

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
People's Democratic Republic of Algeria
The Minister of Higher Education and Scientific Research
ⵜⴰⴳⴷⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵜⴰⵏⴻⵙⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ ⵏ ⵜⴰⵎⴳⴷⴰⵢⵜ

ABOU BEKR BELKAID UNIVERSITY
TLEMCEM
FACULTY OF MEDICINE- Dr. B. BENZERDJEB
PHARMACY DEPARTMENT



جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
كلية الطب - د. ب. بن زرجب
قسم الصيدلة

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

THÈME :

**Etude *In vitro* de l'influence de l'huile essentielle de la plante
Marrubium vulgare sur la toxicité du Glucantime® sur le globule rouge**

Présenté par :

MEHDAOUI Walid
BOUDGHENE STAMBOULI Mohamed El hadi

Soutenu le
09/07/2023

Jury

Présidente :

Pr/ MEZIANE Zakia

Professeur en Médecine du travail

Membres :

Pr/ TABET ZATLA Amina

Maitre de conférences A en Chimie

Dr/ BENALLAL Bouchra

Maitre de conférences B en Biophysique médicale

Dr/ KRID Meryem

Pharmacienne assistante en Toxicologie

Encadrante :

Pr/ N. BRIKCI NIGASSA

Maitre de conférences A en Biophysique médicale

Année universitaire : 2022-2023

Dédicace

Je dédie ce travail :

À mes parents pour leur sacrifice, leur amour, leur sagesse, leur accompagnement par la prière et leur soutien tout au long de mes études sans lassitude.

Ils m'ont permis de devenir la personne que je suis.

Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

À mes chères sœurs.

À ma famille.

À mes meilleur(e)s ami(e)s BELLOUATI Nordjihane Halima et TABET AOUEL Abderrahmane pour leur soutien et leur encouragement.

À mon binôme El hadi

Qui a partagé avec moi tous les moments de stress, de fatigue, d'échec et même de joie lors de la réalisation de notre mémoire.

Je lui souhaite un bon courage pour la suite.

Merci à tous ceux qui ont contribué au succès de ce travail, de près ou de loin

W. MEHDAOUI

Dédicace

Le voyage est terminé... Il n'était pas facile et il n'était pas censé l'être... Quelle que soit sa longueur, il passera avec ses douceurs et ses épreuves, et me voici maintenant, avec l'aide d'Allah, en train de terminer cette œuvre.

Je dédie mon travail :

À celui qui m'a élevé et lutté pour moi...Et à celui dont je porte le nom avec fierté... J'implore Allah de prolonger ta vie pour voir les fruits dont la récolte arrive après une longue attente, ... Mon cher père.

À la source du bonheur et l'exemple de la patience et tendresse... À celle dont la prière est le secret de ma réussite ... À celle qui m'a guidé et accompagné dans tous les voyages de ma vie et continue de le faire jusqu'à présent... Ô Allah, protège-la et accorde-lui pardon et bien-être... Ma chère mère.

À mon frère et sœurs, et mes neveux, que Dieu les protège.

À mes cousins Anes et Hakim et a tous mes amis surtout Nazih, Mehdi et Mohamed

À travers les rires partagés, les moments de complicité et les épreuves surmontées ensemble, vous avez prouvé votre valeur inestimable

À mon binôme Walid pour sa patience sa résilience et sa compréhension tout au long de ce projet, maintenant que notre travail touche à sa fin, je suis convaincu que tes compétences exceptionnelles et ta passion te mèneront vers de nouveaux sommets.

H.boudghene stambouli

Remerciement

Tout d'abord, on tient à remercier Pr BRIKCI NIGASSA Nawel, notre encadrante, de nous avoir guidé et soutenu pendant cette année et on est particulièrement reconnaissant de la confiance qu'elle nous a accordé tout au long de ce travail. Nos remerciements les plus sincères vont ainsi à toute l'équipe du laboratoire central de service de biochimie.

Nous exprimons notre gratitude à Pr MEZIANE Zakia d'avoir accepté la présidence du jury.

Nous tenons à remercier sincèrement Dr BENALLAL Bouchra et Dr KRID Meryem, qui ont accepté d'examiner et de juger ce travail.

On remercie chaleureusement Pr TABET ZATLA Amina ainsi à tous les membres du laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO) pour la confiance qu'ils nous ont accordé.

On vous remercie aussi pour avoir accepté de participer comme étant membre de jury.

Les travaux de cette thèse ne peuvent être réalisés sans la collaboration avec Dr Benoussar Nesrine Fatima Zohra au sein du laboratoire PPABIONUT (Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la nutrition). Nous aimerions exprimer notre reconnaissance pour sa gentillesse et ses précieux conseils qui nous ont grandement aidés dans l'accomplissement de ce travail.

Nous exprimons notre gratitude envers TRIQUI Ibtihal et KHEDIM Niemat El Kawther, pour leur contribution et leur assistance cruciale dans la réalisation de ce projet.

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE I : LEISHMANIOSE 2

I.1	DEFINITION	3
I.2	HISTORIQUE	3
I.3	DISTRIBUTION DE LEISHMANIOSE	3
I.3.1	<i>Dans le monde</i>	3
I.3.2	<i>En Algérie</i>	4
I.4	CLASSIFICATION	5
I.5	TAXONOMIE	6
I.6	MORPHOLOGIE	6
I.6.1	Stade promastigote	6
I.6.2	Stade amastigote	6
I.7	ULTRA-STRUCTURE	6
I.8	VECTEUR	7
I.9	RESERVOIR.....	8
I.10	CYCLE PARASITAIRE DE LEISHMANIOSE.....	8
I.11	LES DIFFERENTES FORMES DES LEISHMANIOSES ET LEURS MANIFESTATIONS CLINIQUES	9
I.11.1	<i>Leishmaniose visceral (LV) (Kala Azar)</i>	9
I.11.2	<i>Leishmaniose cutanée (LC)</i>	10
I.11.3	<i>Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)</i>	11
I.11.4	<i>Autres formes de la leishmaniose</i>	11

CHAPITRE II: LE GLUCANTIME 12

II.1	INTRODUCTION	13
II.2	PRESENTATION DU MEDICAMENT GLUCANTIME®	13
II.2.1	<i>Principe actif</i>	13
II.2.2	<i>Excipients</i>	13
II.2.3	<i>Classe thérapeutique</i>	14
II.3	STRUCTURE CHIMIQUE	14
II.4	PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES, CONDITION DE STOCKAGE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI	14
II.5	PHARMACOCINETIQUE	16
II.5.1	<i>Absorption</i>	16
II.5.2	<i>Distribution</i>	16
II.5.3	<i>Métabolisme</i>	16
II.5.4	<i>Demi-vie et élimination</i>	16
II.6	MECANISME D'ACTION.....	16

II.7	POSOLOGIE ET MODE D'ADMINISTRATION.....	17
II.8	PRECAUTIONS D'EMPLOI.....	17
II.9	TOLERANCE DU PRODUIT	18
II.9.1	<i>La stibiointolérance</i>	18
II.9.2	<i>La stibiointoxication</i>	18
II.10	EFFETS INDESIRABLES ET CONTRE-INDICATIONS.....	18
II.11	TOXICITE.....	20
II.11.1	<i>Intoxication aigue</i>	20
II.11.2	<i>Intoxication chronique</i>	20
II.12	PREMIERS GESTES ET PRINCIPES DE TRAITEMENT	20
II.13	INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES	20
II.14	RESISTANCE AUX DERIVES DE L'ANTIMOINE	21
II.15	RAPPEL SUR LES RADICAUX LIBRES, STRESS OXYDATIF ET LES	
ANTIOXYDANTS	22
II.15.1	<i>Les radicaux libres</i>	22
II.15.2	<i>Le stress oxydatif</i>	26
II.15.3	<i>Les antioxydants</i>	27
II.16	RAPPEL SUR LES GLOBULES ROUGES ET L'HEMOLYSE	30
II.16.1	<i>Globule rouge</i>	30
II.16.2	<i>L'hémolyse</i>	35

CHAPITRE III : MARRUBIUM VULGARE..... 36

III.1	DESCRIPTION DE LA PLANTE.....	37
III.1.1	<i>Description systématique</i>	37
III.1.2	<i>Nomenclature</i>	37
III.1.3	<i>Description botanique</i>	37
III.2	REPARTITION GEOGRAPHIQUE	38
III.3	COMPOSITION CHIMIQUE	39
III.3.1	<i>Métabolites secondaires</i>	39
III.3.2	<i>Huiles essentielles</i>	40
III.3.2.1	Définition	40
III.3.2.2	Localisation des huiles essentielles.....	41
III.3.2.3	Propriétés physico-chimiques des HE.....	41
III.3.2.4	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i>	41
III.3.2.5	Facteurs de variabilité des huiles essentielles	42
III.3.3	<i>Extraction des huiles essentielles</i>	42
III.3.3.1	Extraction par hydrodistillation	42
III.3.3.2	Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	43
III.3.3.3	Hydro diffusion	44
III.3.3.4	Extraction par solvants	44
III.3.3.5	Extraction par micro-ondes	44

III.3.4	Utilisation traditionnelle	45
III.3.5	Propriétés pharmacologiques de <i>Marrubium vulgare</i> L.....	46
<i>PARTIE PRATIQUE</i>		59
<i>MATERIELS ET METHODES</i>		50
1	PROBLEMATIQUE	51
2	BUT	51
3	OBJECTIFS.....	51
3.1	<i>Objectif principal</i>	51
3.2	<i>Objectif secondaire</i>	51
4	CRITERES DE L'ETUDE	52
5	MATERIEL VEGETAL	52
6	MATERIEL BIOLOGIQUE	53
7	MATERIELS DU LABORATOIRE	54
8	METHODES	59
8.1	<i>Extraction des huiles essentielles</i>	59
8.2	<i>Préparation des solutions du travail</i>	60
8.3	<i>Préparation de l'échantillon</i>	63
8.4	<i>Préparation des tubes à doser</i>	65
<i>RESULTATS ET INTERPRETATIONS</i>		72
1	RENDEMENT	73
2	RESULTATS DU DOSAGE DES PARAMETRES ETUDIEES	74
<i>DISCUSSION</i>		91
<i>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</i>		95
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>		97

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation

A : Absorbance

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ATP : Adénosine triphosphate

BAL : British Anti Lewisite

CAT : Catalase

°C : Degré Celsius

D : Densité optique

DNPH : Dinitro-phénylhydrazine

DO : Densité optique

DMSA : Acide dimercaptosuccinique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTNB : Acide-dithiodis-nitrobenzoïque

ECG : Electrocardiogramme

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

G : Glucantime®

GTP : Guanosine triphosphate

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

Hb : Hémoglobine

HE : Huile essentielle

h : Heure

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineuse

J : Jour

K+ : Potassium

LC : Leishmaniose cutanée

LCM : Leishmaniose cutanéomuqueuse

LCN : leishmaniose cutanée du Nord

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique

LDH : Lactate déshydrogénase

LV : Leishmaniose viscérale

M : Molaire

MDA : Malondialdéhyde

mg/kg : Milligramme par kilogramme

mg/kg/jr : Milligramme par kilogramme par jour

mg/L : Milligramme par litre

min : Minute

mmol : Millimole

mmol/L : Millimole par litre

mL : Millilitre

µg/mL : Microgramme par millilitre

µL : Microlitre

µmol/L : Micromole par litre

µmol/L : Micromole par litre

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène

NFS : Numération Formule Sanguine

NR : Non radical

nm : Nanomètres

OMS : Organisation mondiale de la santé

pH : Potentiel Hydrogène

PKDL : Leishmaniose Dermique Post-kala-azarique

R% : Rendement en huile essentielle

ROS : Reactive oxygen species

SOD : Superoxyde dismutase

SFME : Solvant-Free Microwave Extraction

T : Temps

TPBS : Tampon Phosphate Buffered Saline

TBA : Acide thio-barbiturique

TCA : Acide trichloracétique

TGO : Transaminase glutamique oxalacétique

TGP : Transaminase glutamique pyruvique

Tr/min : Tours par minute

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Listes des tableaux

Tableau I: Syndromes cliniques associés aux différentes espèces de <i>Leishmania</i>	5
Tableau II: Propriétés physicochimiques, condition de stockage et précautions d'emploi.....	15
Tableau III: Effets indésirables et contre-indications du Glucantime®.....	19
Tableau IV: Principales sources des ERO endogènes et exogènes	23
Tableau V: Principales ERO radicalaires et non-radicalaires.....	24
Tableau VI : Les deux catégories de défenses antioxydantes: les mécanismes enzymatiques et les nutriments antioxydants	27
Tableau VII: Valeurs normales du nombre de globules rouges par litre (en millions)	30
Tableau VIII: La numération globulaire	35
Tableau IX: La classification botanique de la plante <i>Marrubium vulgare</i> L.	37
Tableau X: Principaux métabolites secondaires isolés à partir de la plante <i>M.vulgare</i>	39
Tableau XI: Différentes utilisations traditionnelles de <i>Marrubium vulgare</i>	45

Liste des figures

Figure 1: Répartition mondiale des leishmanioses cutanées, mucocutanées et viscérales.....	4
Figure 2: Distribution géographique des deux formes de leishmaniose en Algérie	5
Figure 3: Illustration cellulaire de <i>Leishmania</i> sp	7
Figure 4: <i>P. Papatasi</i> femelle.....	7
Figure 5: Les réservoirs de leishmaniose en Algérie	8
Figure 6: Cycle parasitaire de <i>Leishmania</i>	9
Figure 7: Vue d'un jeune garçon atteint de la leishmaniose viscérale (<i>kala-azar</i>)	10
Figure 8: Lésions cutanées erythémo-squameuse à <i>L. major</i>	10
Figure 9: Lésions cutanées ulcère-croûteuse à <i>L. killicki</i>	10
Figure 10: Lésions nodulaires causées par <i>L. infantum</i>	10
Figure 11: Lésions caractéristiques de la leishmaniose mucocutanée.....	11
Figure 12: Méglumine antimoniate (<i>Glucantime®</i>).....	13
Figure 13: Structure chimique de stibogluconate de sodium (<i>Pentostam®</i>) et de l'antimoniate de méglumine (<i>Glucantime®</i>)	14
Figure 14: Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de <i>Leishmania</i> à l'antimoine	21
Figure 15: Représentation de la formation d'un radical libre	22
Figure 16: Processus de formation des espèces réactives de l'oxygène	25
Figure 17: Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (<i>Stress oxydant</i>)	26
Figure 18: Représentation des pathologies liées au stress oxydant.....	26
Figure 19: Processus de stabilité des radicaux libres	27
Figure 20: Structure chimique de la vitamine C	29
Figure 21 : Réaction d'oxydoréduction de la vitamine C.....	29
Figure 22: La structure du globule rouge.....	31
Figure 23: La structure de la membrane érythrocytaire	32
Figure 24: Les échanges transmembranaires	33
Figure 25: La pompe Na^+ / K^+	34
Figure 26: Structure de l'hémoglobine	34
Figure 27: Marrube blanc (<i>Marrubium vulgare L.</i>)	38
Figure 28: Métabolites secondaires isolés à partir de la plante <i>Marrubium vulgare</i>	40
Figure 29: Structure de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Marrubium vulgare</i>	42
Figure 30: Montage d'extraction par hydrodistillation	43
Figure 31: Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	43
Figure 32: Montage d'extraction par hydrodiffusion.....	44
Figure 33: Extraction par micro-ondes	45
Figure 34: Photos de l'espèce <i>Marrubium vulgare L.</i> (Original).....	53
Figure 35: Localisation du site de récolte de l'espèce <i>Marrubium vulgare L.</i>	53
Figure 36: Hydrodistillateur type Clevenger au laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO).....	54
Figure 37: Ionogramme type RAPIDE Point 500 au laboratoire du service de néphrologie.....	54
Figure 38: Spectrophotomètre type JENWAY 7315 au laboratoire du service de biochimie.	55

Figure 39: Automate SIEMENS type ADVIA 1800 au laboratoire du service de biochimie.	56
Figure 40: Centrifugeuse type HuMax14K Human au laboratoire du service de biochimie.	56
Figure 41: Agitateur magnétique type HEIDOLPH au laboratoire du service de biochimie.	57
Figure 42: Vortex HumaTwist (Human) au laboratoire du service de biochimie.	57
Figure 43: Montage d'hydrodistillation au laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO).	59
Figure 44: Conservation de notre huile essentielle dans un pilulier.	60
Figure 45: Préparation de la solution mère.	61
Figure 46: Papier <i>pH</i> qui indique une valeur de 7,4.	62
Figure 47: Préparation de la solution fille.	62
Figure 48: Préparation de la solution du travail.	63
Figure 49: Préparation des suspensions cellulaires filles.	64
Figure 50: Agitation des suspensions cellulaires à l'aide d'un agitateur magnétique.	65
Figure 51: Préparation des tubes à dose	65
Figure 1: Séparation entre le culot et le surnageant.	65
Figure 53: Préparation des tubes du dosage de LDH, potassium et d'hémoglobine extracellulaire.	66
Figure 54: Préparation des tubes du dosage des paramètres du stress oxydatif.	66
Figure 55: Tubes contenant le surnageant.	68
Figure 56: Les réactifs du dosage de l'hémoglobine.	68
Figure 57: Les cuves de spectrophotomètre.	68
Figure 58: Condition du travail à l'abri de la lumière.	68
Figure 59: Concentration de [k+] intracellulaire.	74
Figure 60: Concentration de [k+] intracellulaire.	75
Figure 61: Concentration de [k+] intracellulaire.	75
Figure 62: Concentration de [k+] intracellulaire.	76
Figure 63: Concentration de [k+] intracellulaire.	76
Figure 64: Concentration de [k+] intracellulaire.	77
Figure 65: Concentration de [k+] intracellulaire.	77
Figure 66: Concentration de [k+] intracellulaire.	78
Figure 67: Concentration intracellulaire de LDH.	78
Figure 68: Concentration intracellulaire de LDH.	79
Figure 69: Concentration intracellulaire de LDH.	80
Figure 70: Concentration intracellulaire de LDH.	80
Figure 71: Concentration intracellulaire de LDH.	81
Figure 72: Concentration intracellulaire de LDH.	81
Figure 73: Concentration intracellulaire de LDH.	82
Figure 74: Concentration intracellulaire de LDH.	82
Figure 75: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.	83
Figure 76: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.	83
Figure 77: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.	84
Figure 78: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.	84
Figure 79: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.	85

Figure 80: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.....	85
Figure 81: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.....	86
Figure 82: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.....	86
Figure 83: Activité de la catalase en présence et en absence de l'HE de la plante <i>Marrubium vulgare L.</i>	87
Figure 84: Différence des concentrations du [GSH] en présence et en absence de l'HE de la plante <i>Marrubium vulgare L.</i>	88
Figure 85: Taux du MDA en présence et en absence de l'HE de la plante <i>Marrubium vulgare L.</i>	89
Figure 86: Teneur des protéines carbonylées en présence et en absence de l'HE de la plante <i>Marrubium vulgare L.</i>	90

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des infections parasitaires à transmission vectorielle par le phlébotome femelle hématophage. Elles sont causées par des parasites protozoaires flagellés du genre *Leishmania* qui touche l'homme et certains animaux (anthropozoonoses).

Selon L'OMS 350 millions de personnes sont exposées à ce risque dans un total de 98 pays dont l'Algérie⁽¹⁻³⁾.

La leishmaniose est une maladie à déclaration obligatoire. La forme cutanée est la forme la plus courante⁽⁴⁾, mais la forme viscérale reste la plus sévère et mortelle.

L'antimoniote de méglumine (Glucantime®) est le produit le plus utilisé pour le traitement de la leishmaniose au Maghreb. Cependant, il présente plusieurs effets secondaires néfaste pour la santé⁽⁵⁾.

Afin de trouver des moyens efficaces dans le traitement de la leishmaniose plusieurs études ont testé divers approches thérapeutiques qu'elles soient médicamenteuses comme la paromomycine ou physiques comme la cryothérapie associée ou non au Glucantime®⁽⁵⁾.

Vu que les plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, nous proposons d'étudier et évaluer l'effet protecteur d'une plante de la famille des Lamiacées appelée *Marrubium vulgare* sur le Glucantime® afin de réduire ses effets indésirables.

