxydants de la cellule (CAT), qui apparaitre d'après nos résultats chez les rattes alloxaniques porte une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$) par rapport au lot témoin, donc il va aboutisse finalement à un déséquilibre du système redox cellulaire au profit des prooxydants. Cet état de stress oxydatif favorise les réactions en cascade des radicaux libres avec les molécules biologiques. Une lipoperoxydation (au niveau des biomembranes cellulaires).

Au cours de notre étude nos résultats montrent que le *Marrubium vulgare* administré en association avec l'alloxane présente une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$) par rapport au témoin, ont maintenu l'équilibre de la balance antioxydant/ prooxydant des cellules hépatique. Cet équilibre est maintenu sous l'effet de l'action antioxydant de la plante *Marrubium vulgare* contre les RL. systèmes enzymatiques de défense antioxydants CAT ne sont pas donc altérés et le taux cellulaire du GSH est conservé sous l'effet chémoprotecteur des composés antioxydant de la plante. Cette résultat d'accord avec les travaux **Aouacheri, 2009 et Ahmed, 2015**)

Les explications du mécanisme possible étant à la base des propriétés antihépatotoxiques de ces substances naturelles de *Marrubium vulgare* incluant la prévention de l'épuisement de GSH, GST, CAT, MDA et la destruction des radicaux libres. Ces deux facteurs sont probablement liés aux propriétés antihépatotoxiques de l'extrait végétal. Ces mêmes hypothèses sont avancées dans les travaux de **Chandan et al., (2007)** et **Raja et al., (2007)** obtenus à partir de *Aloe barbadensis* et *Cytisus scorparius* (**Boutlelis, 2014**).

L'activité antihépatotoxique de l'extrait aqueux testé est par ailleurs confirmé par les coupes histologiques où il apparaît que les lésions hépatiques sont moins étendues chez les animaux intoxiqués et traités et que la cicatrisation intervient plutôt que chez les sujets intoxiqués non traités.

Les altérations histologiques observées au niveau des hépatocytes sont caractérisées par l'apparition des nécroses, des sinusoides dilatées, des hépatocytes avec changement graisseux et un infiltrat cellulaire inflammatoire péri-portal léger. Ces dommages pourraient être dus probablement à la génération de radicaux réactifs et à la peroxydation lipidique subséquente induite par l'alloxane. Tandis que la morphologie générale des lésions hépatocytaires des rattes alloxanique avec l'extrait de *M. vulgare* était bien améliorée et semblait d'apparence tout à fait normale par rapport à celle des rattes alloxanique non traité. Des altérations histologiques similaires ont été observées par **Ghissi et al., (2015)** après traitement des rats Wistar par l'alloxane (D.U=120mg/kg pc) et à l'extrait aqueux de l'espèce végétale *Marrubium vulgare*.

Sur la base des preuves ci-dessus, l'action hépatoprotectrice de l'extrait aqueux *M. vulgare* pourrait être due à la présence d'antioxydants (type phénolique (87%) ou flavonoïde), à savoir la marrubiine, le marrubinol et le monoterpène comme l'acide marrubique présent chez *M. vulgare* qui ont une activité antioxydante prouvée.

Conclusion Générale

Conclusion générale

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante. Cet intérêt de ces plantes médicinales représentent d'une part une source inépuisable des substances et des composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Les liqueurs naturelles issues des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on peut attribuer un pouvoir antioxydant.

Notre travail a été pour l'objectif d'évaluer l'influence de la phytothérapie à base de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* avec des trois doses déférents (100,200 et 400 mg/kg pc) contre l'hépatotoxicité et ses complications chez les rattes *Wistar*.

L'analyse qualitative et quantitative de la plante montre que l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* est très riche en polyphénols, flavonoïdes, tanins, terpénoïdes, saponines et sucres réducteurs, ce qui pourrait représenter une nouvelle source potentielle des molécules bioactives ont un important effet thérapeutique.

Au cours de notre travail nous avons utilisé l'alloxane comme générateur des radicaux libres ce qu'il va nous permis d'évaluer l'effet de la plante *Marrubium vulgare* a ce fait on a marquée une augmentation des transaminases qui sont des biomarqueurs d'une cytolysse hépatique et on a marquée une déplétion en GSH qui conduit à une réduction de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT) ce qu'il va augmente le taux de la peroxydation lipidique.

Notre travail, s'est intéressé aux effets antioxydants de la liqueur des feuilles de *Marrubium vulgare* plantes largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde et sur tout en Algérie, le constat d'effet antioxydant de cette plante tirée par l'étude importée sur les marqueurs du stress oxydatifs. Ces derniers permis de mis en évidence une augmentation importante de l'activité de la CAT et en teneur du GSH hépatique, et réduction significative dans le taux de transaminase et a l'activité de GST et la dose la plus thérapeutique marquée chez le groupe alloxanique traité par la dose 200 mg/kg /j de la liqueur du *Marrubium vulgare* (gavage gastrique) donc cette plante joue un rôle chémoprotecteur contre l'hépatotoxicité induite par l'alloxane.

Alors d'après nos résultats on peut disposer la dose 200 mg/kg pc/j du liqeur des feuilles de la plante *Marrubium vulgare* comme un modèle thérapeutique pour prévenir l'hépatotoxicité et d'autres complications liées au stress oxydatif

En perspectives, il serait intéressant de développer cette recherche de point de vue opérationnel par approfondissement de la connaissance sur :

- L'identification de principes actifs de cette plante en utilisant des méthodes plus précises telles que HPLC et RMN.
- Approfondir les travaux et élargir le spectre d'étude pour connaître la dose toxique de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare*.
- Utiliser la dose 200 mg/kg pc/j comme une dose typique dans les médicaments supplémentaires pour éviter les effets secondaires sur l'hépatotoxicité d'un autre médicament.
- Valorisation de système phytothérapeutique réservé pour l'utilisation d'êtres humains.
- L'effet thérapeutique de l'extrait aqueux dans l'organisme.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Aebi., (1984).** Catalase. In L. Pacher (ED). Méthod in enzymology académie press. Oelamode, 105: 121-126.
2. **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. & Lomri, A. (2007).**Radicaux libres derives de l'oxygène et superoxydes dismutases: role dans les maladies rhumatismales. Revue du Rhumatisme. Vol. 74(7):637-638.
3. **Agence Nationale pour l'Aménagement du Territoire (A.N.A.T.). (2002).** Plan d'aménagement de la wilaya de M'sila. Tome 1 Alger : 4-9
4. **Akther, N., Shawl, A.S., Sarwat, S. , Chandan, B.K., Akhter M.(2013).** Hepatoprotective activity of Marrubium vulgare against paracetamol induced toxicity. journal of pharmacy research (7).565-570.
5. **Ankur, R. & Shahjad, A. (2012).** Alloxan induced diabetes: mechanism and effects. International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences. 3: 819-823.
6. **Anne, M. (1954).** Actions de l'intoxication alloxanique sur le foie de cobaye. institut d'histologie et d'embryologie de l'université de genève. *Anim.* 22: 2841-2842.
7. **APG III, (2009).**An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plantes: APG III. Bot. J. Linn. Soc.; 161: 105-121.
8. **Asquith T.N. & Butler, L.G., (1986).**Interaction of condensed tannins with selected protochemistry. Vol. 25(7): 1591-1593.
9. **Athamena, S. (2009).** Etude quantitative des flavonoïdes Des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mémoire de Magister en Biochimie Appliquée. Université El-hadj Lakhdar- Batna ,P:88.
10. **Awoyinka, O.A., Balogun, I.O. & Ogunnowo, A.A., (2007)** Phytochemical screening and in vitro bioactivity of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). J. Med. Plant. Res. Vol. 1(3) : 063-065.
11. **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M. and Gazin, M. (1996).**Oxigen species scavenging

- activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res.* 1-6.
12. **Barbosa, N., B V., Rocha, J., B T., Wandracek, D., Perottoni C., Zeni G. & Nogueira, W. (2006).** Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions.* 163: 230-238.
 13. **BAROUKI R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/SCiences.* Vol . 22(3): 266-72.
 14. **Benzahi, K. (2001).** Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la Plante cynodn Dactylon-L (chindent), Mémoire de magister. Université de Ouargla, P :15-17.
 15. **Bergmeyer, H.U., (1978).** *Clin Chem*, 24, 58-73. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80027.
 16. **Bioulac Sage, P. & Le Bail, B. (1991).** Anatomie normal histophysiologie. In : Tinto S 2001: Cirrhose et cancers primirifs du foie au centre hospitalier national yalgadoouedraogo de ouagadougou. Aspects épidémiologiques, cliniques et evolutifs . p 7. Université de Ouagadougou.
 17. **Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea L.*). *Revue de génie industriel* , 7, 35-45. En ligne : <http://www.revue-genie-industriel.info>.
 18. **Bonnefont-Rousselot, D., Therond P. & Delattre J.(2003).** Radicaux libres et antioxydants. P : 65
 19. **Boual, Z.(2009).** Contribution à l'étude des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien). Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah Ouargla. P:80.
 20. **Bouchet, A ; Couillert J 1983 :** Anatomie topographique, descriptive et fonctionnelle. In : Baghriche I 2011 : Etude anatomopathologique des cirrhoses ; p 17. Université Mentouri Constantine
 21. **Boudjelal, A.(2012).**Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie.DO Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée .p95.
 22. **Boudjelal, A., HENCHIRI, C., SIRACUSA, L., SARI, M. & RUBERTO, G. (2012).** Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare L.* infusion. *Fitoterapia* 83: 286–292.

23. **Boutlelis, D. A.(2014).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de Doctorat en Biologie végétale . Université Badji Mokhtar ANNABA, Algérie. 114 p.
24. **Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantities of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–54.
25. **Bruneton, J.(1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier ,Paris p :915.
26. **Burk, R.F. (2002).**Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care*. Vol. 5: 47-49.
27. **Butterfield, D.A., Pocernich, C.B. & DRAKE, J. (2002).** Elevated glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Drug. Disc.Res*. Vol. 56: 428-37.
28. **Cabanne, F. & Bonenfant, J. L. (1980).** Anatomie pathologique principes de pathologie générale et spéciale . Maloine SA. Paris
29. **Casing, D. & Veilham, L. (2008)** . Anatomie du foie et des voies biliaire. In : Baghriche I 2011 : Etude anatomopathologique des cirrhoses .p 17. Université Mentouri Constantine
30. **Center, S. A. (1993).** Feline hepatic lipidosis. In :Fromonot C 2001: Particularités de la pathologie hépatique chez le chat. p 11. Ecole Nation vétérinaire d'alfort
31. **Chebrouk, F.(2009).**Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium* desserti de la région de Ghardaïa. Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah Ouargla. P:76.
32. **Chenni, M., (2010).** Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryonia dioica* Jacq. Thèse de Magister. Université d'Oranes-Senia, Oran. Algérie. 138 p.
33. **Çitoğlu, G.S. & Aksit, F. (2002).** Occurence of marrubiin and ladanein in *Marrubium trachyticum* Boiss. from Turkey. *Biochem Syst Ecol*, 30:885–886.
34. **Clement, C., Scala-Bertola,J. & Gambier, N. (2010).**Petit pain N; Trechot: Unintentional overdose of paracetamol secondary to acute oral pain in a French hospital. In: Massfelder M-E 2014: De insuffisant hépatique au greff hépatique: Prise en charge odontologique; p 7. Université de lorraine