CHAPITRE I :

LEISHMANIOSE

LEISHMANIOSE

I.1 Définition

C'est une parasitose qui touche l'homme et certains mammifères causée par des protozoaires du genre *Leishmania*. La pique du phlébotome femelle infectée est souvent incriminée et la maladie présente des manifestations cliniques diverses selon l'espèce responsable mais en général elles sont subdivisées en trois formes courantes :

La leishmaniose viscérale, cutanée et cutanéomuqueuse ⁽⁶⁾.

I.2 Historique

En 1860, un médecin du nom d'Hamel a identifié la maladie à Biskra ⁽⁷⁾. Deux ans plus tard, un autre cas de la maladie fut appelé "clou de Biskra", a été publié à Laghouat ⁽⁸⁾.

En 1900, William Leishman a découvert le parasite responsable de la leishmaniose viscérale⁽⁹⁾.

En 1910, les frères Sergent ont rapporté le premier cas de leishmaniose canine à Alger, suivi de près par la découverte de la maladie en Kabylie par Lemaire en 1911⁽¹⁰⁾.

En 1921, les frères Sergent ont établi le rôle des phlébotomes en tant que vecteurs de la maladie⁽¹¹⁾.

En 1926, avec quelques volontaires les frères sergent ont expérimenté sur eux-mêmes le développement de la maladie en appliquant sur leur peau des femelles de *P. papatasi* capturées vivantes à Biskra⁽¹¹⁾.

En 1987, Linson et Show ont découvert le genre *Viannia*⁽¹²⁾.

Vers 2004-2005 la localité d'El M'Hir située sur le versant nord de l'Atlas tellien a été la première commune touchée par une épidémie à *L. major*⁽¹³⁾.

I.3 Distribution de leishmaniose

I.3.1 Dans le monde

Bien que la maladie ait été initialement découverte en Inde, les leishmanioses sont répandues à travers le monde, avec une aire géographique globalement intertropicale, mais qui s'étend également dans les zones tempérées d'Afrique du Nord, du sud de l'Europe et d'Asie.

La maladie est endémique dans 98 pays, dont 72 sont classés comme des pays en développement. Environ 350 millions de personnes sont exposées au risque de leishmanioses dans le monde, et l'incidence annuelle est estimée entre 1,5 et 2 millions de cas, dont un demi-million pour la

LEISHMANIOSE

leishmaniose viscérale et 1,5 million pour la leishmaniose cutanée et la leishmaniose cutanéomuqueuse⁽¹⁴⁾.

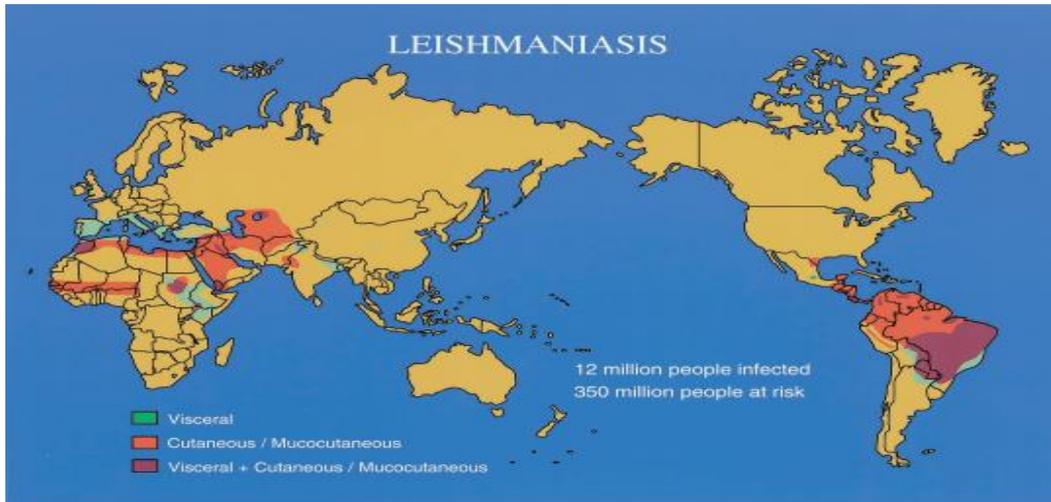


Figure 2: Répartition mondiale des leishmanioses cutanées, mucocutanées et viscérales⁽¹⁵⁾.

I.3.2 En Algérie

En Algérie, deux formes cliniques de leishmanioses sévissent à l'état endémique, la leishmaniose viscérale due à *L. infantum* et les leishmanioses cutanées qui sont dues à trois espèces: *L. infantum*⁽¹⁶⁾, *L. major*^(17, 18) et *L. killicki*⁽¹⁹⁾.

La leishmaniose cutanée est distribuée comme suit :

Leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) à *L. major* se trouve dans les zones arides et semi-arides. Les foyers anciennement connus sont Biskra à l'Est et Abadla à l'Ouest⁽²⁰⁾.

La leishmaniose cutanée du Nord (LCN) à *L. infantum* s'étend tout au long du littoral et du Tell algérien et sa répartition géographique se confond avec celle de la leishmaniose viscérale allant d'Oran et Tlemcen à l'Ouest jusqu'à Annaba et Sétif à l'Est⁽²¹⁾.

La leishmaniose viscérale s'étend sur tout le Nord du pays au niveau des étages bioclimatiques humide. Le foyer le plus actif reste celui de la Grande Kabylie qui regroupe à lui seul près de 50% des cas^(21, 22).

LEISHMANIOSE

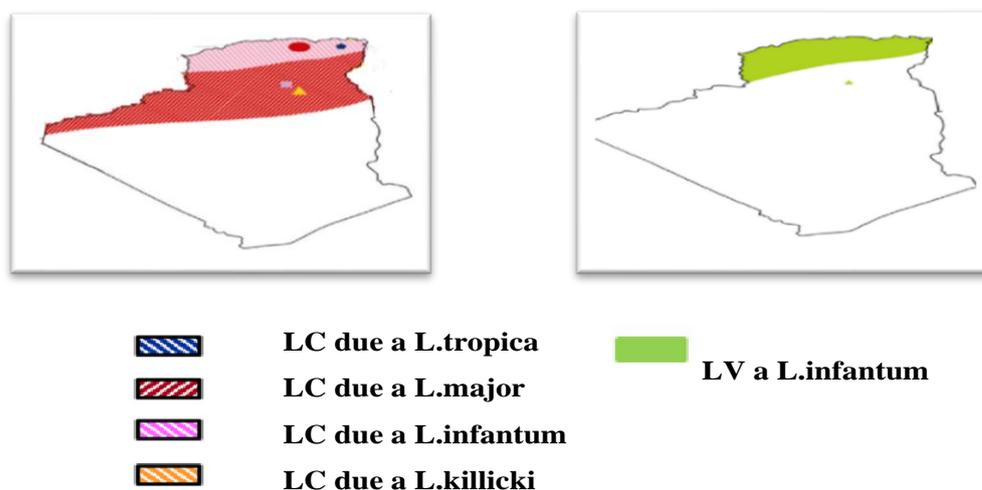


Figure 3: Distribution géographique des deux formes de leishmaniose en Algérie ⁽¹⁴⁷⁾

I.4 Classification

Les syndromes cliniques associés aux différentes espèces de *Leishmania* sont présentés ci-dessous (voir tableau I) :

Tableau I: Syndromes cliniques associés aux différentes espèces de *Leishmania*^(6, 23).

Syndromes cliniques	Espèces de <i>Leishmania</i>
Leishmaniose viscérale (VL) ou Kala-azar	L. (L.) DONOVANI L. (L.) INFANTUM / CHAGASI
Leishmaniose cutanée Post-kala-azarique (PKDL)	L. (L.) DONOVANI L. (L.) INFANTUM / CHAGASI
Leishmaniose cutanée (CL) (Ancien Monde)	L. (L.) MAJOR L. (L.) KILLICKI L. (L.) TROPICA L. (L.) ARABICA L. (L.) AETHIOPICA
Leishmaniose cutanée (CL) (Nouveau Monde)	L. (L.) MEXICANA L. (L.) VENEZUELENSIS L. (L.) AMAZONENSIS L. (V) GUYANENSIS L. (V) PANAMENSIS L. (V) PERUVIANA
Leishmaniose cutanéomuqueuse (MCL)	L. (V) BRAZILIENSIS

REMARQUE : (L.) = sous-genre *Leishmania* ; (V) = sous-genre *Viannia*

I.5 Taxonomie

D'après Levine et al,⁽²⁴⁾ :

- Règne : Protista
- Phylum : Sarcomastigophora
- Classe : Zoomastigophorea
- Ordre : Kinetoplastida
- Famille : Trypanosomatidae
- Genre : Leishmania
- Sous-genre : Leishmania
- Sous-genre : Viannia

I.6 Morphologie

Les leishmanias se présentent chez leurs hôtes successifs (mammifères et insectes) sous deux stades morphologiques distincts : les amastigotes et les promastigotes

I.6.1 Stade promastigote

La forme promastigote extracellulaire est d'aspect allongé et possède un flagelle libre qui lui permet une mobilité active. Son corps est entouré d'une membrane externe et présente un noyau et un kinétoplaste. Il s'agit de la forme présente dans le tube digestif du phlébotome vecteur ainsi que la formeensemencée en milieu de culture^(6, 25).

I.6.2 Stade amastigote

Les amastigotes intracellulaires sont des petits corpuscules arrondis ou ovalaires ; possédant un flagelle très court qui ne dépasse pas le corps cellulaire. On l'observe chez l'homme et les mammifères vertébrés⁽²⁶⁾.

I.7 Ultra-structure

Les leishmanies sont des parasites unicellulaires avec des organites simples comme le noyau, le flagelle et l'appareil de Golgi. Elles sont munies d'un kinétoplaste caractéristique.

LEISHMANIOSE

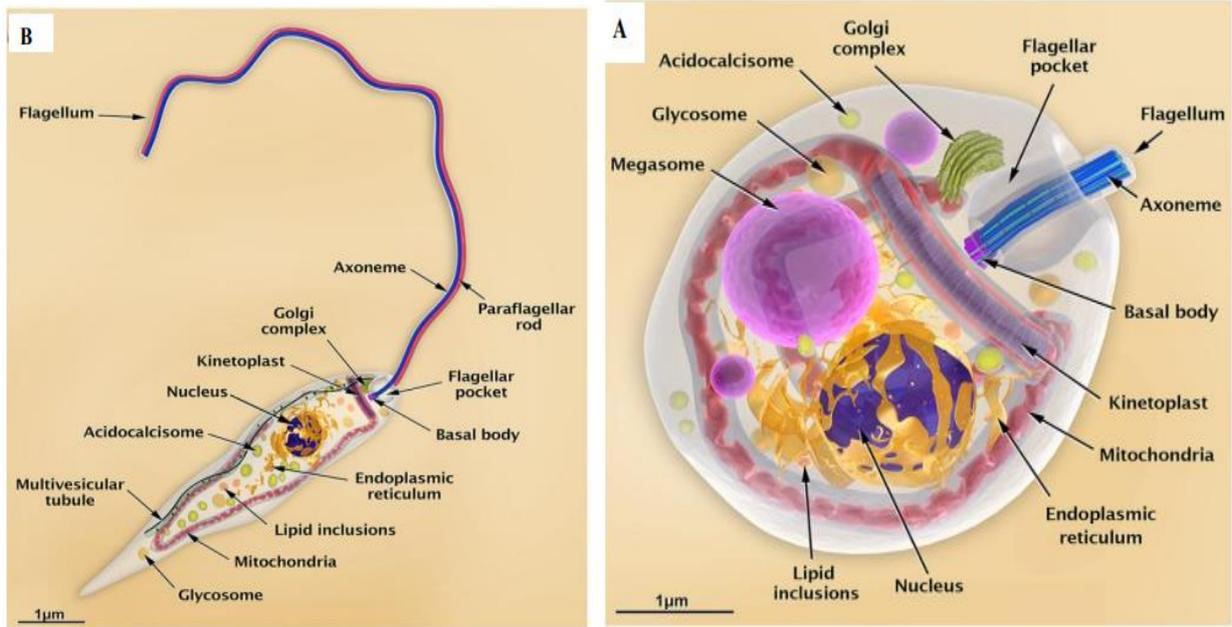


Figure 4: Illustration cellulaire de *Leishmania* sp⁽²⁷⁾.

(A) Ultrastructure d'un amastigote (B) Ultrastructure d'un promastigote.

I.8 Vecteur

Le phlébotome est le transmetteur exclusif de la maladie. Il s'agit d'un insecte diptère qui appartient à la famille des Psychodidae sous-famille de Phlebotominae qui comprend plusieurs genres principalement : *Phlebotomus* et *Sergentomyia* pour l'ancien Monde ; *Lutzomyia*, *Warileya* et *Brumptomyia* pour le nouveau Monde. Seule la femelle est hématophage⁽²⁸⁾.



Figure 5: *P.Papatasi* femelle⁽²⁹⁾.

En Algérie, *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus perfiliewi*, sont responsable de la transmission de la maladie. c'est par contre *Phlebotomus papatasi*, vecteur de *L. major*, agent de la leishmaniose cutanée zoonotique qui domine⁽³⁰⁾.

LEISHMANIOSE

I.9 Réservoir

Le rôle des animaux est fondamental pour la persistance de la maladie dans la nature, souvent les 2 types de leishmaniose, viscérale et cutanée, sont associés à leur propre type de réservoir animal, kala-azar avec les chacals, les renards ou d'autres canidés sauvages et la leishmaniose cutanée avec différents types de rongeurs. Cette distinction n'est pas absolue, en Afrique tropicale des rongeurs ont bien été connectés à des souches viscérales, et le chien plus tard a été trouvé lié avec les 2 formes⁽³¹⁾.

En Algérie, la leishmaniose viscérale admet le chien comme réservoir et la leishmaniose cutanée zoonotique est représentée essentiellement par deux rongeurs sauvages, *Psammomys obesus* et *Meriones shawi*⁽³²⁾.



Figure 6: Les réservoirs de leishmaniose en Algérie^(33, 34)

I.10 Cycle parasitaire de leishmaniose

La leishmaniose est transmise par la piqûre des phlébotomes femelles infectés lors de leur repas de sang. Au moment de la piqûre, des larves infectieuses appelées promastigotes métacycliques sont déposées dans la peau et sont ensuite phagocytées par les macrophages, où elles se transforment en amastigotes.

Les amastigotes se multiplient à l'intérieur des cellules infectées et se propagent dans différents tissus, en fonction de l'espèce de *Leishmania* impliquée. Ses différentes localisations tissulaires entraînent des manifestations cliniques variées selon les formes de leishmaniose.

Les phlébotomes deviennent à leurs tours infectés lorsqu'ils se nourrissent sur un hôte déjà infecté et ingèrent des macrophages contenant des amastigotes. Dans l'intestin du phlébotome, les parasites se transforment en promastigotes, se multiplient et se différencient en promastigotes méta-cycliques. Ces derniers migrent ensuite vers la trompe du phlébotome, prêts à être transmis à un nouvel hôte lors d'une nouvelle piqûre, et le cycle se perpétue ainsi⁽³⁵⁾.

LEISHMANIOSE

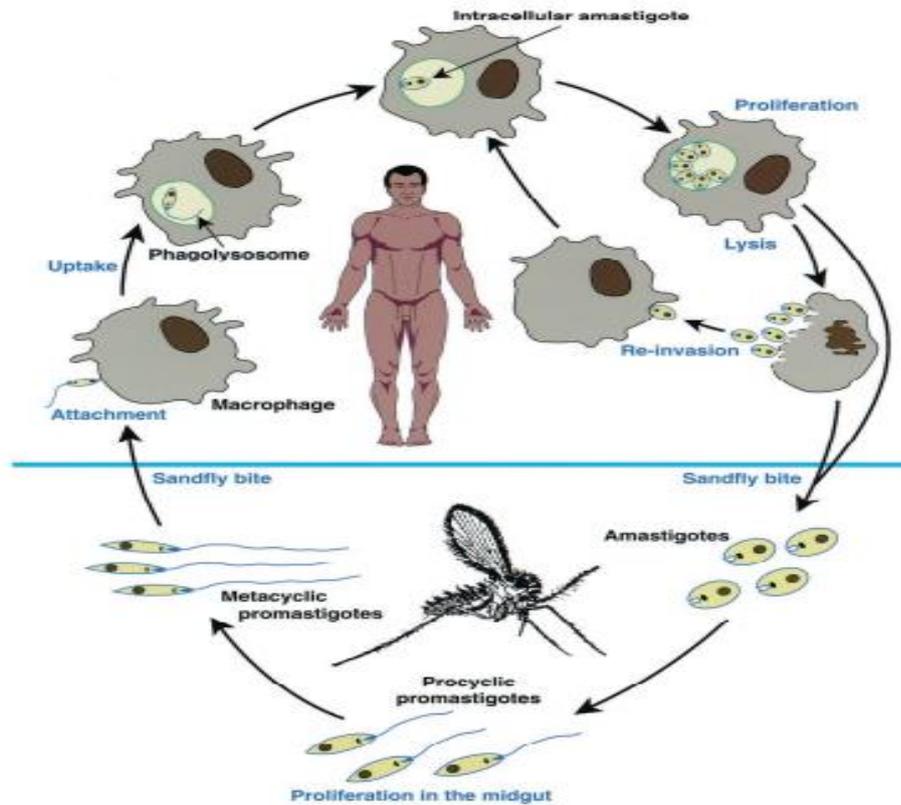


Figure 7: Cycle parasitaire de Leishmania⁽¹⁵⁾.

I.11 Les différentes formes des leishmanioses et leurs manifestations cliniques

Les leishmanioses se présentent sous trois formes cliniques la L. viscérale, la L. cutanée et la L. cutanéomuqueuse :

I.11.1 Leishmaniose viscérale (LV) (Kala Azar)

Elle est causée par différentes espèces dont L. donovani et L. infantum. C'est une forme grave en absence du traitement spécifique.

La triade clinique typique observée dans la leishmaniose viscérale comprend une fièvre irrégulière, souvent qualifiée de "fièvre folle", une altération de l'état général et une splénomégalie. Ces symptômes sont généralement accompagnés d'une pâleur qui témoigne de l'anémie, des adénopathies peuvent également être observées chez des patients infectés par L. donovani, mais sont moins fréquentes lorsque L. infantum est en cause.

LEISHMANIOSE



Figure 8: Vue d'un jeune garçon atteint de la leishmaniose viscérale (kala-azar)⁽³⁶⁾.

I.11.2 Leishmaniose cutanée (LC)

C'est une forme caractérisée par une atteinte exclusive de la peau, localisée au site d'inoculation du parasite par le phlébotome. Les lésions peuvent présenter un polymorphisme dans leurs caractéristiques cliniques⁽³⁷⁾.



Figure 9: Lésions cutanées érythém-squameuse à *L. major*⁽³⁸⁾.



Figure10: Lésions cutanées ulcère-croûteuse à *L. killicki* ⁽³⁸⁾.



Figure 11: Lésions nodulaires causées par *L. infantum*⁽³⁸⁾.

LEISHMANIOSE

I.11.3 Leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM)

Elle débute par une ulcération à l'endroit de la piqûre puis s'étend aux muqueuses du nez, de la bouche et du pharynx pour aboutir à une destruction tissulaire partielle ou totale.



Figure 12: Lésions caractéristiques de la leishmaniose mucocutanée⁽³⁹⁾.

I.11.4 Autres formes de la leishmaniose

- La leishmaniose canine
- La co-infection Leishmania-VIH
- Leishmaniose cutanée post Kala-azar (PKDL)

CHAPITRE
II : LE GLUCANTIME

II.1 Introduction

Aujourd'hui et depuis 50 ans, les dérivés pentavalents de l'antimoine (DPA) reste le traitement de référence pour les leishmanioses viscérales (LV) et de la majorité des formes tégumentaires (LT). Il existe deux spécialités sous forme d'organométalliques : la méglumine antimoniate – Glucantime® et le sodium stibogluconate – Pentostam ®. c'est le Glucantime ® qui est le plus utilisé dans la région méditerranéenne et possède aussi une AMM vétérinaire^(40, 41).