35. Collier, A., Wilson, R., Bredley, H., Thomson, J.A., Small, M. (1992). Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabet Med*;7:27-30.
36. Cuendet, M., Hostettmann, K. & Potterat, O. (1997). Iridoidglucosides with free radical scavenging properties from *Fagraeablumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.
37. D'Alteroche, L., Picon, L., Dorval, ED., Fimbel, B. & Raabe, JJ. (1995) Metman EH. Hépatite aiguë par exposition au plomb. *Gastroenterol Clin Biol*;19:962-3.
38. Dadoune, J-P. , Hadjiisky, P. , Siffroi, J-P. & Vendrely, E. (1990): Histologie ; p 278, (282-287) ; Flammarion. France
39. Dana, G., & Benichou, C.(1993). Causality assessment of adverse reactions to drugs_I.A novel method based on the conclusions of international consensus meetings : application to drug_induced liver injuries.j clin Epidemiol.46 :13-23-30
40. Deaton, C.M., Marlin, D.J. (2003). Exercise-associated oxidative stress, *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol. 2(3): 278 -291
41. Defraigne, J.O. & Pincemail, J., (2007). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liege*. Vol . 62 (4):1-10.
42. Delattre, J., Beaudoux, J L.& Bonnefont, R., (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Ed. Lavoisier, Paris. p 587.
43. Delattre, J., Durand, G. & Jardillier, J.C., (2003). Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Ed. Flammarion, Paris. 317p.
44. Dellile, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. p (5-29), (73-95), (126-156), (213-214) ; Berti. Alger
45. Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Ketaki, S., Saroj, S .&Lele, R.D., (2004).Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India (JAPI)*. Vol. 52.794- 804.
46. Djedioui, A. (2010). Evaluation de l'activité hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant de l'extrait aqueux d' *Inulaviscosa* ; une plante de l'Est Algérien chez le rat avec un diabète induit. Mémoire magister. Badji Mokhtar Université Annaba. p: 55.
47. Durand, G. & Beaudoux, J.L., (2011). Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. Ed. Lavoisier, Paris. 607p.
48. Elberry, A.A., Fathalla, M., Harraz, A., Ghareib, S., Ayman, A., Nagy S.A., Gabr, M.I. & AbdelSattar, E., (2010). antihepatotoxic effect of *Marrubium vulgare*

- and *Withania somnifera* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 1(4): 247-254.
49. **Emile, J F. ; Leteurte, E. & Guyétant, S. (2010)** : pathologie générale ; p (18-23) ,41 ; Masson E France
50. **Etuk EU. 2010.** Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol J N Am* 2: 130-134.
51. **Fadel, H., Benayache, F. & Benayache, S. (2016).** Antioxidant properties of four Algerian medicinal and aromatic plants *Juniperus oxycedrus L., Juniperus phoenicea L., Marrubium vulgare L. And Cedrus atlantica (Manetti ex Endl)* .*Der Pharmacia Lettre*, 8 (3):72-79.
52. **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus L.* organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*. 331: 372-379.
53. **Fang, J., Sawa, T., Maeda, H., (2003).** Factors and mechanism of EPR effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 519: 29-49.
54. **Faracif, M.& Didion, S.P. (2004).** Vascular Protection Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Thrombosis and Vascular Biology*. Vol 24:1373-1367.
55. **Fatima S., Mahmood R. 2007.** Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin Chim Acta*. 386: 94-9.
56. **Favier, A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Pp: 9-16.
57. **Favier, A. (2003)** - Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*: 108 - 115.
58. **Favier, M. & Hininger-Favier, I. (2005).** Zinc et grossesse. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* .Vol. 33(4):253-258.
59. **Fawcett, D. W. & Jensch, R. P. (1997).** *Histologie l'essentiel* ; p 331, 333 ; Maloine. Paris. Traduit par : Salzmann J L2002
60. **Ferrari R.C., Ceconi, S., Curello, A., Cargnoni, O., Alfieri, A., Pardini, P., Marzollo, O. Visioli., (1991).** Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am J Med*. Vol. 91(3):95-105.

61. **Flohel, G.(1984).** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, Vol. 105: 114-121.
62. **Floyd, R.A. (1990).** The role of 8-hydroxyguanosine in carcinogenesis. *Carcinogene*. Vol. 11: 1447-1450.
63. **Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®. Thèse de doctorat, UJF.198p.
64. **Gardes-Albert, M., Font-Rousselot, D.B., Abedinzadeh, Z. & Jore D. (2003)** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique*: 91 96.
65. **Gebhardt, R. (1992)** . Metabolic zonation of the liver : regulation and implications for liver fonction. In : Gandillet A 2004 : Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance hépatique .Université Louis pasteur Strasbourg .p (19-21).
66. **Gérard, A., (2012).** Histologie en Pratique, Faculté de Médecine .p :14
67. **Ghedadba1, N., Bousselfela, H., Hambaba1, L., Benbia, S. & Y. Mouloud .(2014)** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie* 12:15-24. DOI 10.1007/s10298-014-0832-z.
68. **Gimenez, F. , Baazier, M. , Calop, J , Dine, T. & Tchiakpé, L. (2000)** . Pharmacie clinique et thérapeutique . Masson. Paris. p 254
69. **Gines, P. , Cardenas, A. , Arroyo, V. & Rodes, J. (2004)** . Management of cirrhose and as cites. In: Restellini S ; Spahr L 2012 : Les tests non invasifs de fibrose vont ils remplacer la biopsie hépatique . Suisse. p 1411.
70. **Girotti A.W., (1998).** Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 3. Vol. 9: 1529-1542.
71. **Goudable, J. & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*. Vol.11(2): 115-120.
72. **Grankvist, K. , Marklund, SL. , Taljedal, B. (1981).** CuZn-superoxide dismutase, Mnsuperoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem*. 199: 393-398.
73. **Guilford, (1996).** Small animal gastroenterology. In : Antoine D-G 2005 : Index thérapeutique en hépatologie des carnivore domestiques . Ecole nationale veterinaire de Ly .p 56.

74. **Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B., (1974).** Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249(22), 7130-7139.
75. **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P., (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62(10), 628-638.
76. **Halliwell, B. (1996)** .Antioxidants in human health and disease. *Annu.Rev Nutr.*Vol. 16:33-50.
77. **Harborne, J.B.(1998).** *Phytochemical methods : a guide to modern techniques of plant analysis.* Ed. Chapman and Hall. London,302 p.
78. **Hashemi, M., Dostar, Y., Rohani, S., Saraji, A.& Bayat, M. (2009).**Influence of Aloxanes on the Apoptosis of Pancreas B-Cells of Rat. *World Journal of Medol ; Sciences ;* 4 (2): 70 73.
79. **Hazout, A., Menezo, Y., Madelenat, P., Yazbeck, C., Selva, J. & Cohenbacrie, P. (2008).** Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynécologie Obstétrique &Fertilité .* Vol. 36(11): 1109-1117.
80. **Henry, R.J., (1960).** *Am J clin Path.*, 34, 381-398. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80025.
81. **Himmerich, H., Kaufmann, C., Schuld, A. & Pollmacher, T., (2005).** Elevation of liver enzyme levels during psychopharmacological treatment is associated with weight gain, *Journal of Psychiatric Research.* 39: 35-42.
82. **Houlot R., (1984).** Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Ed. Maloine.1921, 225-227.
83. **Huk, I., Brokovich, V., Nanobashvili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partika, R., et al.(1998).** Bioflavonoid quercetin scavenger superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemia-reperfusion injury an experimental study. *Brit J Surg.* 85: 1080-1085.
84. **Humphreys, S.D.M., Rees, H.G. & Routledge, P.A (1999).** 1,2-Dibromoethane-a toxicological review. *Adverse Drug React Toxicol Rev;*18(3):125-48.
85. **Hunt, J., Wolf, S. (1991).**oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complication. *Free Rad Res Comm.* Vol.12(1):115-123.
86. **Jacotot, B.,(1997).**Vitamine E et athérosclérose. *Rev Méd Interne.* Vol. 15: 627-629.
87. **Jérôme, B. ,Nina, D. , Frédéric, O. & Paul, C. (2007)** .Caractéristiques et interprétation des tests sanguins de fibrose hépatique. In : Elyounssi M 2014 : Evaluation de la fibrose hépatique dans la prise en charge de l'hépatite B et C : Apport de fibrotest-Actitest ; p 2. Université Mohamed v-souissi

88. **Jones, A. L. & Spring-Mills, E. (1984).** The liver and gallbladder . In Modern Concepts of Gastrointestinal Histology, Weiss L. (éd.),. New York: Elsevier. p 706-748.
89. **Kaplowitz, N.(2002).**Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis.*22:137-44.
90. **Kebieche, M. (2009).** Thèse de Doctorat, Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L, effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. *Biol Med.* 38: 70-71.
91. **Keeffe, E. B. (2005).** Acute liver failure. *Rev Gastroenterol Mex.*, vol. 70, p. 56-62.
92. **Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M. & Gaetani, G.F. (1999).** Mechanisms of protection of catalase by NADPH .Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* Vol. 274:13908- 13914.
93. **Koehler-Ramonatxo, C. (2006)** Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique.* 20:165-177.
94. **Koppenol, W. H.(2001).**100 years of peroxynitrite chemistry and 11 years of peroxynitrite biochemistry. *Redox Rep.* ; 6(6) : 339-41.
95. **Lacolley, P. (2007).** Biologie Et Pathologie Du Cœur Et Des Vaisseaux. Ed. John Libbey Eurotext, Paris. 677p.
96. **Larrey, (2009).** Foie, médicaments et agents chimiques. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* **33**, 1136—1146 .doi:10.1016/j.gcb.2009.10.003
97. **Larrey, D. (2007).** Hepatotoxicity of psychotropic drugs and drug abuse. In: Kaplowitz N, DeLeve LD, editors. *Drug-induced liver disease.* Informa Healthcare. London: New-York;. p. 507-26.
98. **Lauwerys, RR (1999).** Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. 4^{ème} ed. Paris : Masson.149p.
99. **Lee, WM. (2003).**Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis;*23:217-26.
100. **Lenzen, S.(2008).**The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* P:216–220.
101. **Lenzen, S., Freytag, S. & Panten, U.(1988).** Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol* 34:395-400.
102. **Lenzen, S., Tiedge, M., Jorns, A. & Munday, R.(1996).** Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan P: 88-90.

103. **Leverve, X. (2009).** Stress oxydant et antioxydants. Cahiers de Nutrition et de Diététique. Vol. 44(5): 219-224.
104. **Leverve, X., Cosnes, J., Erny, P.& Hasselmann, M., (2001).** Traité de nutrition artificielle de l'adulte.Springer, France. 957p.
105. **Li, Y. , Cao, Z. , Zhu, H. & Michael, T.A. (2005).** Differential roles of 3H-1,2-dithiole-3-thioneinduced glutathione, glutathione s-transferase and aldose reductase in protecting against 4- hydroxy-2-nonenal toxicity in cultured cardiomyocytes . Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 439(1): 80-90.
106. **Liappas, I., Piperi, C., Malitas, P.N., Tzavellas, E.O., Zisaki, A., Liappas, A.I., Kalofoutis, C.A., Boufidou, F., Bagos, P., Rabavilas, A. & Kalofoutis, A., (2006).** Interrelationship of hepatic function, thyroid activity and mood status in alcohol-dependent individuals In vivo. 20: 293-300.
107. **Linford, N.J., Schriener, S.E. & Rabinovitch, P.S.(2006).** Oxidative Damage and Aging: Spotlight on Mitochondria .Cancer Res. Vol . 66(5): 2497-2499.
108. **Liozon, S. (2010) .** Cahier du préparateur en pharmacie : Pathologie. Ponphyre. France. p 80
109. **Lopez-Lazaro M., Martin-Cordero C., Ayuso M. 2000.** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poison. *Z. Naturforsch.* 55: 898-902.
110. **Lullmann-Rauch. (2008).**histologie. édition allemande. 449-46
111. **Majhenic, L., Kerget, M.S. & Knez, Z.(2007)**Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry.* Vol. 104(3): 1258-1268.
112. **Makhloufi, A .,Bouyahyaoui, A., Seddiki, N., Benlarbi, L., Mebarki, L. & Boulanouar, A.(2014).** *Inter. J. of Phytoth.,* 4(2), 95-100.
113. **Masoodi, M. H., Ahmed, B., Zargar, I. M., Khan, S. A., Khan, S. & Singh, P. (2008).** Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African J Biotechnol,* 7: 86-87.
114. **Meeks, R. G., Harrison, SD. & Bull RJ. (1991).** Hepatotoxicology. Boca Raton (Florida): CRC Press, 700 p.
115. **Michailova, (1998).** Comparative assessment of liver function in workers in the petroleum industry. *Int. Arch.Occup. Environ. Health.* 71: 46-49.
116. **Milcent, R. & Chau, F., (2003).** Chimie organique hétérocyclique : Structure fondamentale, chimie et biochimie des principaux composés naturels. Ed. Francois chau EDP. Paris. France. 846p.