Ces traitements présentent plusieurs effets indésirables qui surviennent au début et en fin de cure donc c'est important que le patient doit être hospitalisé et surveillé attentivement⁽⁴²⁾.

II.2 Présentation du médicament Glucantime®

Le Glucantime® est un produit issu de la réaction de l'antimoine Sb pentavalent avec la N-méthyl-D-glucamine, un dérivé glucidique. Il existe sous forme d'une boîte de 5 ampoules de 5 ml correspondant à 1,5 g d'antimoniate de méglumine, à usage parentéral^(43, 44).



Figure 13: Méglumine antimoniate (Glucantime®)⁽⁴⁵⁾.

II.2.1 Principe actif

- Méglumine antimoniate⁽⁴³⁾.

II.2.2 Excipients

- Eau pour préparations injectables

Excipients à effet notoire

- Potassium disulfite,
- Sodium sulfite anhydre⁽⁴³⁾.

II.2.3 Classe thérapeutique

Antiparasitaires ; Antileishmaniens⁽⁴³⁾.

II.3 Structure chimique

L'antimoniote de méglumine (Glucantime®) et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) sont obtenus par synthèse, chimiquement voisins, ils ont une efficacité et une toxicité comparables⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Formule brute

Antimoniote de méglumine : $C_7 H_{18} NO_8 Sb$.

Stibogluconate de sodium : $C_{12}H_{35}Na_3O_{26}Sb_2$.

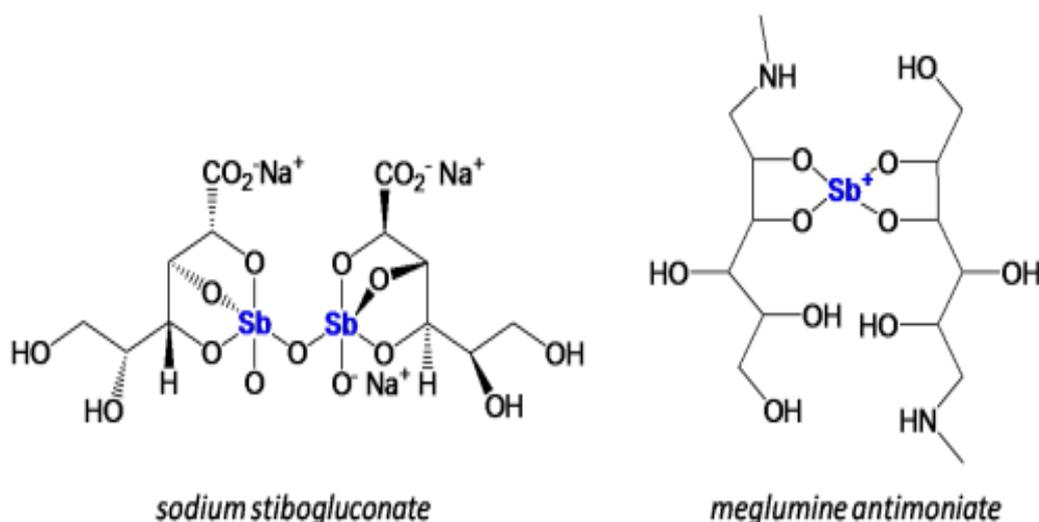


Figure 14: Structure chimique de stibogluconate de sodium (Pentostam®) et de l'antimoniote de méglumine (Glucantime®)⁽⁴⁹⁾.

II.4 Propriétés physicochimiques, condition de stockage et précautions d'emploi :

Les propriétés physico-chimiques ainsi que les conditions de stockage et les précautions d'emploi du Glucantime® et de Pentostam® sont représentés dans le tableau ci-dessous (voir tableau II) :

Tableau II: Propriétés physicochimiques, condition de stockage et précautions d'emploi^{(48, 50) (43, 51-53)}.

	Propriétés				Condition de stockage et précautions d'emploi
	Couleur	Forme	Masse molaire	Description	
Antimoniato de méglumine (Glucantime®)	Blanche	Cristaux	366 g/mol	-Soluble dans l'eau ; -Insoluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme ; -Le pH est compris entre 6 et 7.	-Il doit être conservé à l'abri de la chaleur et l'humidité. -Durée de conservation est généralement 3 ans. - La solution est limpide, donc il faut bien agiter les ampoules avant utilisation et cela en cas de présence de petites particules ; si ces derniers persistent, éviter de l'utiliser.
Stibogluconate de sodium (Pentostam®)	Blanche	Cristaux	910,9 g/mol	-Très soluble dans l'eau ; -Insoluble dans l'alcool et l'éther ; -Le pH de la solution est compris entre 5 et 5,6.	-Il doit être conservé à 25°C à l'abri de la lumière et la chaleur. - Ne pas jeter les médicaments dans le drainage à fin d'éviter la contamination de l'environnement.

II.5 Pharmacocinétique

II.5.1 Absorption

L'absorption digestive de l'antimoniote de N-méthyl glucamine est nulle, donc une injection par voie parentérale est obligatoire. Un pic sérique de 10 µg / mL est atteint en quinze minutes après administration IM de 10 mg/Kg d'antimoine pentavalent^(41, 54).

II.5.2 Distribution

Le temps de distribution est de 51 minutes⁽⁴¹⁾.

La pénétration d'antimoine dans le corps se fait par la circulation sanguine où il se répartit différemment suivant la valence. Il est distribué et stocké dans divers compartiments corporels notamment dans les organes et les tissus mous vascularisés. De plus il montre une forte affinité pour la rate et le sang, l'accumulation de l'antimoine dans le sang est due à la forte affinité de l'antimoine trivalent III pour les globules rouges. Toutefois, la façon dont l'antimoine trivalent se comporte en solution et dans les fluides corporels reste mal comprise^(54, 55).

L'affinité de l'antimoine pour l'hémoglobine des érythrocytes et sa toxicité peut être expliquée par sa forte affinité pour les groupes thiols (groupement SH) présents dans les chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine, sans que ces derniers soient bien compris^(54, 56, 57).

II.5.3 Métabolisme

La différence d'activité *In vitro* et *in vivo* des antimonies pentavalents est due à sa réduction en forme trivalente puisque ces derniers n'ont pas d'action parasiticide directe sur les leishmanies⁽⁴⁸⁾.

II.5.4 Demi-vie et élimination

La demi-vie de l'antimoniote de méglumine est très courte varie selon la voie d'administration avec une élimination rapide par voie urinaire (plus de 80 % est excrété sous forme inchangée dans les urines, dans les 6 heures qui suivent l'administration)^(43, 51, 58).

II.6 Mécanisme d'action

L'action de l'antimoine sur les leishmanies consiste à inhiber la synthèse de l'ATP, l'oxydation glycolytique et le métabolisme des acides gras. Cependant le mécanisme d'action demeure mal connu. Il s'agit de prodrogues activées *in vivo* par le métabolisme des leishmanies.

Glucantime®

En effet, ces derniers réduisent le SbV en SbIII qui est la forme active et toxique pour le parasite expliquant le temps de latence de l'action antiparasitaire. Par contre, le site exact de cette réduction et les mécanismes sous-jacents restent aussi inconnus. Les composés trivalents de l'antimoine semblent interagir avec le métabolisme des thiols, induisant ainsi une fragmentation de l'ADN. D'autres études ont suggéré que les antimoniés pentavalents inhibent spécifiquement l'ADN topoisomérase de *Leishmania*, qui agit sur le métabolisme des purines pour favoriser l'épuisement de l'ATP et du GTP, réduisant par la suite l'énergie du parasite. En outre, les antimoines favorisent l'élimination des parasites en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent accroître la capacité phagocytaire des monocytes et des neutrophiles, augmentant ainsi la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les phagocytes.

Le SbIII interrompt l'équilibre redox et le mécanisme de protection contre les espèces réactives de l'oxygène. Enfin, il peut entrer en compétition avec le zinc ce qui modifie les interactions avec les acides nucléiques et induit la mort du parasite par apoptose^(40, 46, 58, 59).

II.7 Posologie et mode d'administration

Selon le service de dermatologie CHU Tlemcen la posologie du Glucantime® est la suivante :

- Adultes : 60 mg/kg/jr avec une dose maximale de 100 mg/kg/jr
- Enfants : 30 mg/kg/jr

La posologie augmente progressivement en commençant par un quart le premier jour puis la dose totale à partir du 4^{ème} jour avec une durée de traitement de 15 jours. Si nécessaire, cette cure peut être renouveler après une pause de 15 jours^(60, 61).

II.8 Précautions d'emploi

Il est important de réaliser un bilan pré-thérapeutique pour s'assurer que le patient ne présente aucune pathologie qui peut s'aggraver par l'administration du Glucantime®. Les examens incluent :

- L'évaluation de la fonction rénale : urémie, créatinémie
- La chimie des urines
- La fonction hépatique : TGO-TGP, phosphatases alcalines
- La radiographie thoracique (Téléthorax)
- ECG, NFS et Bilan d'hémostase

Glucantime®

Pendant la période du traitement il est crucial de surveiller attentivement les paramètres biologiques tels que : les indicateurs d'hémolyse (LDH et Hb), des taux élevés en ces deux paramètres exigent l'arrêt du médicament. De plus, il est important d'administrer une alimentation riche en protéines tout au long du traitement, et de corriger si possible toute carence en fer avant le début du traitement ^(43, 48, 51, 60).

II.9 Tolérance du produit

Généralement, cette molécule a une bonne tolérance bien que les accidents mortels restent possibles. Par conséquent, l'hospitalisation est obligatoire et systématique. Il est important de noter que la tolérance au Glucantime® varie d'un individu à l'autre et on décrit classiquement deux tableaux d'intoxication : la stibiointolérance et la stibiointoxication⁽⁶¹⁾.

II.9.1 La stibiointolérance

La stibiointolérance est une réaction précoce, bénigne qui apparaît dès les premières injections et régresse lorsque le traitement est suspendu, elle n'est pas liée à un surdosage. Ses symptômes incluent une hypersensibilité immédiate avec des signes à type de décalage thermique (frissons et hyperthermie), des douleurs articulaires et musculaires, des vomissements, des maux de tête, une toux quinteuse, des éruptions cutanées et des placards érythémateux aux sites d'injection isolés ou associés. Ces réactions cutanées sont étroitement liées aux excipients du médicament particulièrement une contamination par les métaux lourds impurs⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾.

II.9.2 La stibiointoxication

La stibiointoxication quant à elle, survient en fin de traitement, voire même après l'arrêt de celui-ci, et traduit un surdosage. Les signes d'intoxication comprennent notamment des troubles cardiaques tels qu'une bradycardie avec un allongement de l'intervalle QT qui sont généralement réversibles et disparaissent à l'arrêt du traitement. Il peut également y avoir des perturbations du bilan hépatique, ainsi qu'une atteinte rénale, pancréatique ou hématologique. La sévérité de ces manifestations est dose dépendante ^(62, 63, 65).

II.10 Effets indésirables et contre-indications

Le tableau suivant représente les effets indésirables et les contre-indications du Glucantime®, ces effets indésirables ont été classés selon leur fréquence.

Glucantime®

Tableau III: Effets indésirables et contre-indications du Glucantime®^(41, 43, 51, 66-68).

Classes de systèmes d'organes	Effets indésirables	Contre-indications
Trouble du métabolisme et de la nutrition	Anorexie****	-Hypersensibilité à la substance active ou à l'un des excipients -Insuffisances cardiaque ou hépatique. -Insuffisance rénale sévère. -Grossesse sauf dans les pathologies qui met en jeu le pronostic vital, où le bénéfice potentiel pour la mère l'emporte sur le préjudice potentiel pour le fœtus ; -Allaitement
Troubles généraux	Fièvre****	
Et anomalies au site D'administration	Frissons* Malaise** Œdème de la face*	
Affections respiratoires, thoraciques et médiastinales	Dyspnée** Toux*	
Affections du système nerveux	Céphalées*****	
Affections gastro-intestinales	Nausées**** Vomissements**** Douleurs abdominales****	
Affection hématologiques	Anémie****	
Affections musculosquelettiques et systémiques	Arthralgies***** Myalgies*****	

Rare*, peu fréquent**, Fréquent****, très fréquent*****.

II.11 Toxicité

II.11.1 Intoxication aiguë

L'administration d'une dose totale excessive peut causer :

- Une atteinte hépatique sévère (ictère grave) ;
- Une insuffisance rénale aiguë ;
- Des problèmes cardiaques tels que : la bradycardie, un allongement de l'intervalle QT, un aplatissement ou une inversion de l'onde T ;
- Des troubles hématopoïétiques comme une anémie ou une agranulocytose ;
- Des problèmes neurologiques tels qu'une polynévrite⁽⁴³⁾.

II.11.2 Intoxication chronique

Les conséquences d'une exposition prolongée et faible aux dérivés d'antimoine ne sont pas encore connues. Les résultats des études disponibles sont contradictoires et difficiles à interpréter, en raison de l'exposition simultanée à diverses substances ou de l'absence de groupe témoin dans certaines études. Cependant, des pathologies ont été signalées lors des expositions professionnelles répétées à l'antimoine⁽⁵⁴⁾.

II.12 Premiers gestes et principes de traitement

Le médicament doit être interrompu en cas d'apparition des signes de stibio-intolérance avec administration d'un traitement symptomatique. Il existe deux agents chélateurs ayant des propriétés antidotiques :

- Le BAL (British Anti Lewisite) par voie parentérale à la dose de 3 mg/kg/6 heures le 1^{er} jour, 2mg/kg/j/6 heures le 2^{ème} jour et 2mg/kg/j/12h le 3^{ème} jour ;

- Le DMSA (Acide dimercaptosuccinique) à la dose de 20 à 40 mg/kg/j en trois prises per os pendant 7 jours⁽⁴⁸⁾.

II.13 Interactions médicamenteuses

Il doit être utilisé avec précaution chez les patients recevant des médicaments qui peuvent induire un allongement de l'intervalle QT (à savoir certains antiarythmiques de classe IA et III, certains antidépresseurs tricycliques, certains macrolides, certains antipsychotiques, d'autres antiparasitaires)^(43, 51).

II.14 Résistance aux dérivés de l'antimoine

Bien que le mécanisme exact de résistance aux antimoniate chez les leishmanies ne soit pas encore entièrement compris, il est suggéré que plusieurs facteurs peuvent y contribuer :

- Une diminution de la réduction biologique de SbV en sa forme active SbIII qui pénètre dans l'organisme par l'intermédiaire du transporteur membranaire AQP1(aquaporine).
- Une mutation de l'AQP1 diminue la pénétration de SbIII dans la cellule
- Une augmentation de la concentration des thiols présents dans les cellules de la leishmania qui peuvent réagir avec les ions antimoniés pour former des complexes stables, empêchant ainsi les antimoniate d'atteindre leur cible dans la cellule parasite, ce qui diminue leur efficacité thérapeutique.
- Une surexpression des protéines de membrane de la superfamille des transporteurs ABC ou transporteurs à cassettes liant l'ATP en anglais ATP-binding cassette comme la MRPA, qui évacuent le médicament hors des cellules parasitées ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

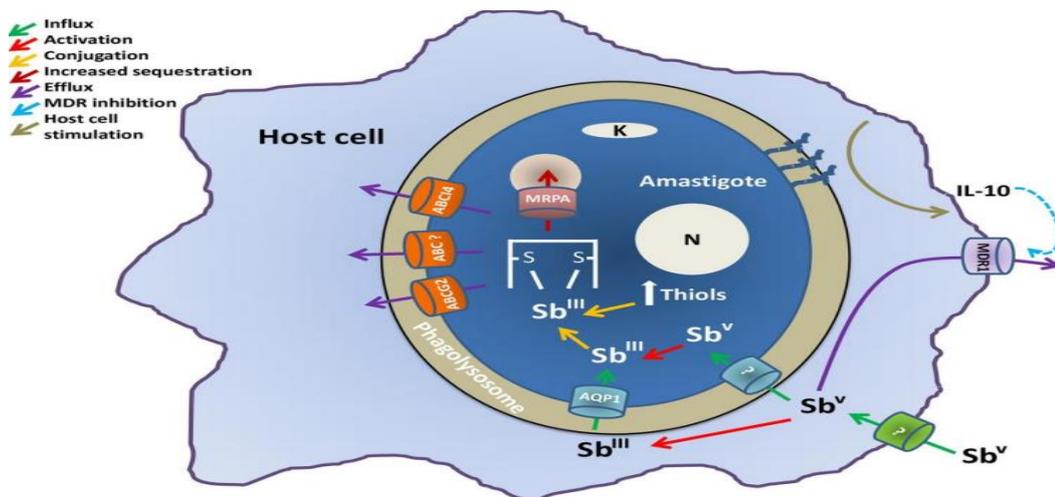


Figure 15: Mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance de Leishmania à l'antimoine⁽⁷¹⁾.

II.15 Rappel sur les radicaux libres, stress oxydatif et les antioxydants

II.15.1 Les radicaux libres

a. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, qu'elles soient moléculaires ou atomiques, ayant au moins un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur la couche électronique la plus externe et capables d'exister sous forme indépendante, ces derniers induisent un champ magnétique appelé « SPIN » qui leur confère une instabilité énergétique et cinétique avec une grande réactivité. La durée de vie d'un radical libre est très courte généralement de quelques millisecondes voire quelques nanosecondes et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situera (exemple : $\cdot\text{OH}$)⁽⁷²⁻⁷⁸⁾.

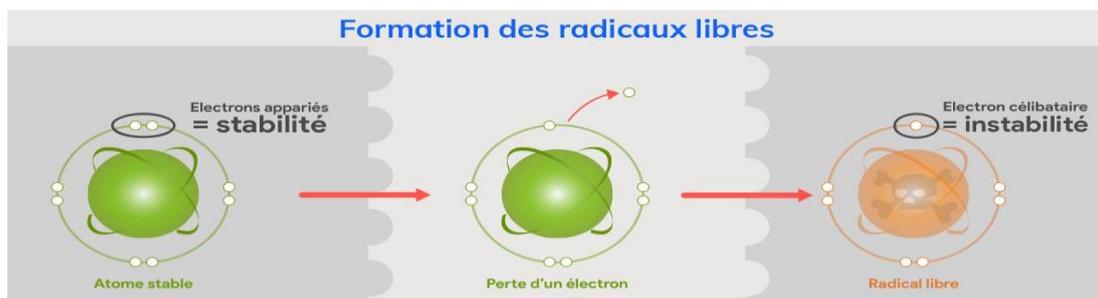


Figure 16: Représentation de la formation d'un radical libre⁽⁷⁹⁾.

En raison de leurs instabilités énergétiques, les radicaux libres ont la capacité de se stabiliser rapidement en cédant ou en acceptant un électron d'une autre molécule ce qui induit l'apparition des réactions d'oxydation en chaîne⁽⁸⁰⁾.

Les radicaux libres peuvent être générés de trois manières :

- soit par la scission homolytique d'une liaison covalente ($A : B \rightarrow A\cdot + B\cdot$) ;
- soit par l'élimination ou la perte d'un électron par un non radical ($NR - e^- \rightarrow R\cdot$) ;
- soit par l'addition d'un électron libre à un non radical ($NR + e^- \rightarrow R\cdot$).

En outre, la réactivité des radicaux libres dépend des éléments présents: si un radical rencontre un autre radical, le produit sera un non radical ($A\cdot + B\cdot \rightarrow AB$) ; si un radical rencontre un non radical, un nouveau radical sera formé ($A\cdot + B \rightarrow A+B\cdot$) et donnera l'origine à une réaction en chaîne qui se poursuit jusqu'à ce que le radical rencontre un autre radical ou un antioxydant⁽⁸¹⁾.

b. Production des radicaux libres

La production de ces espèces oxydantes est inévitable en raison du processus métabolique aérobie, où l'organisme a besoin de l'oxygène pour produire de l'énergie via la respiration oxydative. Cependant, une petite quantité de l'O₂ s'échappe à sa réduction en eau dans la mitochondrie, ce qui peut mener à la création de radicaux libres oxygénés. Les autres sources de production de radicaux libres sont représentées dans le tableau suivant. Elles sont classées en deux catégories endogènes et exogènes⁽⁸²⁾.