117. **Mohammedi, Z. (2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen Algérie. p 60.
118. **Morin D., Thiery H., Spedding M., Tillement J. 2001.** Mitochondria as target for antiischemic drugs. *J. Physiol Pharmacol.* 13: 22-67.
119. **Navarro, VJ. & Senior, JR. (2006).** Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 354:731-9.
120. **Nawwar, M.A.M., El-Mousallamy, A.M.D., Barakat, H.H., Buddrus, J. & Linscheid M. (1989).** Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry*, 28: 3201–3206
121. **Niosh (1994).** Pocket Guide to chemicals hazards. US Government Printing Office, Ed US Department of Health and Human Services Publications. US Government Printing Office. 94-116p.
122. **Ogeturka, M., Kusa, I., Colakoglu, N., Zararsiza, I., Ihanc, N., Sarsilmaz, M., (2005).** Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 97 : 273–280.
123. **Papoutis, Z., Kassi, E., Mitakou, S., Aligiannis, N., Tsiapara A. & Chrousos, G.P. (2006).** Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J. Steroid Biochem Mol Biol*, 98: 63–71.
124. **Petit, C. (1992)** .Foie et médicaments. In : Fromonot C 2001: Particularités de la pathologie hépatique chez le chat ; p 11. Ecole Nation vétérinaire d'alfort.
125. **Powell, S.R. (2000).** The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* Vol. 130: 1447-1454.
126. **Price K.R., Johnson T.I. & Fenwick G.R. (1987).** The chemistry and biological significance of saponins in food and feeding stuffs. *Crit Rev Food Sci Nutr.* Vol. 26: 22-48.
127. **Quinlan, G., Gutteridge, J. (1988).** Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids, carbohydrates carbohydrates in the presence of iron and copper salts. *Biol Med.* 5: 341-342.
128. **Renuka, B., Rajurkar, Z.H. & Govind, T.G. (2003).** Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science.* Vol. 85(9): 1355-1360.

129. **Rey-Grobellet, X. Eeckhoutte, C. & Sutra, JF.(1996).** Alvinerie M, and Galtier P Major involvement of rabbit liver cytochrome P4501A in thiabendazole 5-hydroxylation. *Xenobiotica* 26:765–778.
130. **Rosalki, S., (1993).** *Clin Chem*, 39(4), 648-652. Cité par fiche technique SPINREACT. Réf. 1001130.
131. **Rotruck J., Pope A., Ganther H., Swanson A., Hafemen D. & Hoekstra G. (1973).** Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179: 588-590.
132. **Rousseau, P.A.J., (1978).** Intérêt diagnostique du dosage de certains enzymes plasmatiques en pathologie hépatique bovine : Etude bibliographique expérimentale. Thèse de doctorat : vétérinaire. Université Paris-Est Créteil. 89 p.
133. **Rusch, GM. (1997).** Liver abnormalities and hydro-chloro-fluoro-carbons. *Lancet*;350:1248;discussion 1249-50.
134. **Sahpaz, S., Hennebelle, T. & Bailleul, F., (2002).** Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Natural Product Letters*. 16(3): 195-9.
135. **Sawadogo, B. B. N. , Diba, B. P. & Calés, (2007).** Physiopathologie de la cirrhose et de ses complication. In : Elyounssi M 2014 : Evaluation de la fibrose hépatique dans la prise en charge de l'hépatite B et C : Apport de fibrotest-Actitest .Université Mohamed v souissi .p 2
136. **Schlörff E., Husain K., Somani S. 1999.** Dose-and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*. 17: 97-105.
137. **Schuppan, D. , Ruell, M. , Somosundaram, R. & Hahn, E. G. (2001) .** Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. In : Restellini S ; Spahr L 2012 : Les tests non invasifs de fibrose vont ils remplacer la biopsie hépatique . Suisse. p 1411
138. **Shaffer, E.A. & Myers, R.P.(2005).** Principes fondamentaux de gastroentérologie États pathologiques et démarches thérapeutiques, 5ème édition, Janssen-Ortho Inc, 556-559 p.
139. **Sharma A., Kharb S., Chugh S., Kakkar R. 2000.** Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E Supplementation in diabetic patient. *Metabolism*. 49: 160-162.
140. **Siberngal, S. & Lang, F. (2000).** Atlas de poche de physiopathologie; Flammarion. Paris;. p 34