Tableau IV: Principales sources des ERO endogènes et exogènes^(83, 84).

Sources endogènes	Sources exogènes
Chaîne respiratoire mitochondriale	Xénobiotiques pro-oxydants
Phagocytes	Tabagisme
Inflammation	Chimiothérapie
NADPH Oxydases	Radiations ionisantes
Xanthine Oxydase	Cytokine pro-inflammatoire
Etat d'ischémie-reperfusion	Radiations UV
Athérogenèse	Champs électriques

c. Les principales espèces réactives d'oxygène ERO

On distingue :

- **Les radicaux primaires**, qui jouent un rôle important en physiologie, ces derniers dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron comme l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle $OH\cdot$, ou de l'azote comme le monoxyde d'azote $NO\cdot$;
- **Les radicaux secondaires**, qui se forment suite à la réaction de ces radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule. Il existe également d'autres espèces dérivées de l'oxygène, appelées espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitro-peroxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux⁽⁸⁵⁾.

Tableau V: Principales ERO radicalaires et non-radicalaires⁽⁸⁵⁾.

Radicalaire	Non radicalaire
L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})	L'oxygène singulet (1O_2)
Le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot})	L'ozone (O_3)
Le radical alkoxyde (RO^{\cdot})	L'acide hypochloreux ($HOCl$)
Le radical peroxyde (RO_2^{\cdot})	Le peroxyde d'azote ($ONOO^{\cdot}$)
Le dioxyde de carbone ($CO_2^{\cdot-}$)	L'hydroperoxyde ($ROOH$)

- **L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)**

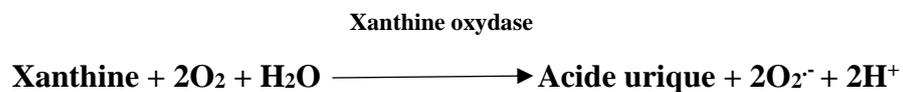
La chaîne respiratoire mitochondriale est l'une des sources physiologiques majeures de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire, cette réaction est catalysée par le cytochrome-oxydase mitochondrial :



La formation du radical superoxyde peut également se faire lors de la phagocytose par la NADPH oxydase présente dans la membrane plasmique des phagocytes :



Une autre origine biologique importante de radicaux superoxydes est le système enzymatique xanthine / xanthine oxydase qui intervient dans le processus inflammatoire. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique en présence d'oxygène, ce dernier agit comme un accepteur d'électrons produisant ainsi le radical superoxyde :



Ce radical a une faible réactivité, mais il agit comme un précurseur qui donne naissance à des espèces plus agressives comme l'ion peroxyde (O_2^{2-}) qui à son tour produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)^(86, 87).

- **Le radical hydroxyle (OH^{\cdot})**

Une espèce radicalaire la plus instable et la plus agressive de toutes les ERO qui attaque la plupart des molécules biologiques (protéines, lipides, ADN) provoquant de multiples

dommages. Ce radical est principalement formé selon la réaction de Fenton en présence d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène ^(72, 86, 88) :



Les métaux de transition comme le fer ou le cuivre peuvent également catalyser la réaction entre l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pour produire le radical hydroxyle selon la réaction de Haber-Weiss⁽⁸⁸⁾ :



- **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et L'oxygène singulet (¹O₂)**

L'H₂O₂ possède une capacité de diffusion importante à travers les membranes des cellules et des organites cellulaires⁽⁸⁹⁾.

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la formation du peroxyde d'hydrogène par une réaction de dismutation du radical superoxyde ⁽⁸⁶⁾:



L'oxygène singulet un puissant agent oxydant, est capable d'attaquer plusieurs molécules, dont les acides gras polyinsaturés. Il peut être produit par des réactions de photosensibilisation à partir de l'ion superoxyde (selon la réaction ci-dessous)^(82, 89).

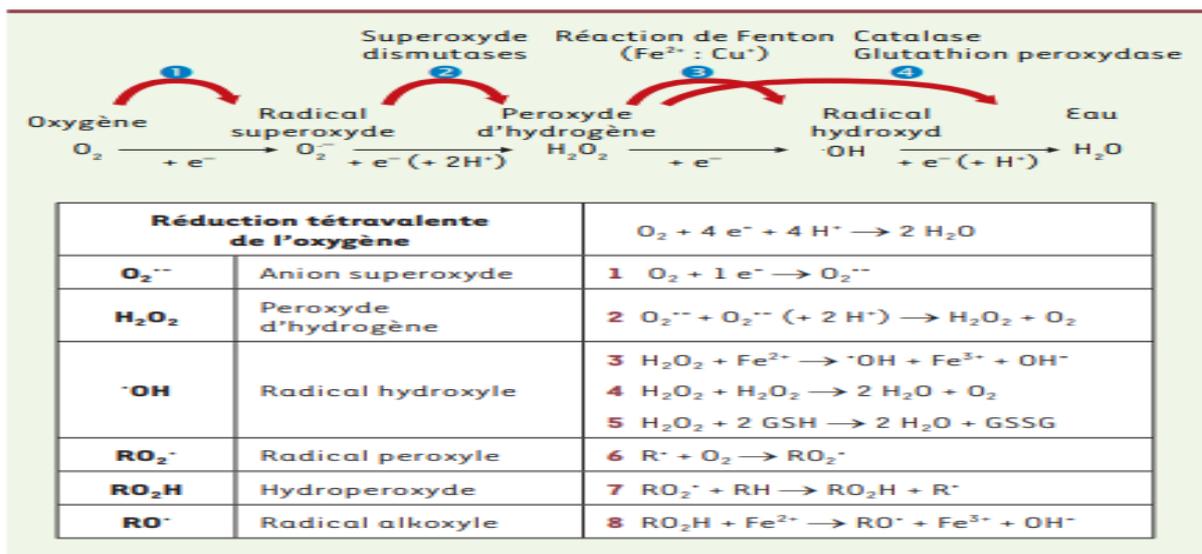
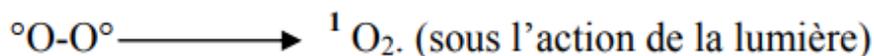


Figure 17: Processus de formation des espèces réactives de l'oxygène⁽⁹⁰⁾.

II.15.2 Le stress oxydatif

a. Définition

Le stress oxydant se réfère à un état où la production excessive de radicaux libres, notamment les espèces réactives de l'oxygène (ERO), dépasse la capacité des systèmes de défense antioxydants de l'organisme à les neutraliser ce qui favorise l'état oxydatif. Ce déséquilibre est dû à la surproduction de pro-oxydants ou au manque de l'apport en antioxydants ⁽⁹¹⁻⁹³⁾.



Figure 18: Déséquilibre de la balance entre oxydant et antioxydant (Stress oxydant)⁽⁹⁴⁾.

b. Maladies liées au stress oxydatif

On distingue : la sclérose latérale amyotrophique (SLA), le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'œdème pulmonaire, le diabète de type 2, la résistance à l'insuline, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose ^(84, 85, 95).

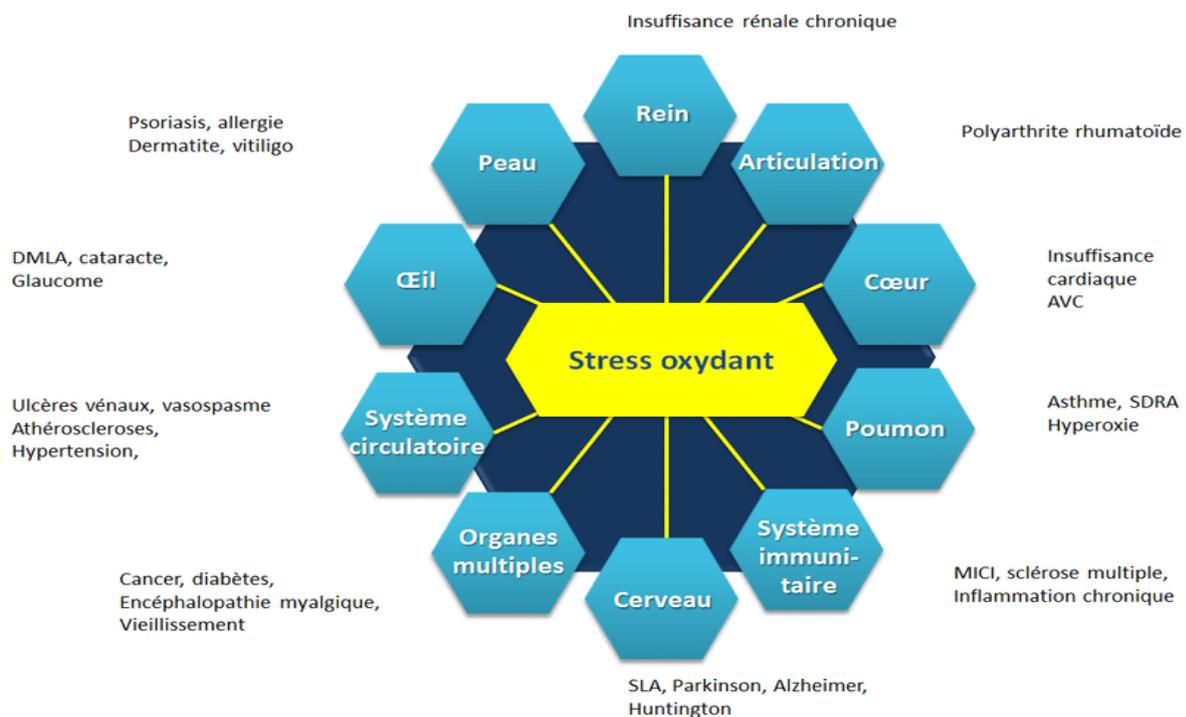


Figure 19: Représentation des pathologies liées au stress oxydant⁽⁹⁶⁾.

II.15.3 Les antioxydants

a. Définition

Un antioxydant est une substance qui empêche ou ralentir l'oxydation en neutralisant les radicaux libres et les ERO en général, à fin de prévenir l'apparition de maladies liées au stress oxydatif^(93, 97).

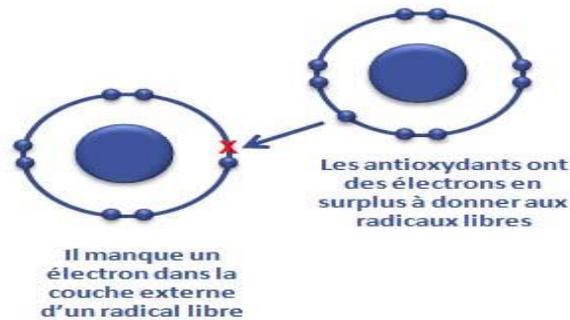


Figure 20: Processus de stabilité des radicaux libres⁽⁹⁸⁾.

b. Les types d'antioxydants

Tableau VI : Les deux catégories de défenses antioxydantes: les mécanismes enzymatiques et les nutriments antioxydants⁽⁸²⁾.

Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes	Systèmes antioxydants d'origine alimentaire
– La glutathion peroxydase	– La vitamine E
– Le superoxyde dismutase	– La vitamine C
– La Catalase	– Les caroténoïdes (lycopène, lutéine...)
– Lipase, protéases, endonucléases (éliminent les molécules oxydées)	– Les polyphénols
– Albumine, ferritine (complexent les ions divalents)	– Les minéraux et oligo-éléments
	– Taurine

• Les antioxydants endogènes

- La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme héminique, c'est-à-dire qu'elle possède un atome de fer qui participe à la fabrication de l'hème. Elle possède 4 sous-unités comprenant chacune un atome

Glucantime®

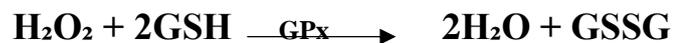
de fer sous forme Fe^{3+} . Elle est présente dans les cellules des plantes, des animaux, des bactéries aérobies et situées dans un organite cellulaire appelé peroxydase. La catalase est parmi les enzymes qui ont des taux de renouvellement les plus élevés : une molécule de catalase peut convertir environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène à l'eau et à l'oxygène chaque minute^(95, 99) :



- Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La GPx est une sélénoprotéine qui fonctionne en réduisant les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). On distingue chez les eucaryotes 5 isoformes qui contiennent un à quatre atomes de sélénium dans leurs sous-unités selon l'isoenzyme : la GPx1 cytoplasmique et mitochondriale qui est majoritaire, la GPx2 gastro-intestinale, la GPx3 plasmatique, la GPx4 ou Phospholipide Hydroperoxide GPx (PH-GPx) située à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme et enfin la GPx5 localisée dans l'épididyme. Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras poly-insaturés^(84, 100, 101).

La GPx catalyse la réduction des hydroperoxydes organiques (ROOH) par le glutathion (GSH) en molécule d'eau (H_2O), d'alcool (ROH) et en disulfure de glutathion (GSSG) mais aussi la réduction du peroxyde d'hydrogène en H_2O . La régénération du GSH à partir du GSSG dans la cellule est effectuée par l'enzyme glutathion réductase^(99, 100) :

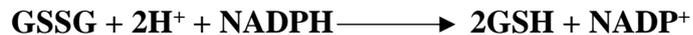


R= groupe organique aliphatique, aromatique ou de l'hydrogène.

Le glutathion sous sa forme réduite GSH (γ -glutamyl-cystéinyglycine) est un tripeptide ubiquitaire formé par la liaison entre l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Ce composé joue un rôle important comme cofacteur de plusieurs enzymes antioxydantes. Le glutathion est également un agent radioprotecteur son injection entraîne la diminution du stress oxydant observé après irradiation^(95, 99).

- **La glutathion réductase**

La glutathion réductase est une flavoprotéine qui catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) en présence du NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. Elle a un rôle essentiel dans le cycle redox car elle permet le maintien d'un milieu intracellulaire réducteur avec un taux élevé de GSH et un faible taux de GSSG ^(100, 102) :



• **Les antioxydants exogènes**

Les plus importants antioxydants issus de l'alimentation sont la vitamine E, la vitamine C, les flavonoïdes et les caroténoïdes. Ces composés ont la capacité d'interrompre la chaîne de réaction radicalaire⁽¹⁰³⁾. Ici on cite :

- **La vitamine C**

Également connue sous le nom de l'acide ascorbique, est considérée comme l'un des antioxydants hydrosolubles les plus importants. Elle joue un rôle crucial dans les compartiments intra- et extra-cellulaire. Son mécanisme d'action précis reste une énigme. Il agit par des réactions d'oxydoréduction entre la forme réduite de la vitamine C (l'acide ascorbique) et sa forme oxydée (dehydroascorbate), selon Valko et ses collaborateurs l'acide ascorbique est un di-acide (AscH₂) doté de deux groupes hydroxyles ionisables. L'oxydation de l'ascorbate par de nombreux ERO conduit à la formation d'un radical semi-déshydroascorbate (Asc^{•-}), qui est un produit terminal très peu réactif^(82, 99).

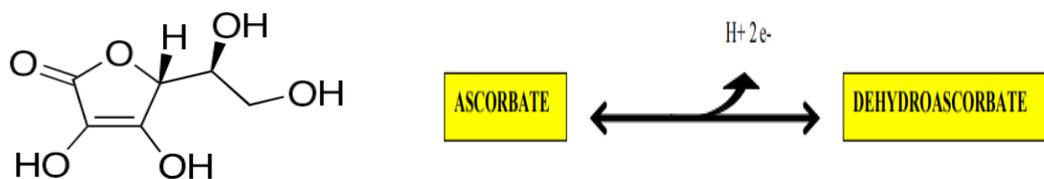


Figure 21: Structure chimique de la vitamine C⁽¹⁰⁴⁾. **Figure 22:** Réaction d'oxydoréduction de la vitamine C⁽⁸²⁾.

- **La vitamine E**

La vitamine E est un antioxydant liposoluble majeur. C'est un composé amphiphile qui peut s'insérer dans les membranes cellulaires, notamment les globules rouges. Les huiles végétales contiennent une grande quantité de vitamine E. Sa principale fonction est la désactivation des

formes réactives de l'oxygène et plus particulièrement l'inhibition de la peroxydation lipidique pour protéger les cellules contre les dommages^(82, 105-107).

- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques ubiquistes que l'on retrouve aussi dans une grande variété de plantes, y compris le thé, le cacao, le blé, l'orge, maïs, les fruits (le raisin), les légumes, les herbes et les épices. Ils possèdent des propriétés antioxydantes en neutralisant les radicaux libres, notamment l'inhibition de la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux : hydroxyle, superoxyde et pyroxyle, ainsi que le piégeage des ions métalliques par chélation des métaux de transition comme le fer et le cuivre. En outre, les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à inhiber certaines enzymes responsables de la production des ERO telles que la xanthine oxydase^(82, 108).

II.16 Rappel sur les globules rouges et l'hémolyse

II.16.1 Globule rouge

a. Définition

Les globules rouges également appelés érythrocytes sont des cellules anuclées constituées principalement d'une protéine liante l'oxygène appelée : l'hémoglobine.

Le rôle principal de ces cellules est d'assurer le transport de l'oxygène et du gaz carbonique entre les alvéoles pulmonaires et les tissus.

Elles sont produites dans la moelle osseuse par les cellules-souches hématopoïétiques et vivent normalement 120 jours, avant d'être détruites⁽¹⁰⁹⁾.

Voici un tableau avec les valeurs normales du nombre de globules rouges par litre (en millions)

Tableau VII: Valeurs normales du nombre de globules rouges par litre (en millions)

Groupe	Homme	Femme	Enfant	Nouveau-né
Valeur normale	4.5-5.5	4.0-5.0	3.8-5.5	4.0-6.0

b. Morphologie du globule rouge

Les hématies présentent une forme de disque biconcave d'environ 7 à 8 micromètres de diamètre, dépourvues de noyau, de mitochondrie et de ribosome.

Glucantime®

Lorsqu'elles sont observées au microscope entre lame et lamelle, elles ressemblent à des disques aplatis. Cette morphologie favorise une grande surface de contact pour faciliter les échanges gazeux et permet leur déformation pour passer à travers les petits vaisseaux sanguins.

Au cours de la coloration avec la méthode MGG, elles prennent une teinte rose vif, avec une zone plus claire en leur centre⁽¹¹⁰⁾.

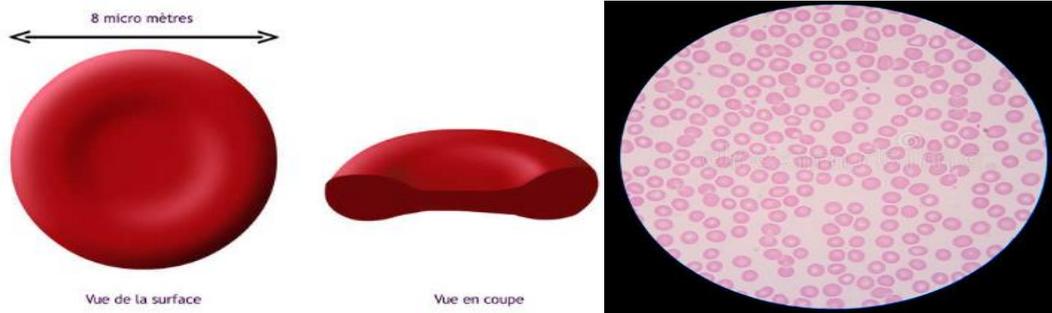


Figure 23: La structure du globule rouge^(111, 112).

c. La membrane érythrocytaire

Est composée d'une double couche lipidique et d'un cytosquelette formé de protéines interconnectées, par exemple la bande protéique 3 et les glycophorines⁽¹¹³⁾.

Sa composition comprend environ 52 % de protéines, 40 % de lipides et 8 % de glucides⁽¹¹⁴⁾.

- Les lipides

Les lipides présents dans les membranes sont majoritairement des molécules amphiphiles, avec une partie hydrophile (tête) et une partie hydrophobe (queue) constituée d'une double chaîne carbonée.

En 1972, SINGER et NICOLSON ont proposé le modèle de la "mosaïque fluide" pour décrire la structure des membranes. Selon ce modèle, les membranes sont des structures dynamiques composées de protéines et de phospholipides dans une matrice à double couche phospholipidique⁽¹¹⁵⁾.