141. **Singh, U. , Singh, S. & Kochhar, A. (2012).** Therapeutic potential of antidiabetic nutraceuticals. *Phytopharmacology*; 2(1) 144-169.
142. **Sivanandham, V. (2011).** Free radicals in health and diseases - a mini review. *Pharmacologyonline*. Vol. 1: 1062-1077.
143. **Sorge, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. Vol. 327(7): 649-662.
144. **Szkudelski, T. (2001).** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 50: 543-546.
145. **Tessier, F. & Marconnet P.(1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*. Vol. 10: 1-13.
146. **Thomson, A. B. R. & Shaffer, E. (2000).** First principles of gastroenterology : the basis of disease and an approach to management, 3e éd. Canadian Association of Gastroenterology, AstraZeneca Canada Inc., 662 p.
147. **Tirichine, H.S.(2010).** Etude ethnobotanique, activité antioxydante et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) du Sud-Est algérien. Thèse de Magister en Biologie. Université d'Oranes-Es Senia, Oran Algérie. 88 p.
148. **Tolman, KG (2007).** Dalpiaz AS. Occupational and environmental hepatotoxicity. In: Kaplowitz N, DeLeve LD. Editors. Drug-induced liver disease. New-York, London: Informa Healthcare;. p. 755-70.
149. **Toussaint J.F., Jacob M.P., Lagrost L. & Chapman J.(2003).** L'athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. Ed.Elsevier Masson. Paris. 776 p.
150. **Trocello, J.M., Chappuis, P., EL Balkhi, S., Poupon, J., Leyendecker, A., Chainea, P. & Woimant, F., 2010.** Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. *Médecine Interne* .Vol. 31: 750-756.
151. **Vanshuijs, F. J. (1994).** Chirurgie du système biliaire extra-hépatique. In : Fromonot C 2001: Particularités de la pathologie hépatique chez le chat Ecole Nation vétérinaire d'alfort. p 11.
152. **Vertuani, S., Angusti, A.& Manfredini, S. (2004).** The Antioxidants and Pro Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*. Vol. 10: 1677-1694.
153. **Vuorela, S. (Ed.). (2005).** Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Finland: Helsinki.

154. **Walters, M., & Gerarde, H., (1970).** *Microchem J*, 15, 231-243. Cité par fiche technique BIOLABO. Réf. 80403.
155. **Wang, H.X., Ng, T.B., (1999).** *Natural products with hypoglycemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and anti thrombotic activities.* *Life Sciences* 65: 2663-2677.
156. **Watkins, D., Cooperstein, S.J., Lazarow A.1964.** Effect of alloxan on permeability of pancreatic islet tissue in vitro. P 22.
157. **Weckbercker, G., Cory, J.G.(1988).** Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*,
158. **Wolf, A. M. (1989)** . Feline hépatic disease. In : Fromonot C 2001: Particularités de la pathologie hépatique chez le chat ; p 11. Ecole Nation vétérinaire d'alfort
159. **Yagi, K. (1976).** Simple fluorimetric essay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* Vol. 15: 212-216.
160. **You, H.J., Kim, J.Y. & Jeong, H.G., (2003).** 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 303(17): 1129-1134.
161. **Zidi S. (2009).** Contribution à l'étude de l'effet antidiabétique potentiel d'un extrait aqueux de *Crataegus azarolus* Chez des rats Wistar avec un diabète induit à l'alloxane. *J. Ethnopharmacol.* 90: 243-244.

ANNEXE



Figure : Préparation des extraies aqueux de *Marrubium vulgare* (photo Originale, 2018)

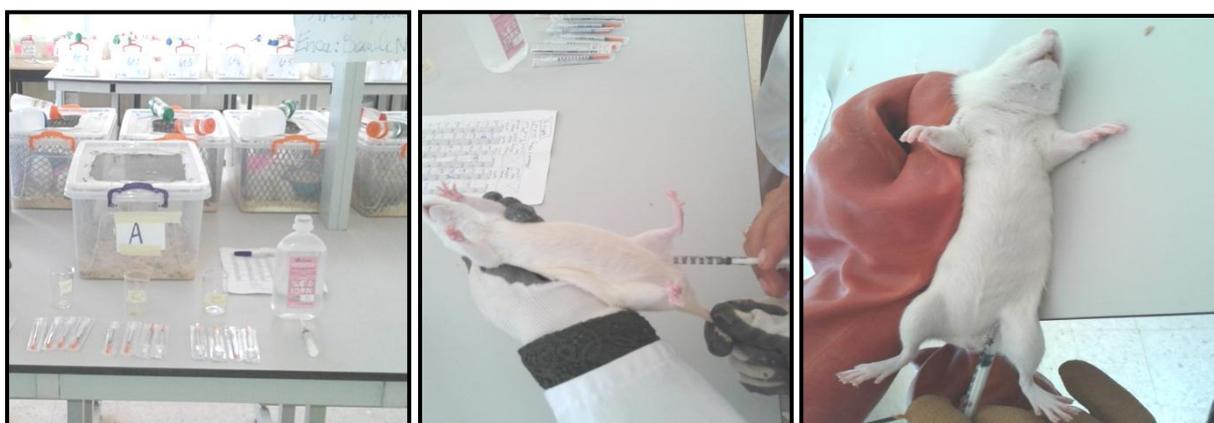


Figure: Injection intrapéritonéale d'alloxane pour induction du l'hépatotoxicité (photo Originale, 2018)

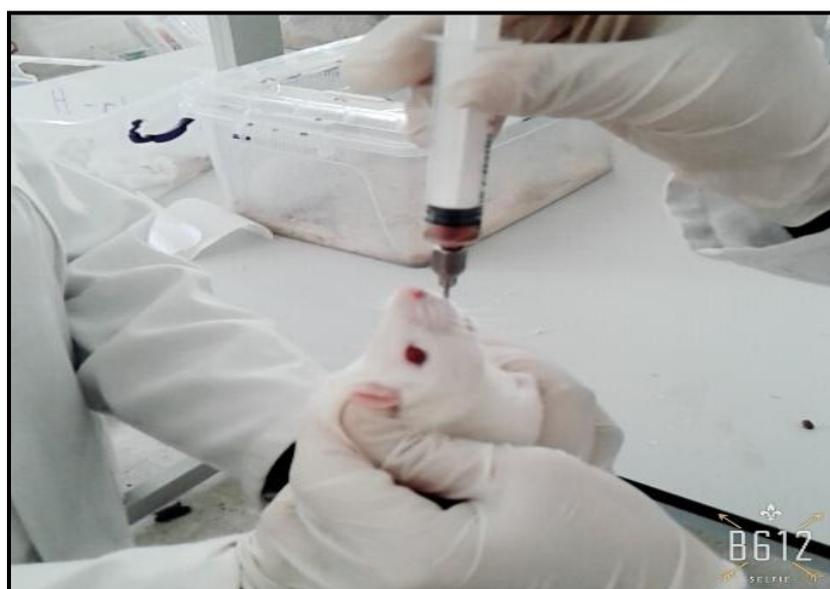


Figure : Administration des extraits par gavage gastrique (photo Originale, 2018)