- Les phospholipides

Les phospholipides forment une double couche d'environ 4,5 nm d'épaisseur qui entoure la cellule. Leurs têtes polaires hydrophiles sont liées à un squelette de glycérol et sont orientées vers l'extérieur de la membrane (feuillet externe), tandis que les chaînes hydrocarbonées

hydrophobes, sont fixées aux autres fonctions du glycérol et sont orientées vers l'intérieur (feuillet interne).

Dans le feuillet externe, on trouve principalement des phosphatidylcholines et des sphingomyélines, alors que dans le feuillet interne, les amino-phospholipides sont prédominants⁽¹¹⁶⁾.

- **Le cholestérol**

Le cholestérol joue un rôle important dans la rigidité des membranes dans des conditions physiologiques normales. Il entraîne une augmentation de la micro viscosité⁽¹¹⁷⁾.

- **Cytosquelette**

Le cytosquelette des globules rouges est composé de longs filaments de spectrine qui sont interconnectés par de l'actine, il joue un rôle crucial dans la détermination de la forme des globules rouges, qu'ils soient normaux ou pathologiques.

Parmi les composants du cytosquelette membranaire, on retrouve principalement trois protéines : la spectrine, l'actine et la protéine 4.1⁽¹¹⁸⁾.

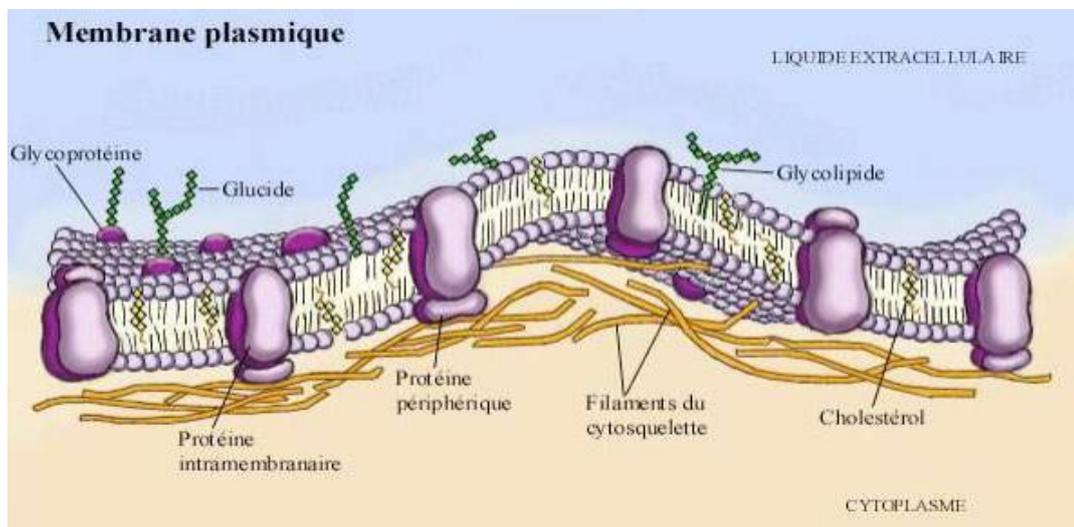


Figure 24: La structure de la membrane érythrocytaire⁽¹¹⁹⁾.

d. Échanges transmembranaires

Les échanges à travers la membrane sont essentiellement de deux ordres : par diffusion simple et par un processus actif agissant contre un gradient de concentration.

- **La diffusion simple**

Intéresse l'eau et les anions inorganiques ce transport passif se font à travers des « pores » de la membrane suivant le gradient de concentration des ions⁽¹²⁰⁾.

- **Transport actif**

Permet le mouvement des solutés contre un gradient de concentration (de faible concentration à forte concentration). C'est possible en raison de la dépense d'énergie utilisée (hydrolyse de l'ATP).

Il existe deux principaux types de transport actif : transport actif primaire (direct) qui utilise directement l'ATP pour l'énergie et le transport actif secondaire (indirect), également appelé cotransport et implique le transfert de deux molécules distinctes (symport, dans la même direction ; antiport, dans des directions opposées) ⁽¹²⁰⁾.

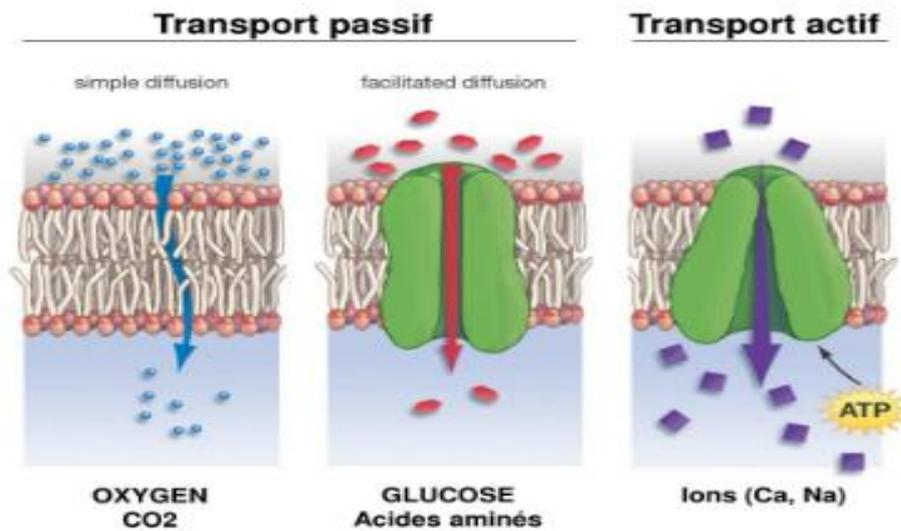


Figure 25: Les échanges transmembranaires⁽¹²¹⁾.

- **Les échanges de cations**

L'échange de cations est principalement effectué par un mécanisme actif. Les concentrations intracellulaires de Na⁺ et de K⁺ sont maintenues par un système complexe de pompe à sodium rejetant vers l'extérieur le sodium ayant pénétré passivement dans l'érythrocyte et maintiennent le K⁺ à l'intérieur de celui-ci. Ce processus nécessite un apport énergétique par l'ATP, s'opère par des modifications conformationnelles s'accompagnant d'un changement d'affinité des sites Na⁺ et K⁺ de part et d'autre de la membrane, tels que trois Na⁺ sont repoussés vers l'extérieur en échange

des deux K^+ retenus à l'intérieur. Le deuxième système d'échanges constitue le transport commun de Na^+ K^+ ^(120, 122).

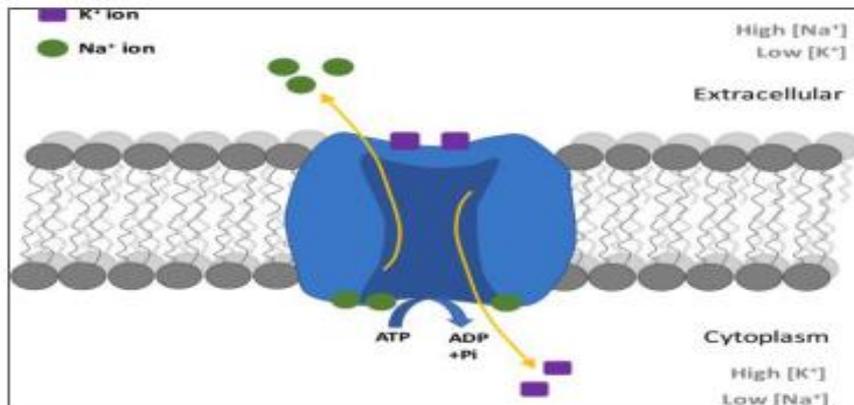


Figure 26: La pompe Na^+ /K^+ ⁽¹²³⁾.

- L'hémoglobine

Il s'agit d'un tétramère composé de deux chaînes du type alpha et deux chaînes du type beta ; Chaque sous-unité de globine associée à une molécule d'hème, site de liaison réversible de l'oxygène.

L'hémoglobine est un constituant majeur du globule rouge, c'est une chromoprotéine dont la principale fonction est le transport respiratoire. Elle est constituée de l'hème et de globine⁽¹²⁴⁾.

La globine est constituée de l'association de quatre chaînes d'acides aminés et l'hème est constitué d'une molécule de porphyrine et d'un atome de fer qui est à l'état ferreux ce qui permet la fixation de l'oxygène⁽¹²⁵⁾.

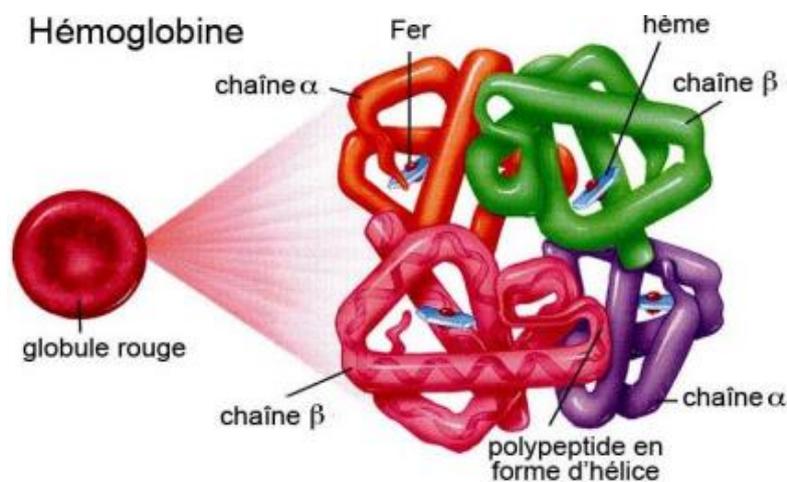


Figure 27: Structure de l'hémoglobine⁽¹²⁶⁾.

e. Données quantitatives : la numération globulaire

Tableau VIII: La numération globulaire⁽¹²⁷⁾.

Numération des globules rouges (GR)	Hommes : 4,5 à 5,5 millions/mm ³ Femmes : 4,0 à 5,0 millions/mm ³
Hémoglobine (Hb)	Hommes : 13,5 à 17,5 g/dL Femmes : 12,0 à 15,5 g/dL
Hématocrite (Ht)	Hommes : 38,8% à 50,0% Femmes : 34,9% à 44,5%
Volume globulaire moyen (VGM)	80 à 96 (fL)
Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH)	27 à 33 (pg)
Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)	32% à 36%

NB : Les valeurs normales de l'hémogramme sont à interpréter selon l'âge et le sexe du patient.

II.16.2 L'hémolyse

a. Définition

Après une durée de vie normale de 120 jours. Les globules rouges âgés sont phagocytés et détruits par des macrophages du système des phagocytes mononuclés de la moelle osseuse (minimum 50%). Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie.⁽¹²⁸⁾ Si elle est généralement normale, mais peut être pathologique par une hémolyse précoce et exagérée suite à quelque phénomène comme : un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, drépanocytose, thalassémie, coagulopathies, paludisme et maladies auto-immunes^(129, 130).

b. Les marqueurs biologiques de l'hémolyse

On distingue :

- Concentration élevée de lactate déshydrogénase (LDH), enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse la transformation réversible du pyruvate en lactate en présence de NAD⁺/NADH, elle est présente en grande quantité dans les globules rouges et qui est libérée lors de leur destruction
- Taux réduit d'haptoglobine, protéine qui lie l'hémoglobine relâchée dans le plasma lors de l'hémolyse
- Taux de bilirubine indirecte augmenté (surtout lorsque l'hémolyse est grave ou chronique)⁽¹³¹⁾.

CHAPITRE

III *Marrubium vulgare*

III.1 Description de la plante

III.1.1 Description systématique

Selon le groupe de phylogénie des angiospermes (APG III) la classification complète de *Marrubium vulgare* est la suivante⁽¹³²⁾.

Tableau IX: La classification botanique de la plante *Marrubium vulgare* L. ⁽¹³²⁾

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophytes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i>

III.1.2 Nomenclature

Le nom *Marrubium* vient du mot hébreu "Marrob" qui signifie amer. Le nom scientifique actuel de ce genre est *Marrubium vulgare* L⁽¹³³⁾.

En Algérie : Elle est connue par le nom Marrioua en arabe et Marrnouyeth en kabyle⁽¹³⁴⁾.

III.1.3 Description botanique

Le marrube blanc ou marrube Commun (*Marrubium vulgare*) est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 70 cm de hauteur à racines épaisses, ligneuses, blanchâtres, avec des tiges quadrangulaires (carrées) blanchâtres, cotonneuses et dressées⁽¹³⁵⁾.

Marrubium vulgare L.



Figure 28: Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.)⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾.

Les feuilles opposées, pétiolées, ovales ou arrondies, sont vertes cendrées et cotonneuses, dentées et duveteuses sur la face inférieure⁽¹³⁵⁾.

Le limbe crénelé sur les bords à nervation pennée, saillante est recouvert de poils blancs, fins et d'aspect laineux⁽¹³⁹⁾. Les fleurs petites blanches bilabiées (12 à 15 mm de long) groupées en amas axillaires serrées, ont un calice tubuleux persistant à (5 + 5) épines recourbées terminées en crochet⁽¹⁴⁰⁾. La corolle quadrilobée est d'un blanc terne, elles apparaissent du mois de mai jusqu'au mois de Septembre et parfois encore en hiver. Les fruits sont quatre akènes noirs, triangulaires⁽¹³⁹⁾.

La plante entière dégage une odeur forte de thym qui la différencie des autres plantes avec une saveur âcre et amère^(141, 142).

En Algérie, on compte six espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides*, *Marrubium supinum* Pommel et *Marrubium desserti de Noé*⁽¹⁴³⁾.

III.2 Répartition géographique

Le marrube blanc se trouve dans tout le territoire de l'Algérie surtout dans le nord, elle est présente dans toute l'Europe sauf l'extrême nord, l'Australie et la Nouvelle-Zélande. Elle est également présente au Maroc et en Tunisie, notamment dans la région méditerranéenne, elle se trouve principalement dans des lieux incultes comme les landes, les gravats, les terrains vagues, les broussailles, les prairies chaudes et sèches, elle est aussi répandue sur tout le continent américain. C'est une espèce spontanée, aime la sécheresse, le climat aride et les sols fortement calcaires. On récolte ses feuilles au printemps^{(133, 140) (142)}.

III.3 Composition chimique

III.3.1 Métabolites secondaires

En matière de données bibliographiques, les études phyto-chimiques sur *M.vulgare* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires dérivant de manière biosynthétique des métabolites primaires et constituent une source très importante de produits chimiques utilisés comme produits pharmaceutiques, agrochimiques, arômes, parfums, colorants, biopesticides et additifs alimentaires^{(144) (142)}.

Parmi les métabolites secondaires qui ont été identifiés dans *Marrubium vulgare* en Algérie sont résumé dans le tableau suivant ^(139, 145) :

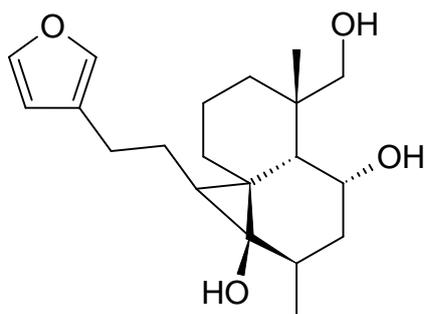
Tableau X: Principaux métabolites secondaires isolés à partir de la plante *M.vulgare*.^(139, 145).

Flavonoïdes	O-hétérosides de flavones, lactates de flavones glycosylées, ladanéine, apigénine et lutéoline
Phénylpropanoïdes	Acide caféique
Glycosides	Actéoside, verbascoside, arénarioside, ballotétroside, forsythoside B et
phenylpropanoïdiques	marruboside
Diterpènes	Marrubiine et marrubénol

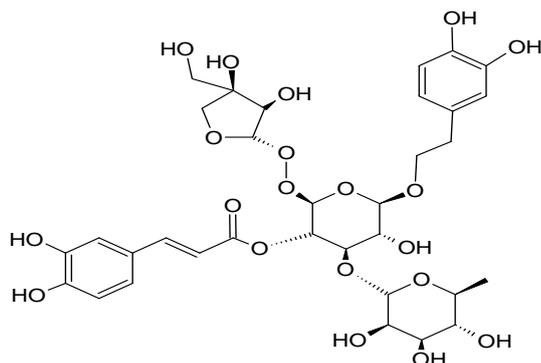
On cite aussi : les stérols, sesquiterpènes, triterpènes, tanins, saponines, mucilage, alcaloïdes , minéraux (potassium, surtout fer en grande quantité), composés azotés (cholines, stachydrine, bétonicine), acide phénolique (acide gallique), pectines et des traces d'huiles essentielles^(135, 140, 142, 146).

La marrubiine est le composé majoritaire dans la plante, elle est responsable de l'effet expectorant et du goût amer. Elle est présente en partie sous la forme de son précurseur pré-furanique, la prémarrubiine^{(139) (140)}.

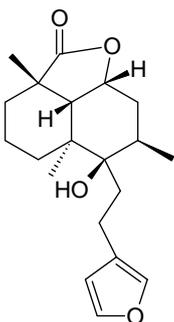
Marrubium vulgare L.



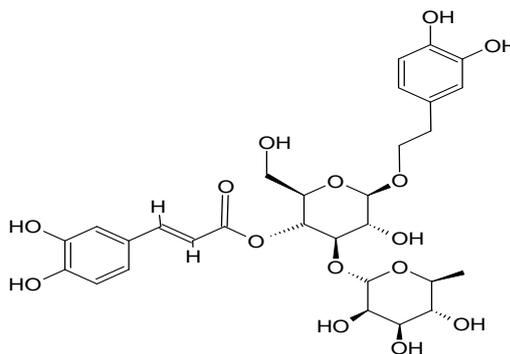
Marrubénol



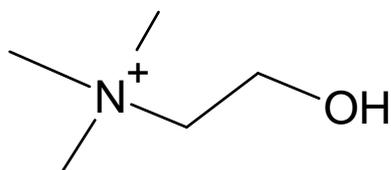
Acteoside



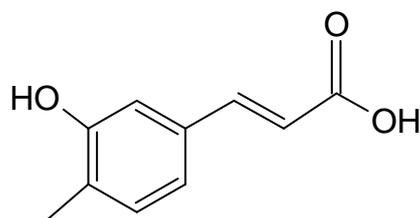
Marrubine



Forsythoside B



Choline



Acide caféique

Figure 29: Métabolites secondaires isolés à partir de la plante *Marrubium vulgare*.⁽¹⁴²⁾

III.3.2 Huiles essentielles

III.3.2.1 Définition

Les huiles essentielles ou essences végétales sont des composés extraits à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, elles sont sensibles à la chaleur, volatiles et généralement de fortes odeur et saveur. Elles ne contiennent ni protéines, ni lipides, ni glucides et ne renferment pas de minéraux ni de vitamines donc elles n'ont aucune valeur nutritionnelle⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾.

Marrubium vulgare L.

Selon AFNOR (Association Française de Normalisation), les huiles essentielles « sont des produits obtenus, soit à partir de matières naturelles végétales par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle ainsi obtenue est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

Les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales⁽¹⁴⁸⁾.

III.3.2.2 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles s'accumulent dans la plante au niveau des fleurs, des feuilles, des fruits, des graines, des écorces ou des racines.

Ces entités productrices d'huiles essentielles se présentent sous forme de très fines vésicules situées entre les cellules à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches^(149, 150).

III.3.2.3 Propriétés physico-chimiques des HEs

À température ambiante, les HEs se trouvent à l'état liquide. Elles sont généralement incolores ou jaune pâle, volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Il existe seulement trois HEs officinales qui ont une densité supérieure à celle de l'eau, parmi la cannelle, le girofle et le saffran. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques⁽¹⁴⁸⁾. Elles ne rancissent pas mais elles sont très sensibles à l'oxydation et risquent d'être altérées⁽¹⁴⁹⁾.

III.3.2.4 Composition chimique de l'huile essentielle de Marrubium vulgare

Le nord de l'Algérie, l'est et le nord-est ont fait l'objet de nombreuses études sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*. La plupart de ces travaux montre que le Germacrène D-4-ol ; 4,8,12,16-tétraméthyl heptadécane-4-ol ; α -Pinène ; Eugénol, γ -Cadinène ; β -Citronellol ; β - Caryophyllène ; β - Bisabolène ; Carvacrol sont les principaux constituants⁽¹⁵¹⁾.

Marrubium vulgare L.

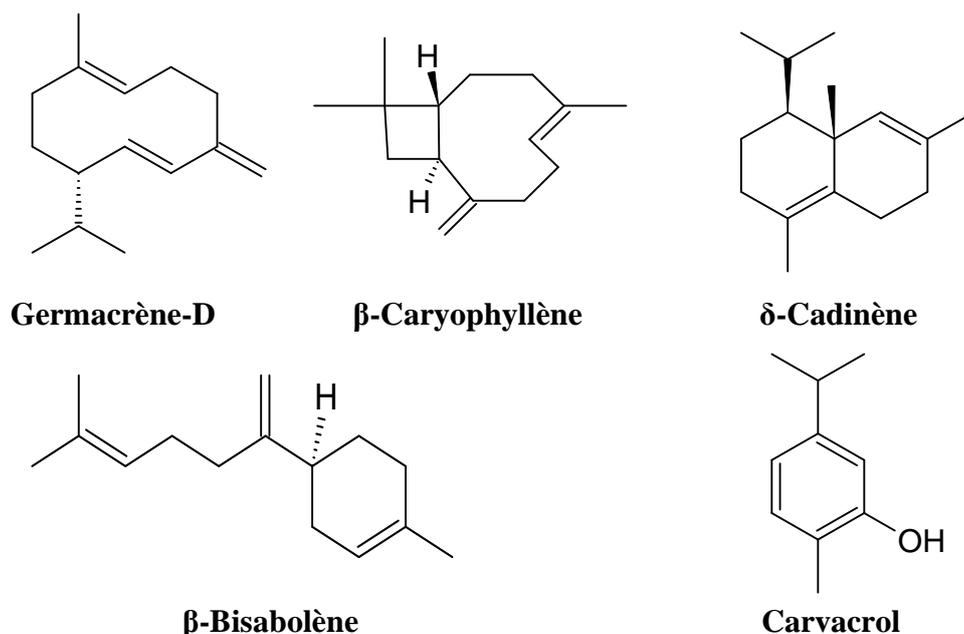


Figure 30: Structure de quelques composés majoritaires de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*⁽¹⁵²⁾.

III.3.2.5 Facteurs de variabilité des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles montre une variabilité influencée par plusieurs facteurs notamment les facteurs génétiques qui contribuent à cette diversité, car la composition en molécules allélo-chimiques peut varier non seulement entre différentes espèces, mais également au sein d'une même espèce. De plus, les facteurs physiologiques qui jouent un rôle très important, car la proportion des composés chimiques peut fluctuer en fonction du cycle végétatif de la plante. Les facteurs pédologiques et climatiques sont également des éléments-clés, notamment dans le cas des agrumes, où la teneur en huile essentielle augmente avec l'augmentation de la température. Enfin, il convient de noter que les différents procédés analytiques d'obtention des huiles essentielles peuvent interférer avec les constituants extraits⁽¹⁵³⁾.

III.3.3 Extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des huiles essentielles, cette diversité est due à la variabilité des matières et à la sensibilité de certains constituants. Le choix de méthode la plus adaptée se fait en fonction de : la nature, caractéristiques physico-chimiques et l'usage de la matière végétale.

III.3.3.1 Extraction par hydrodistillation

C'est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un ballon rempli d'eau mis sur une source de chaleur où l'ensemble

Marrubium vulgare L.

est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont par la suite condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. Etant donné que l'huile essentielle est plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolat⁽¹⁵⁴⁾.

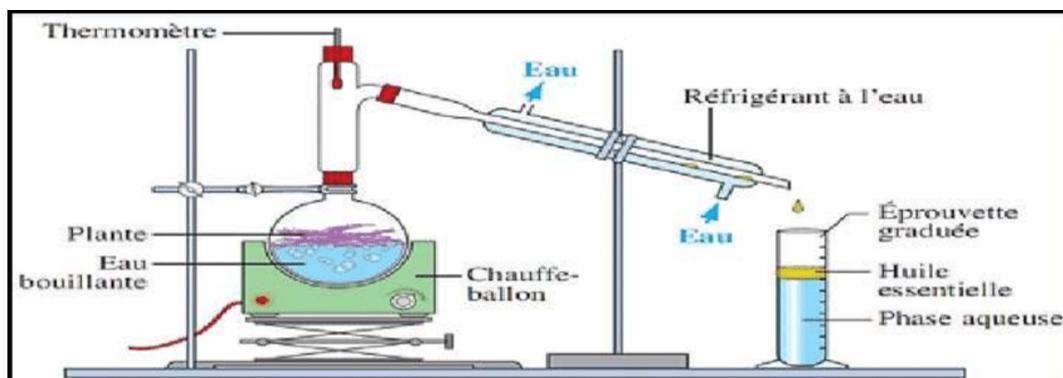


Figure 31: Montage d'extraction par hydrodistillation⁽¹⁵⁵⁾.

III.3.3.2 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et le matériel végétal à traiter à la différence de l'hydrodistillation. La vapeur d'eau est fournie par une chaudière qui traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles pour former un mélange d'eau et d'huile essentielle.

Ce dernier est ensuite condensé et véhiculé vers l'essencier avant d'être séparé en deux phases une phase aqueuse et une phase organique. L'absence du contact direct entre l'eau et la matière végétale, plus précisément entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation qui peuvent nuire à la qualité de l'huile⁽¹⁵⁶⁾.

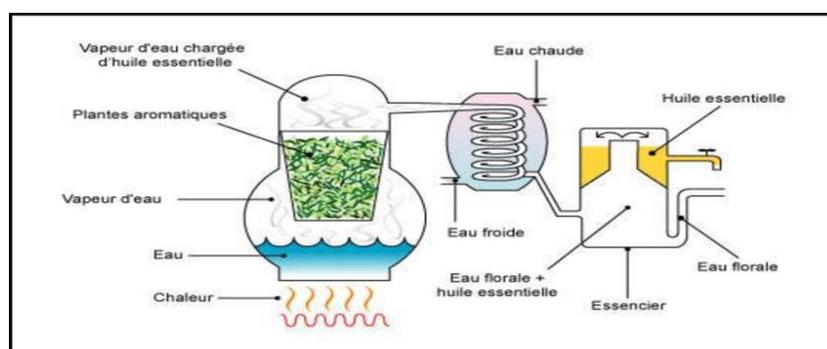


Figure 32: Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau⁽¹⁵⁷⁾.

III.3.3.3 Hydrodiffusion

L'hydro diffusion est une méthode qui consiste à la pulvérisation de la vapeur d'eau à travers la matière végétale du haut en bas. Le flux de vapeur traversant la masse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation où le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est résumé dans l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie de temps, de vapeur et d'énergie⁽¹⁵⁸⁾.

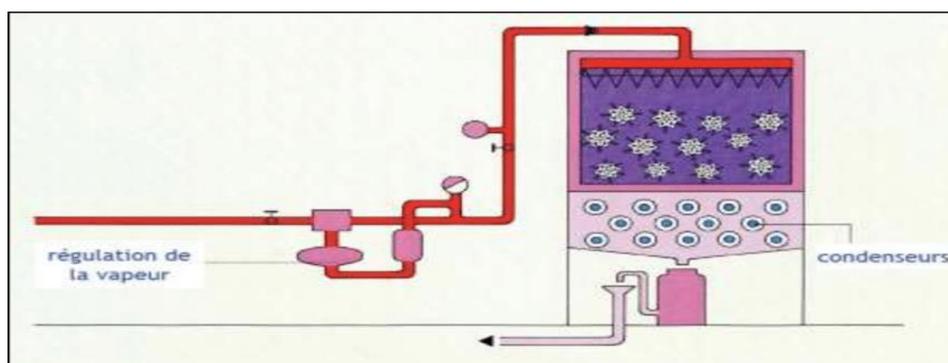


Figure 33: Montage d'extraction par hydrodiffusion⁽¹⁵⁹⁾.

III.3.3.4 Extraction par solvants

C'est une technique qui consiste à placer dans un extracteur la matière végétale à traiter en contact d'un solvant volatil. Suite aux lavages successifs, le solvant se charge en molécules aromatiques, avant d'être transféré au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit obtenu est appelé « concrète ». Qui pourra par la suite être brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour extraire les cires végétales. On obtient à la fin un produit nommé « absolue » après une dernière concentration.

Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation.

Les solvants les plus utilisés à cette heure sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes et aux ultra-sons⁽¹⁶⁰⁾.

III.3.3.5 Extraction par micro-ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes nommé Solvent Free Microwaves Extraction « SFME » consiste à extraire les huiles essentielles par l'utilisation d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. C'est une extraction sans solvant assistée par micro-ondes qui a été conçue pour des applications en laboratoire. Cette technologie est la combinaison entre le chauffage par micro-ondes et la distillation à la pression atmosphérique.

Marrubium vulgare L.

Elle est basée sur un principe simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal sans l'ajout de solvant organique ou d'eau dans un réacteur micro-ondes. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante, permet la rupture des glandes qui renferment l'huile essentielle. Une fois l'HE est libéré, elle est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la plante. À l'extérieur du four micro-ondes, il est placé un système de refroidissement permettant la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle facilement séparable par simple décantation.

D'un point de vue qualitatif et quantitatif, le procédé SFME paraît d'être plus compétitif et économique que les méthodes classiques telles que l'hydrodistillation ou l'entraînement à la vapeur⁽¹⁶¹⁾.

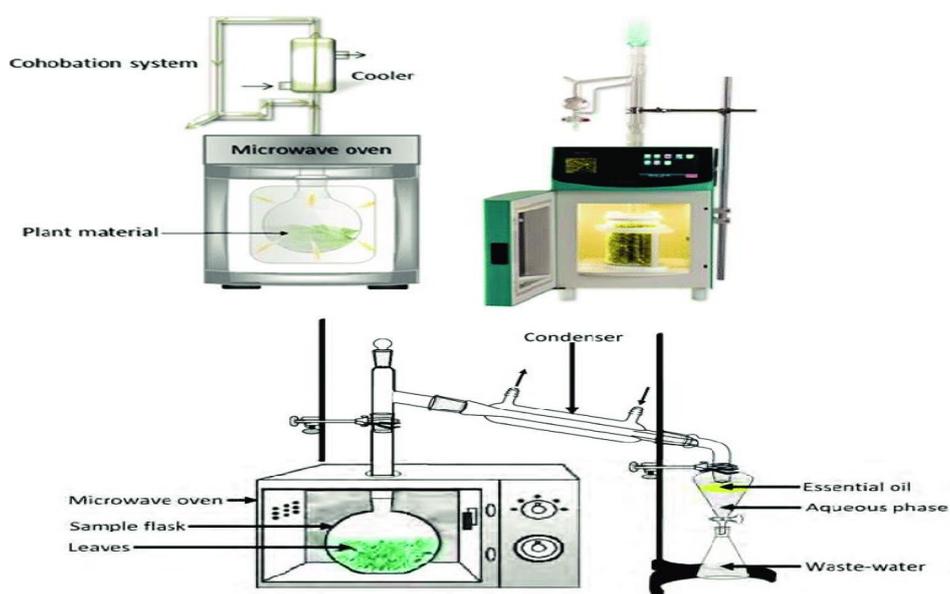


Figure 34: Extraction par micro-ondes⁽¹⁶²⁾.

III.3.4 Utilisation traditionnelle

Le tableau suivant résume les différentes utilisations traditionnelles de *Marrubium vulgare* à travers le monde :

Tableau XI: Différentes utilisations traditionnelles de *Marrubium vulgare*.

Pays	Utilisations traditionnelles de la plante
Algérie	Traitement de maladies du tube digestif, diarrhée, diabète, rhumatismes, froid et douleurs respiratoires.

Marrubium vulgare L.

Maroc, Tunisie, Libye, Egypte	Utilisée comme fébrifuge, emménagogue, tonique, antiseptique, diurétique, anti-ictérique, antispasmodiques, anti-inflammatoires, analgésique diaphorétiques et dans l'asthme et les bronchites aiguës ou chroniques.
--	--

Certaines des utilisations traditionnelles attribuées au *Marrubium vulgare* sont confirmées et démontrées dans de nombreuses études et recherches modernes par plusieurs auteurs dans le monde entier⁽¹⁵¹⁾.

III.3.5 Propriétés pharmacologiques de *Marrubium vulgare* L.

Selon plusieurs études établies, le marrube blanc a été associé à plusieurs effets bénéfiques qui suivent :

– Effet antioxydant

L'extrait alcoolique de *Marrubium vulgare* à des concentrations de (8-10 mg/ml), et certains flavonoïdes isolés (acétine, apigénine, et acétine-7-rhamnoside) ont montré une activité antioxydante élevée vers le piégeage du radical DPPH.

L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* a été évalué à son tour en utilisant le piégeage des radicaux libres DPPH, le test de blanchiment du β - carotène et le test du pouvoir réducteur. Les résultats ont montré qu'elles possédaient une forte activité antioxydante.

Les essais antioxydants *In vitro* ont été utilisés pour déterminer la capacité des composés isolés des feuilles séchées de *Marrubium vulgare*, en utilisant l'essai LPO. L'apigénine-7-O- β -glucopyranoside possédait une activité antioxydante similaire à celle de la vitamine C et La lutéoline-7-O-rutinoside a montré la plus forte inhibition de la LPO de 89 % à une concentration de 100 μ g/ml⁽¹⁶³⁾.

– Effet anticancéreux

Yamaguchi et ses collaborateurs ont étudié les effets de l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* sur la lutte contre la tumorigénicité des cellules cancéreuses colorectales humaines.

Les cellules ont été traitées avec le marrube (100 et 250 μ g/ml) pendant 48 heures, puis la croissance cellulaire a été mesurée. L'extrait a significativement supprimé la croissance des cellules. Ensuite, une analyse en cytométrie en flux a confirmé un effet apoptotique sur les cellules⁽¹⁶⁴⁾.

– Activité antimicrobienne et anti-infectieuse

Marrubium vulgare L.

Une étude a révélé qu'un extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* a montré un effet dépendant de la dose contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et modérément efficace contre *Proteus vulgaris* et *E. coli* mais inefficace dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹⁶⁵⁾.

– **Action contre la toux rebelle et l'asthme humide**

Le Marrube donne d'excellent résultats pour le traitement de la toux rebelle, l'asthme humide et comme expectorant dans la tuberculose pulmonaire (où il intervient aussi comme tonique). Il a des effets fluidifiants et antiseptiques sur les sécrétions bronchiques, et il facilite leur évacuation. Ainsi que les feuilles du Marrube séchées et cuites en eau avec la graine, se donne en forme de sirop avec du miel aux asthmatiques⁽¹⁶⁶⁾.

– **Effet anti-hyperglycémiant**

Kherchiche et ses collaborateurs ont confirmée l'effet hypoglycémiant de *Marrubium vulgare* sur l'alloxane induit chez les rats diabétiques⁽¹⁶⁷⁾.

– **Effet antispasmodique**

En 1996, Schlemper a évalué les effets d'un extrait hydroalcoolique des racines et des parties aériennes de *Marrubium vulgare* dans plusieurs préparations musculaires lisses *In vitro* (iléon de porc, duodénum de rat, l'utérus de souris, l'estomac de rat). Les résultats ont montré que l'extrait exerce une activité antispasmodique importante qui inhibe l'action de certains neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, la bradykinine, la prostaglandine E2, l'histamine et l'ocytocine⁽¹⁶⁸⁾.

– **Action contre les lésions et les blessures**

Cette plante est aussi un adjuvant de la cicatrisation des lésions, les Navajo donnaient aux mères une décoction des racines avant et après l'accouchement⁽¹⁶⁹⁾.

– **Effet cardioprotecteur**

L'injection sous-cutanée d'isoprotérénol à des rats (100 mg/kg/jour, pendant 2 jours consécutifs) a provoqué une élévation du segment ST à l'ECG, un dysfonctionnement du ventricule gauche, une fibrose myocardique intensive avec une augmentation profonde de l'activité myéloperoxydase (MPO) myocardique et des taux sériques de TNF- α .

Marrubium vulgare L.

Toutes les doses de l'extrait de *Marrubium vulgare* ont modifié de manière significative le tracé de l'ECG et amélioré la pression systolique, la contractilité et la relaxation du ventricule gauche⁽¹⁷⁰⁾.

– *Effet hépato-protecteur*

L'effet hépato-protecteur de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* a été évalué sur l'hépatotoxicité induite par le paracétamol chez les rats.

Les effets hépatotoxiques du paracétamol ont été significativement inhibés par l'extrait, ce qui se manifeste par la restauration des paramètres biochimiques sériques à des niveaux proches de la normale.

L'effet protecteur de la plante a été principalement attribué à l'existence d'acides phénoliques et de flavonoïdes principalement la vulgarine et à leurs propriétés antioxydantes⁽¹⁶³⁾.

– *Effet hypolipidémique*

Les activités hypocholestérolémiques et hypotriglycéridémiques de quatre extraits de l'herbe *Marrubium vulgare* ont été évaluées en utilisant l'hyperlipidémie induite par le Triton WR-1339 chez les souris. Après 7 et 24 heures d'administration intragastrique des extraits, une diminution significative du cholestérol total plasmatique a été observée. Les niveaux de triglycérides ont également été réduits de manière significative par tous les extraits.

Les extraits aqueux de *Marrubium vulgare* inhibent l'oxydation des LDL et améliorent le transport inverse du cholestérol. Ils peuvent prévenir le développement des maladies cardiovasculaires^(163, 166, 171).

PARTIE PRATIQUE

MATERIELS ET METHODES

1. Problématique

Les dérivés pentavalents (le Glucantime®) restent le traitement de la leishmaniose de première intention en Algérie en raison, d'une part pour son moindre coût et, d'autre part pour son efficacité dans la majorité des cas.

Toutefois, ce choix thérapeutique expose aux risques d'effets toxiques parfois graves en raison de la marge thérapeutique étroite de cette molécule, d'où l'intérêt d'explorer des voies pour diminuer ses effets secondaires. Leur mécanisme d'action est mal connu, ils présentent une action inhibitrice de la synthèse d'ATP, sur l'oxydation glycolytique et sur le métabolisme des acides gras du parasite.

Notre étude sera une stratégie visant à améliorer l'index thérapeutique de la molécule en réduisant sa toxicité tout en préservant son activité. Pour ce faire, nous allons explorer l'utilisation de l'huile essentielle de la plante *Marrubium vulgare* L ; connu pour son pouvoir antioxydant et protecteur de la membrane biologique qui sera testé et évalué *In vitro* sur le GR, en dosant l'hémoglobine extracellulaire, l'enzyme LDH et le potassium intracellulaire ainsi que les paramètres du stress oxydatifs tels que la catalase (CAT), le glutathion (GSH), le malonaldéhyde (MDA) et les protéines carbonylées.

2. But

Le but recherché via notre travail est de diminuer la toxicité du Glucantime® sur le globule rouge en administrant l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L.

3. Objectifs

3.1 Objectif principal

Étudier et rechercher l'effet anti-hémolytique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*.

3.2 Objectif secondaire

Évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare*.

4. Critères de l'étude

- **Type d'étude** : notre étude est de type expérimental prospective.
- **Lieu d'étude** : elle s'est réalisée au niveau du service de biochimie du laboratoire central du Centre Hospitalo-universitaire Dr. TIDJANI DAMERDJI de Tlemcen en collaboration avec le laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO) ainsi qu'au laboratoire PPABIONUT (Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la nutrition).
- **Période d'étude** : mois de novembre 2022 jusqu'au Mai 2023.

Les paramètres étudiés

- Dosage de la concentration intracellulaire du potassium
- Dosage de la concentration intracellulaire du LDH
- Dosage de l'hémoglobine extracellulaire
- Dosages des paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH, catalase et les protéines carbonylés).

Analyse des données

L'analyse des données et le traçage des graphiques ont été réalisés par l'utilisation du logiciel MICROSOFT OFFICE EXCEL 2016.