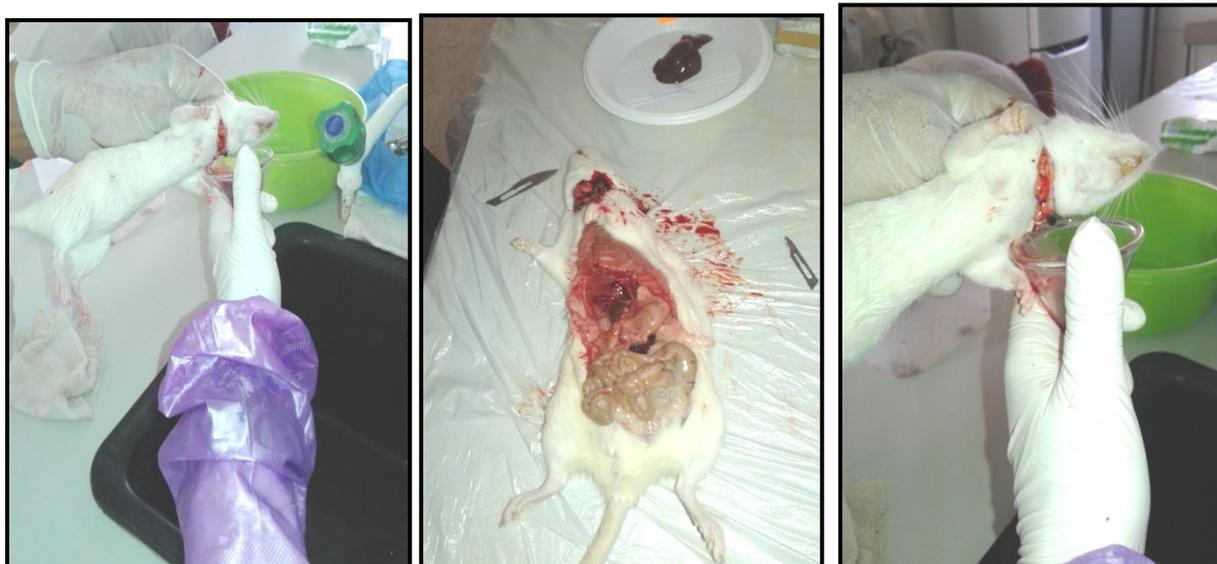


Figure: Sacrifice des rattes et prélèvement les organes (photo Originale, 2018)

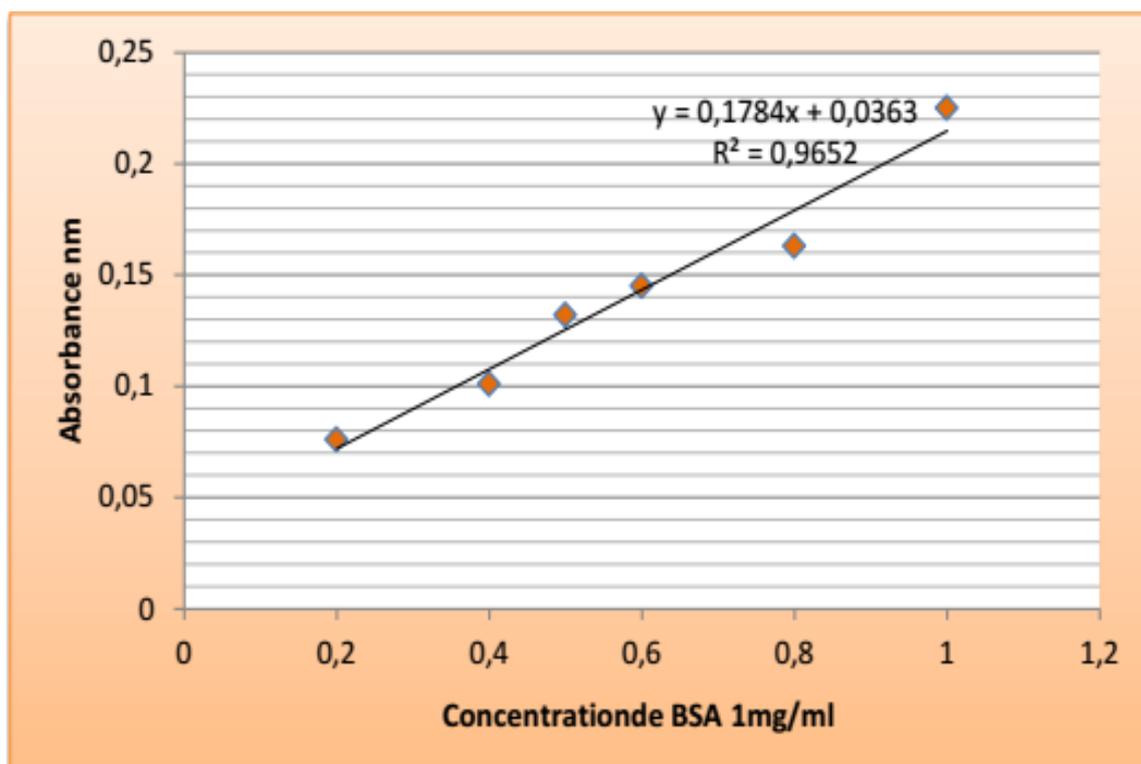


Figure: Courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines tissulaire. (photo originale, 2018)