Limites de l'étude :

Le travail effectué au sein du service de biochimie du CHU de Tlemcen a été confronté à diverses contraintes, notamment :

- Un manque de réactifs nécessaires pour doser les paramètres à étudier.
- Une durée d'étude limitée.
- La non disponibilité des moyens plus sophistiqués qui étaient nécessaire à une interprétation plus précise.

5. Matériel végétal

- Site de récolte et identification du matériel végétale

Marrubium vulgare a été récolté en décembre 2022, dans les localités de BENI GHAZLI 34°48'01.7"N 1°12'32.4"W à Tlemcen (voir figure). L'identification botanique de la plante a été

MATERIELS ET METHODES

réalisée en se référant à la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales de Quezel et Santa 1963 et aussi par un botaniste spécialiste.



Figure 35: Photos de l'espèce *Marrubium vulgare* L. (Original)



Figure 36: Localisation du site de récolte de l'espèce *Marrubium vulgare* L.

6. Matériel biologique

Prélèvement sanguin d'un sujet sain.

7. Matériels du laboratoire

Appareils

- **Hydrodistillateur type Clevenger** : Sert à l'extraction d'huiles essentielles.



Figure 37: Hydrodistillateur type Clevenger au laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO).

- **Ionogramme type RAPID Point500** : Conçue pour mesurer la concentration des ions tels que le sodium, potassium et le calcium dans le sang ou plasma.



Figure 38: Ionogramme type RAPIDE Point 500 au laboratoire du service de néphrologie.

- **Spectrophotomètre type JENWAY 7315** : instrument utilisé pour mesurer la concentration de composés chimique (protéines, enzymes) dans une solution en analysant

MATERIELS ET METHODES

la façon dont la solution absorbe ou transmet la lumière a différentes longueurs d'onde, comprend :

- Source de lumière
- Prisme
- Réseau de diffraction pour séparer la lumière en différentes longueurs d'onde
- Porte-cuvette
- Détecteur pour mesurer la quantité de lumière transmise ou absorbée par la solution.



Figure 39: Spectrophotomètre type JENWAY 7315 au laboratoire du service de biochimie.

- **Automate SIEMENS type ADVIA 1800** : utilisées pour automatiser différentes étapes des processus d'analyses biochimiques comme la gestion des échantillons, la préparation de réactif, la gestion des temps, l'acquisition de données et la génération de rapports.

MATERIELS ET METHODES



Figure 40: Automate SIEMENS type ADVIA 1800 au laboratoire du service de biochimie.

- **Centrifugeuse type HuMax14K Human** : utilisées pour séparer le culot globulaire du surnageant. La centrifugation est basée sur la force centrifuge.

Ce modèle a une capacité de 12 tubes avec une vitesse maximale de 14000 tours par minute.



Figure 41: Centrifugeuse type HuMax14K Human au laboratoire du service de biochimie.

- **Agitateur magnétique type HEIDOLPH** : A pour rôle l'homogénéisation des solutions, il se compose d'une plaque chauffante et un aimant créant ainsi un champ magnétique qui agite la solution dans le récipient.

MATERIELS ET METHODES



Figure 42: Agitateur magnétique type HEIDOLPH au laboratoire du service de biochimie.

➤ Vortex



Figure 43: Vortex HumaTwist (Human) au laboratoire du service de biochimie.

➤ Autres : Balance analytique, Bain marie, Micropipettes, Chronomètre.

MATERIELS ET METHODES

Verreries

- Tube avise
- Pipettes pasteur
- Flacons ombrés
- Éprouvettes
- Fioles jaugées 100 mL, 200mL, 250mL
- Béchers
- Pipettes 10mL
- Spatule
- Papier filtre
- Entonnoir
- Pots à prélèvement stérile
- Tubes secs
- Tube EDTA et hépariné
- Cuves de spectrophotomètre

Autres : Garrot, coton, sparadrap, alcool, poire, embouts, étiquettes, seringues

Réactifs et solutions du travail

- Solution Tampon PBS
- Solution de lavage glacée
- Glucantime®
- Éther diéthylique
- $MgCl_2$
- Na Cl
- NaH_2PO_4
- Na_2HPO_4
- Eau distillée
- Solution tampon (0,015% H_2O_2 + DMSO diméthylsulfoxyde)
- Colorant (chromogène)
- H_2SO_4
- TCA (l'acide trichloracétique),
- TBA (acide thio-barbiturique),

MATERIELS ET METHODES

- H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène)
- H₂O physiologique
- TiSO₄ (titanium oxyde sulfate)
- Le tampon KPO₄
- DTNB (l'acide 5,5'-dithiodis-2-nitrobenzoïque),
- HCL
- DNPH (dinitro-phénylhydrazine)
- NaOH

8. Méthodes

8.1 Extraction des huiles essentielles

Nous avons effectué l'extraction de l'HE de *Marrubium vulgare* par l'utilisation d'un hydrodistillateur de type clewenger suivant ces étapes :

- Placer le matériel végétal dans un ballon en verre qui contient une quantité suffisante d'eau
- Chauffer le ballon jusqu'à l'ébullition, ce qui va entraîner les composés volatils y compris l'HE
- Condensation de cette vapeur dans un réfrigérant
- Séparation de l'HE par simple différence de densité puis la récupérer par l'éther diéthylique dans récipient qui sera par la suite évaporé.



Figure 44: Montage d'hydrodistillation au laboratoire des substances naturelles et bioactives (LASNABIO).

MATERIELS ET METHODES

Conservation des HEs extraites

Vu l'instabilité des huiles essentielles leurs conservation nécessite des précautions particulières, donc nous l'avons préservé dans un pilulier ombré, bien scellé à basse température.



Figure 45: Conservation de notre huile essentielle dans un pilulier.

8.2 Préparation des solutions du travail

❖ Solution de lavage glacée

La solution de lavage consiste en un mélange de : 150 mmol/L de NaCl avec 2 mmol/L de MgCl₂. Elle est instable à température ambiante donc elle doit être conservée au frigo à 2-5°C,

• Préparation d'une solution fille NaCl 150 mmol

À partir d'une solution mère 1 molaire de NaCl du poids moléculaire 58,44 g/mole pour 1L, on a préparé 100 ml d'une solution fille NaCl de 150 mmol/l.

• Préparation d'une solution fille de MgCl₂ à 2mmol

À partir d'une solution mère 2 molaire du MgCl₂ du poids moléculaire 406,6 g/mole pour 1L, on a préparé une solution fille 100ml de MgCl₂ 2 mmol par dilution.

❖ Solution tampon (TPBS)

Le tampon phosphate salin PBS (Phosphate Buffered Saline) est une solution ajustée à un pH de 7,4 ce qui limite les conditions de pH et d'ions des fluides corporels tels que le sang afin de maintenir un environnement tamponné stable pour les cellules et les protéines en suspension. Elle est constituée de sels de phosphate (souvent du phosphate de sodium disodique Na₂HPO₄ et du phosphate de sodium monobasique NaH₂PO₄), de chlorure de sodium (NaCl) et d'eau distillée.

MATERIELS ET METHODES

Préparation de 02 solutions mères de NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 à 0,2 molaires

- **Préparation d'une solution de phosphate monosodique NaH_2PO_4**

À partir d'une solution mère 1 molaire de NaH_2PO_4 du poids moléculaire 119,98 g/mole, nous avons dissous une quantité de 5,999 g de NaH_2PO_4 dans 250 mL d'eau distillée pour obtenir une solution à 0.2 mol.

- **Préparation d'une solution de phosphate disodique Na_2HPO_4**

À partir d'une solution mère 1 molaire de Na_2HPO_4 du poids moléculaire 358,14 g/mol, nous avons dissous 17,907 g de Na_2HPO_4 dans 250 mL d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,2 mol.

- **Préparation d'une solution mère TPBS (0,1 molaire)**

Dans une fiole jaugée de 200 mL, nous avons mélangé 19 mL de NaH_2PO_4 avec 81 mL de Na_2HPO_4 on aura un volume de 100 mL et nous avons complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge pour obtenir une solution mère tampon 0,1 molaire avec un $\text{pH} = 7,4$.

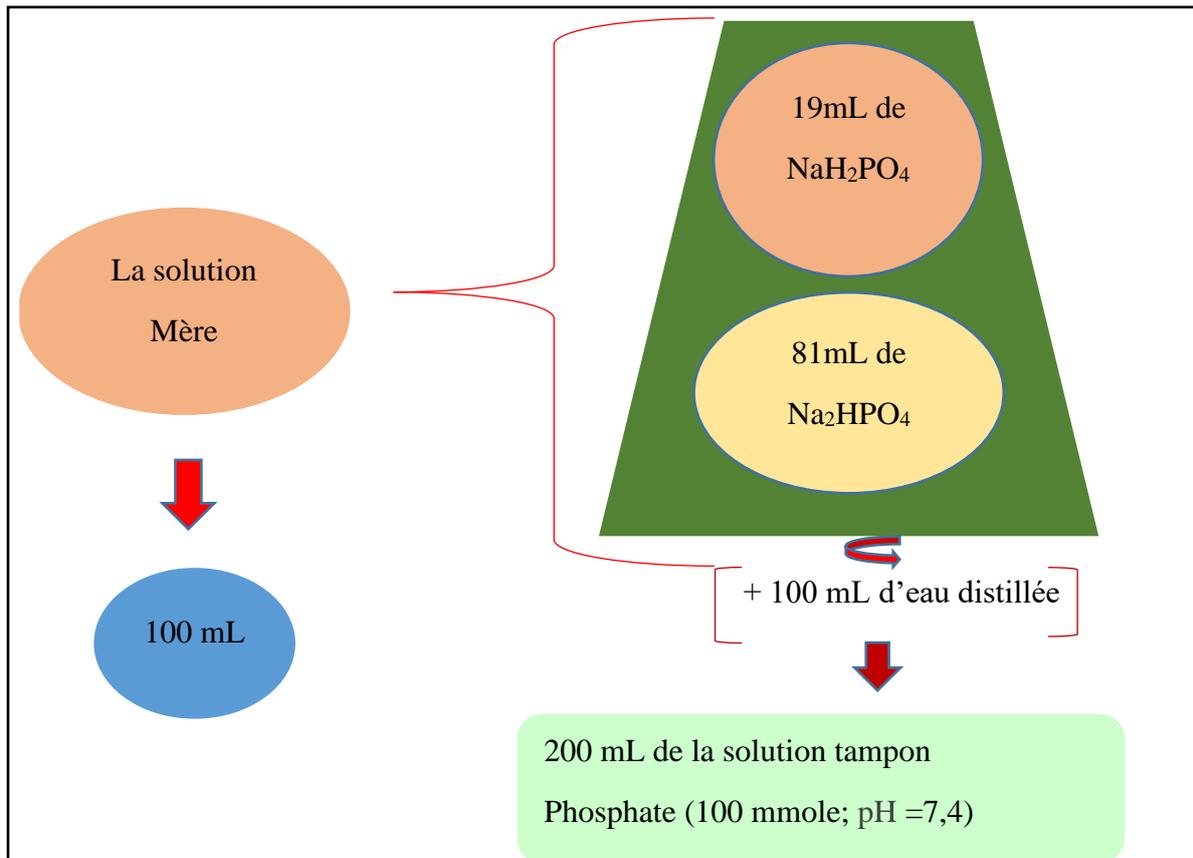


Figure 46: Préparation de la solution mère.

MATERIELS ET METHODES

• Préparation de la solution fille du travail

Nous avons prélevé 10 mL de la solution mère préalablement préparée avec 14 mL de NaCl (1M) dans une fiole et nous avons ajusté avec de l'eau distillée à 100 mL.

La solution obtenue est la solution tampon de travail PBS (100 mmoles) isotonique avec un pH =7,4.

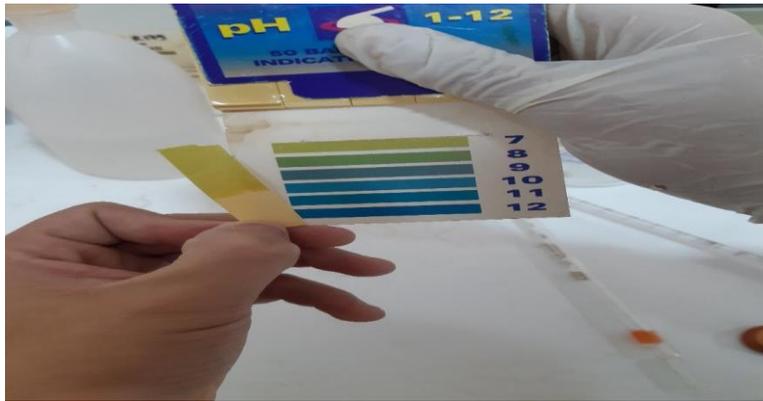


Figure 47: Papier *pH* qui indique une valeur de 7,4.

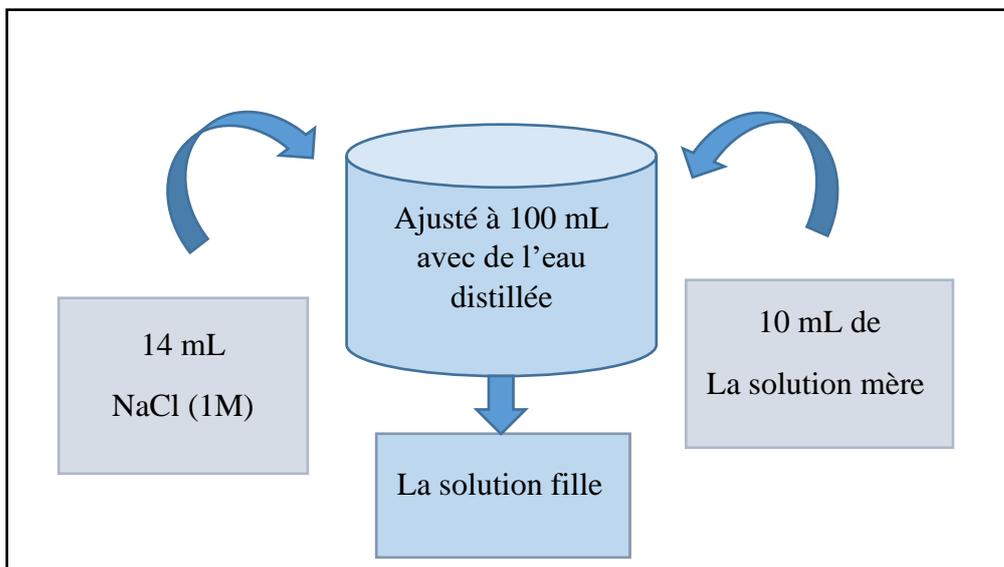


Figure 48: Préparation de la solution fille.

8.3 Préparation de l'échantillon

• Prélèvement

Une prise de sang a été effectuée sur un sujet en bonne santé à jeun.

Nous avons partagé ce volume de sang (10 mL) en deux parties égales dans :

- Un tube EDTA pour faire une FNS
- Un tube à l'héparinate de sodium pour effectuer nos tests.

• Préparation de la suspension du travail

Le tube hépariné a été centrifugé pendant 5 minutes à 4000 trs /min, après séparation nous avons marqué le niveau du plasma, puis l'éliminé et le remplacer par notre solution de lavage glacée à volume égale tous en mélangeant doucement afin d'éviter l'hémolyse mécanique.

Un 2^{ème} lavage est nécessaire pour éliminer toute trace du plasma donc nous avons centrifugé à nouveau, éliminé le surnageant et le remplacer par la TPBS. C'est l'échantillon sang modifié.

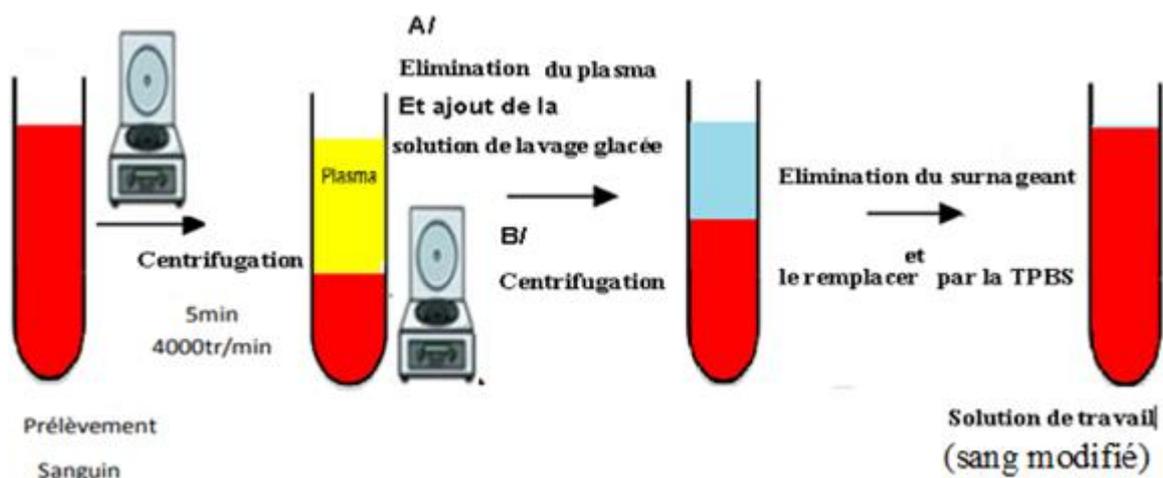


Figure 49: Préparation de la solution du travail.

• Suspension cellulaire mère

Nous avons introduit dans un bécher, 63 mL de la solution tampon PBS avec 3 mL du sang modifié pour obtenir notre suspension cellulaire mère avec un volume final de 66mL.

MATERIELS ET METHODES

- **La dilution de Glucantime®**

Nous avons mélangé 1 mL de Glucantime avec 9 mL d'eau distillée pour obtenir une solution diluée à 1/10^{ème}.

- **La concentration de l'huile essentielle**

Après plusieurs extractions, nous avons obtenu un volume total d'huile essentielle de 0,6 mL. Selon une étude antérieure il a été conclu que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* augmente proportionnellement à sa concentration⁽¹⁴¹⁾. Donc nous avons travaillé avec un volume de 500 µL d'huile essentielle, sans dilution.

- **Suspension fille du travail**

À partir de la suspension cellulaire mère, nous avons préparé 3 suspensions filles du travail en utilisant des pots de prélèvement stériles :

- Pots (1) : Suspension sans Glucantime® : 17,8 mL de la suspension cellulaire mère.
- Pots (2) : 17,8 mL de la suspension cellulaire mère + 75µL de Glucantime® diluée au 1/10^{ème}.
- Pots (3) : 17,8 mL de la suspension cellulaire mère + 75µL de Glucantime® diluée au 1/10^{ème} + 500µL de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L.

Les 3 pots ont été placés sur un agitateur magnétique et le chronomètre a été lancé.

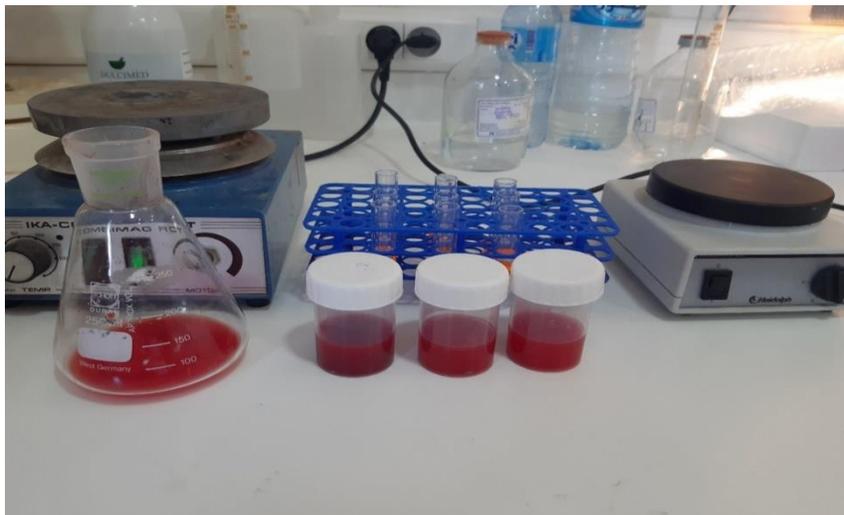


Figure 50: Préparation des suspensions cellulaires filles.