Figure: Évaporateur rotatif de type Büchi Rotavapor R-200 (photo originale, 2018)



Figure: Centrifugeuse horizontale de type SIGMA (photo originale, 2018)



Figure: Bain-marie de type MEMMERT (photo originale, 2018)



Figure : Spectrophotométrie à transmission moléculaire de type UV- VIS -1240
(photo Originale,2018)

Résumé

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'évaluer l'activité antioxydante et l'effet antihépatotoxique de l'extrait aqueux de feuilles de *Marrubium vulgare*, sur un modèle des rattes *Wistar* rendu intoxiqué par injection intrapéritonéale d'une dose unique de 120 mg/kg pc d'alloxane. L'étude réalisée sur 30 rattes de la souche *Wistar* albinos répartis en six groupe de cinq rattes chacun dont le premier lot sert de témoin (T), le second subit une gavage gastrique de la liqueur de *Marrubium vulgare* 100mg/kg/j, le 3ème subit une injection unique d'alloxane 120 mg/kg pc, et les 3 derniers lots ont subit une combinaison d'injection ; alloxane 120 mg/kg pc dose unique et des différentes doses de *Marrubium vulgare* 100 mg /kg/j, 200 mg/kg/j et 400 mg/kg/j spécifique à chaque lot et ceci pendant 21 jours. Le screening phytochimique est essentiel afin d'identifier les composés existant dans l'extrait aqueux. La teneur en phénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait a été déterminée par des méthodes de Folin-Ciocalteu, chlorure d'aluminium. L'activité antioxydant de l'extrait issus de la *Marrubium vulgare* selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydant remarquable de l'ordre 0,010mg/ml. l'administration de traitement par gavage un fois par jour pendant 21 jours a révélée , une diminution significative de l'activité enzymatique des transaminases, de la phosphatase alcaline, la bilirubine totale et le protéine γ GT chez les trois doses de traitement par l'extrait aqueux. D'autre part l'administration de l'extrait aqueux est également amélioré le statut de stress oxydant dans le tissu hépatique. En effet, la diminution des concentrations de l'MDA et de GST avec une augmentation du taux de GSH et l'activité de la catalase dans le foie des rattes traités par les trois doses de l'extrait aqueux plus précise la dose de 200mg/kg pc. Finalement, l'examen histologique du tissus hépatique a révélé une amélioration des lésions hépatocytaires des rattes alloxanique traité par rapport à celle des rattes alloxanique non traité. En conclusion, le *Marrubium vulgare* a un effet antihépatotoxique et dispose la dose de 200 mg/kg/j comme un model thérapeutique

Mots clés: Alloxane, stress oxydant, *Marrubium vulgare*, Antioxydante, Antihépatotoxique, tissu hépatique.

ملخص

يهدف عملنا إلى دراسة النشاطية المضادة للأكسدة من جهة وتأثير المضاد لتسمم الكبد من جهة أخرى للمستخلص المائي لأوراق نبات المريوة *Marrubium vulgare* والتي طبقت على جردان من نوع ويستار ، اصبحت مسممة عن طريق حقنها بجرعة واحدة من الالوكسان 120ملغ/كغ. أجريت هذه الدراسة على 30 جرد مقسمة إلى ستة (6) مجموعات نوات خمسة جردان: المجموعة الأولى الشاهد , الثانية الشاهد المعالج بالالوكسان 120ملغ/كغ , الثالثة الشاهد المعالج بالمريوة *Marrubium vulgare* 100ملغ/كغ , وثلاثة مجموعات محقونة 120 ملغ/كغ من مادة الالوكسان مع جرعات مختلفة من المريوة *Marrubium vulgare* على التوالي: 100ملغ/كغ , 200ملغ/كغ , 400ملغ/كغ و كل هذا لمدة 21 يوم. توصلنا من خلال الدراسة الكيميونباتية للمستخلص المائي وذلك بإتباع طريقة Folin-Ciocalteu و كلوريد الألومونيوم. كما تم تحديد النشاطية المضادة لأكسدة للمستخلص المريوة *Marrubium vulgare* عن طريق حصر الجذور الحرة DPPH حيث أن هذا المستخلص المائي لديه تأثير على النشاطية بنسبة 0.010 ملغ/مل. المعالجة بالمستخلص المائي مرة في اليوم لمدة 21 يوم أدت إلى انخفاض ملحوظ في نشاط إنزيمات الترانساميناس ، الفوسفاتاز القلوي، والبيليروبيين الكلي والبروتين GGT عند المعالجة بتركيز الثلاثة للمستخلص المائي . من ناحية أخرى أدى كذلك إلى تحسين معايير الإجهاد التأكسدي على مستوى النسيج الكبدي. ومنه نقصان تركيز بيروكسيد الدهون MDA و في مستوى GST مع زيادة في مستوى الجلوتاثيون وفي نشاط الكاتالاز في كبد الجردان المعالجة بالتركيز الثلاثة المختلفة للمستخلص المائي بالتحديد التركيز 200ملغ/كغ. وأخيراً ، أظهر الفحص النسيجي لأنسجة الكبد تحسناً على مستوى الخلايا الكبدية في الفئران المعالجة بالالوكسان مع المستخلص المائي مقارنة بالفئران التي لا يتم علاجها بالمستخلص . في الختام ، *Marrubium vulgare* له تأثير مضاد لتسمم الكبد ويمكن اعتبار جرعة 200 ملغ / كغ / يوم كنموذج علاجي.

الكلمات المفتاحية: ألو كسان ، الإجهاد التأكسدي ، *Marrubium vulgare* ، مضادات الأكسدة ، مضاد لتسمم الكبد. نسيج الكبد.