MATERIELS ET METHODES

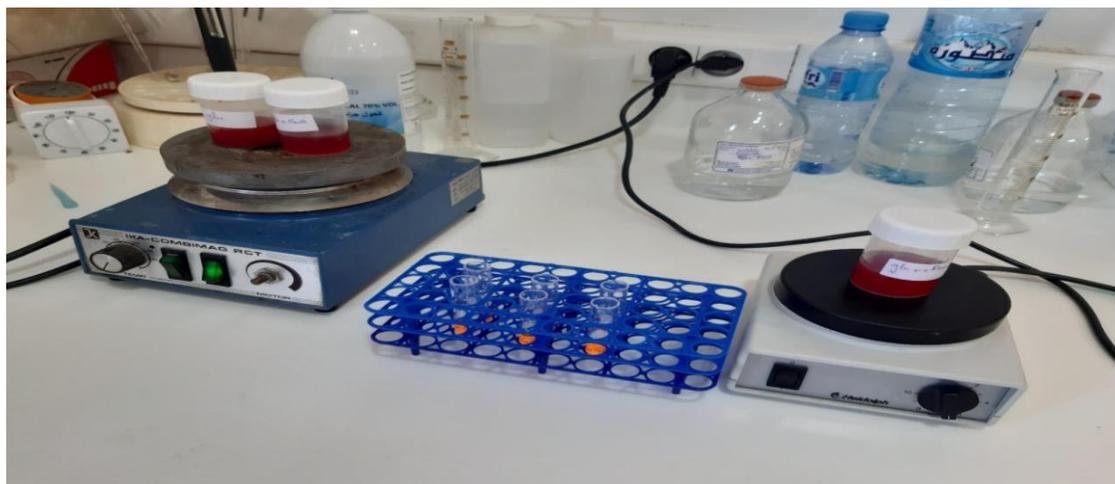


Figure 51: Agitation des suspensions cellulaires à l'aide d'un agitateur magnétique.

8.4 Préparation des tubes à doser

Nous avons réparti 3 séries de tests de 3 tubes correspondant chacun aux instants T_0 , T_{45} et T_{90} . Chaque tube a été rempli préalablement avec 3 mL de solution de lavage glacée.

À l'instant T_0 , nous avons ajouté 2 mL de la suspension fille du travail (suspension sans Glucantime®, suspension contenant le Glucantime® et la suspension contenant le Glucantime® avec l'huile essentielle) dans le premier tube de chaque série de tests (série 1, série 2, série 3) respectivement, puis nous avons centrifugé à 4000 tr/min pendant 5 min et récupéré séparément le culot et le surnageant.

Nous avons répété la procédure après 45min et 90min pour les tubes restants.



Figure 52: Préparation des tubes à doser. **Figure 53:** Séparation entre le culot et le surnageant.

MATERIELS ET METHODES

Le surnageant sert pour doser l'hémoglobine extracellulaire et le culot pour le dosage de la concentration intracellulaire de [K+] et [LDH]

- Dosage K⁺ : après l'ajout de 1mL d'eau distillée au culot nous avons procédé à la lyse des cellules à l'aide d'un vortex pour mélanger.
- Dosage LDH : à partir de 50µL prélever du tube de dosage de K⁺ nous avons ajouté 450 µL d'eau distillée.
- Dosage des paramètres du stress oxydant : le même protocole a été établi, nous avons préparé 2 tubes dont le culot a été reparti chacun sur 3 tubes à doser après l'ajout de 1mL d'eau distillée.

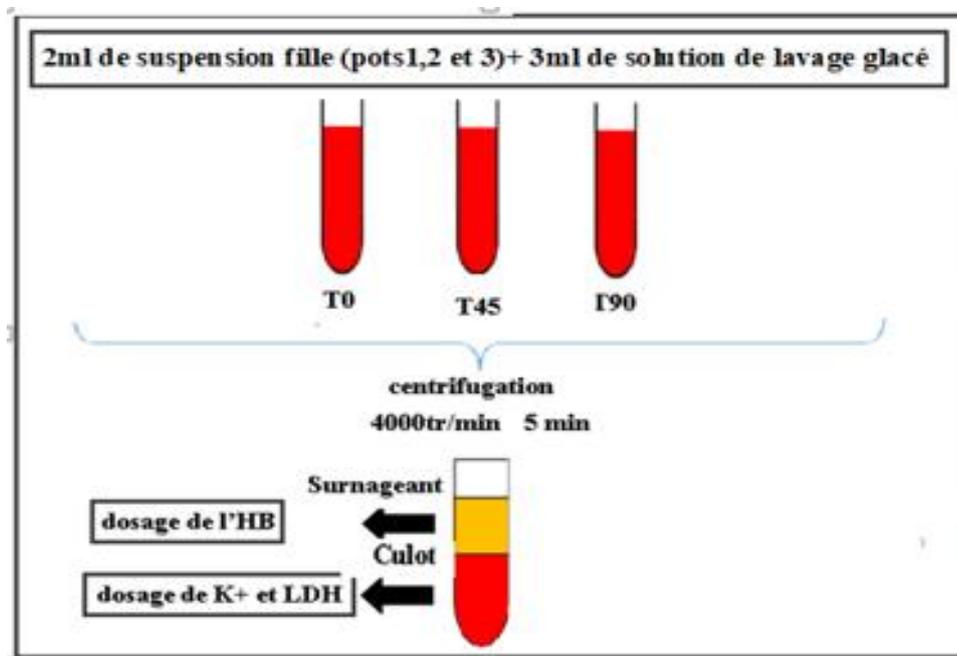


Figure 54: Préparation des tubes du dosage de LDH, potassium et d'hémoglobine extracellulaire.

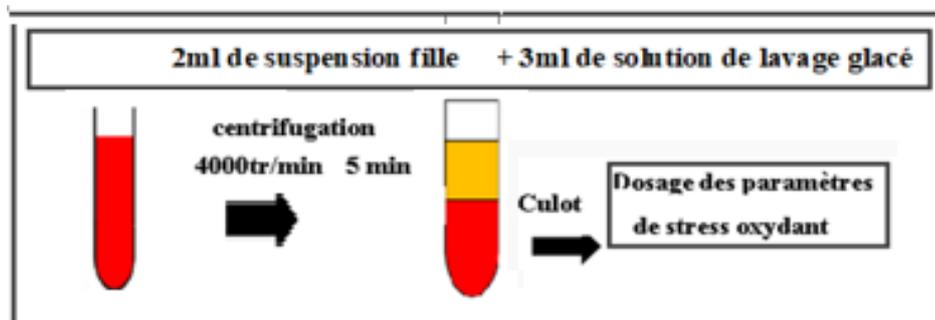


Figure 55: Préparation des tubes du dosage des paramètres du stress oxydatif.

MATERIELS ET METHODES

Détermination de la concentration du potassium intracellulaire

À T₀ nous avons réalisé une lecture sur l'ionogramme des 3 premiers tubes qu'on a vortexé ; et nous avons patienté 45 min et 90 min pour faire la lecture des autres tubes qui suivent.

Détermination de la concentration du LDH intracellulaire

Nous avons réparti 9 tubes en 3 séries (suspension sans Glucantime®, suspension avec Glucantime® seule et suspension avec Glucantime® et l'HE de *Marrubium vulgare*)

À chaque instant T₀, T₄₅, T₉₀, nous avons prélevé 50µL de la solution préalablement préparée pour le dosage du potassium dans 450 µL d'eau distillée. Le dosage a été réalisé à l'aide d'un automate SIEMENS ADVIA 1800.

Principe de la méthode

Le lactate déshydrogénase oxyde le substrat en présence de NAD⁺ afin de produire du pyruvate et du NADH qui absorbe à 340nm, en présence du tampon L-lactate à pH =9,4.

Détermination de la concentration de l'hémoglobine extracellulaire

Dans des cuves de spectrophotomètre, nous avons mélangé 500 µL de la solution tampon (0,015% H₂O₂ + DMSO diméthylsulfoxyde) avec 50 µL de colorant 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB chromogène), après incubation pendant 10 minutes. Nous avons ajouté 10 µL de surnageant correspondant à chaque instant (T₀, T₄₅, T₉₀) de chaque série de tests (suspension sans Glucantime®, suspension avec Glucantime® seule et suspension contenant du Glucantime® avec l'HE), nous avons laissé incuber pendant 10 minutes jusqu'à l'apparition d'une couleur rose. Ensuite nous avons ajouté 500 µL de H₂SO₄ en vue de stopper la réaction avec un changement de couleur vers le jaune. La lecture de l'absorbance (A) de nos échantillons ainsi que celle de l'étalon de concentration connue ([Hb]=0,582 g/L) a été faite au bout de 10 minutes d'incubation à température ambiante au spectrophotomètre à 450 nm en utilisant l'eau distillée comme blanc, et la concentration d'hémoglobine extracellulaire a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$A_{\text{étalon}} \longrightarrow 0,582 \text{ g/L}$$

$$A_{\text{échantillon}} \longrightarrow X \text{ g/L}$$

MATERIELS ET METHODES

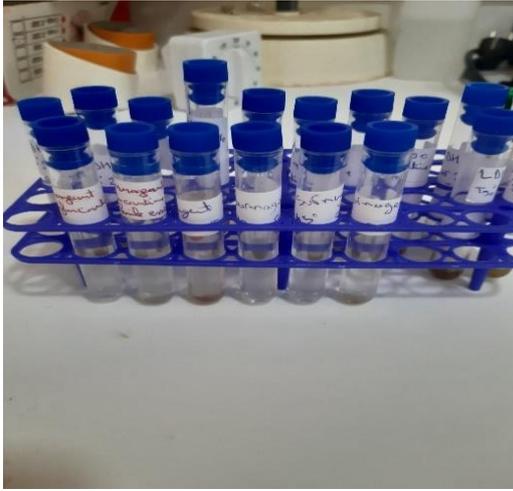


Figure 56: Tubes contenant le surnageant.

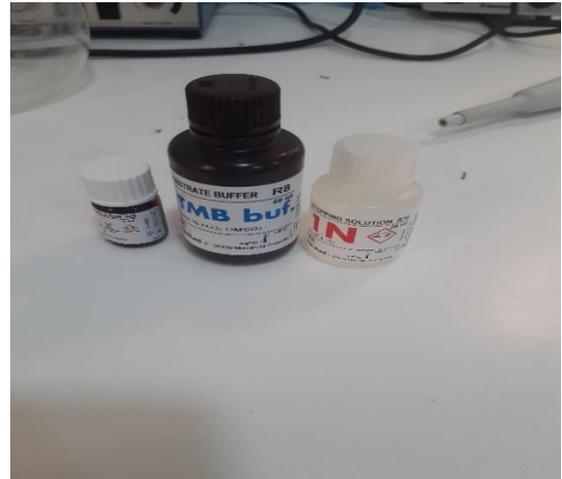


Figure 57: Les réactifs du dosage de l'hémoglobine.

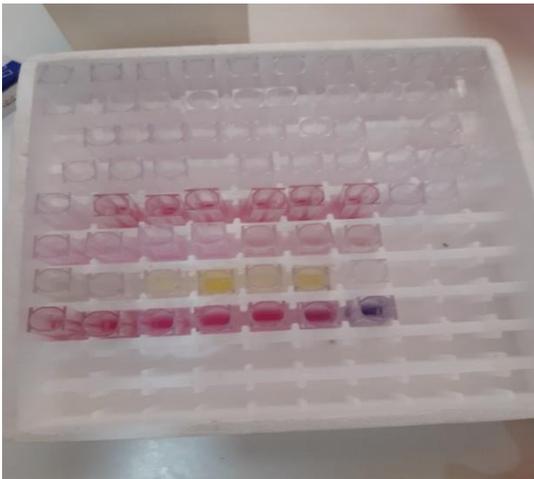


Figure 58: Les cuves de spectrophotomètre.



Figure 59: Condition du travail à l'abri de la lumière.

Protocole de dosage des paramètres de stress oxydatif

1- Dosage du malondialdéhyde (MDA) (Nourooz-Zadeh et al. 1996)

- **Principe**

La méthode biochimique utilisée consiste en une formation d'un chromogène composé de deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec une molécule de MDA par la réaction préalable entre les aldéhydes et TBA à chaud (100° en présence de TCA). Ce chromogène absorbe à une longueur d'onde de 532 nm. La concentration de MDA est calculé en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($\epsilon = 1.56.10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l. cm}^{-1}$)⁽¹⁷²⁾.

- **Mode opératoire**

- 100 μl d'échantillon
- 100 μl TBA 0,67%
- 500 μl TCA (acide trichloracétique) 20%
- Vortexer et incuber au bain marie à 100 °C pendant 10 min
- Laisser refroidir puis centrifuger à 6000 t/min pendant 10 min
- Lire la DO du surnageant au spectrophotomètre contre le blanc (H₂O distillée) à 532nm.

$$C = \text{DO}/\epsilon \text{ (reporter les résultats en } \mu\text{mol/L).}$$

2- Dosage de l'activité de la catalase (Aebi., 1974 et Boutine et coll., 1989)

- **Principe**

La concentration de la catalase est déterminée par méthode spectrophotométrique. Le milieu réactionnel contient : l'enzyme dans l'échantillon à doser et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Après 5 min d'incubation, le réactif titanium oxyde sulfate (TiOSO₄) est ajouté pour former un complexe coloré. La catalase décompose le H₂O₂ ce qui réduit sa concentration également la formation du complexe. Le spectrophotomètre va mesurer la DO à 420 nm. À partir d'une gamme étalon les concentrations du H₂O₂ restantes sont obtenues⁽¹⁷³⁾.

L'activité enzymatique de la catalase est déterminée selon la loi suivante :

$$A = \log A_1 - \log A_2.$$

A₁ est la concentration de H₂O₂ de départ.

MATERIELS ET METHODES

A2 est la concentration de H₂O₂ après l'incubation.

L'activité spécifique est exprimée en **U/ml/min**.

- **Mode opératoire**

- 500 µl d'échantillon
- 500 µl d'H₂O₂ à 30 mmol/L
- 500 µl d'H₂O physiologique
- Vortexer
- Incuber à température ambiante pendant 5 min
- Ajouter 500 µl TiSO₄
- Vortexer
- Lire la DO au spectrophotomètre contre le blanc (H₂O distillée) à 420 nm

3- Dosage du Glutathion réduit (GSH) (Ellman., 1959)

- **Principe**

Par méthode colorimétrique et en milieu tamponné, le GSH réagit avec le réactif d'**Ellman** (DTNB) pour former l'acide thionitrobenzoïque (TNB) qui absorbe à 412 nm avec un coefficient d'extinction égale à 13.6 mM⁻¹.cm⁻¹. Selon la réaction suivante⁽¹⁷⁴⁾ :



- **Mode opératoire**

- 1ml de tampon KPO₄ (0,2M, pH = 7,5)
- 0,5 ml DTNB (3mM)
- 100 µl d'échantillon + 400 H₂O
- Incuber 30 min à 37 °C
- Lire la DO à 412 nm contre le blanc

$C = DO / \epsilon$ (mM).

4- Dosage des protéines carbonylées (Levine et al. 1990)

- **Principe**

Selon LEVINE, les protéines carbonylées réagissent avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) pour former un chromophore puis la teneur est mesurée à 380 nm par spectrophotomètre et en utilisant le coefficient d'extinction⁽¹⁷⁵⁾.

- **Mode opératoire**

Prévoir 2 tubes pour chaque échantillon :

- Tube blanc : 50 µl échantillon et 1 ml de HCL 2mol/L et vortexer,
- Tube test : 50 µl échantillon et 1 ml de DNPH et vortexer,
- Incuber pendant 1h à T° ambiante,
- Ajouter dans chaque tube 200 µl de TCA et centrifuger à 3000 t/min pendant 10 min,
- Éliminer le surnageant et solubiliser le culot dans 2 ml de NaOH à 2M,
- Lire la DO contre un blanc à 380 nm.

$C = DO / \varepsilon$ ($\varepsilon = 21,5 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ reporter les résultats en $\mu\text{mol/L}$).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Toutes les expériences ont été effectués *In vitro* sur le globule rouge dans les mêmes conditions de travail ; à T° ambiante et en milieu tamponné TPBS à pH =7,4.

Nous avons étudié l'effet de l'huile essentielle du marrube blanc sur la toxicité du Glucantime® vis-à-vis des globules rouges en évaluant deux aspects. D'une part, le suivi de la perturbation de la perméabilité membranaire aux ions K⁺ en utilisant également le dosage du LDH intracellulaire et d'autre part nous avons mesuré la quantité d'hémoglobine extracellulaire secondaire à l'hémolyse.

Les résultats de nos tests et les valeurs obtenues sont présentés dans les graphiques en fonction du temps.

1. Rendement

Le rendement en huile essentielle a été calculé par la formule suivante⁽¹⁷⁶⁾ :

$$R (\%) = (M' / M_s) \times 100$$

R : Rendement en %.

M' : Masse de l'huile essentielle extraite en g.

M_s : Masse de la matière végétale utilisée en g.

Après la pesée on a obtenu les résultats suivants : M' = 0,54g et M = 1200 g

Le rendement final était de 0,045%

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

2. Résultats du dosage des paramètres étudiées

Nous avons réalisé 8 points tests pour chaque paramètre biochimique afin de confirmer les résultats obtenus.

A. Dosage du potassium [k⁺] intracellulaire

✓ Test n°1

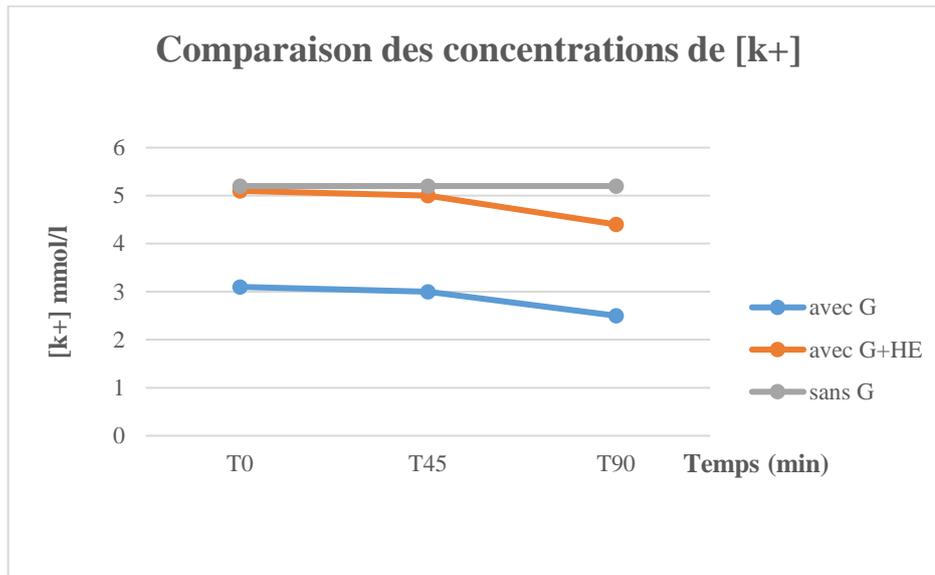


Figure 60: Concentration de [k⁺] intracellulaire.

Les valeurs enregistrées à partir de la suspension sans Glucantime® sont restées relativement constantes au cours du temps pour l'ensemble des paramètres étudiés.

De ce fait, les conditions de travail stables ont été confirmées et les variations dues à des facteurs externes sont minimisées, ce qui nous permet d'exclure la présence d'une éventuelle hémolyse déclenchée au cours des manipulations ou de l'agitation mécanique.

On a observé une diminution importante de la concentration intracellulaire du potassium au cours du temps dans la suspension cellulaire contenant le Glucantime®. Cependant, ces taux étaient plus élevés en présence de l'HE.

La baisse initiale de la concentration du potassium peut être expliquée par plusieurs mécanismes. Tout d'abord, elle peut être attribuée à l'inhibition de la pompe K⁺/Na⁺ ATPase qui est responsable du maintien de la concentration du potassium à l'intérieur des cellules, elle peut également être due à la lyse de la membrane cellulaire ou les deux mécanismes à la fois.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°2

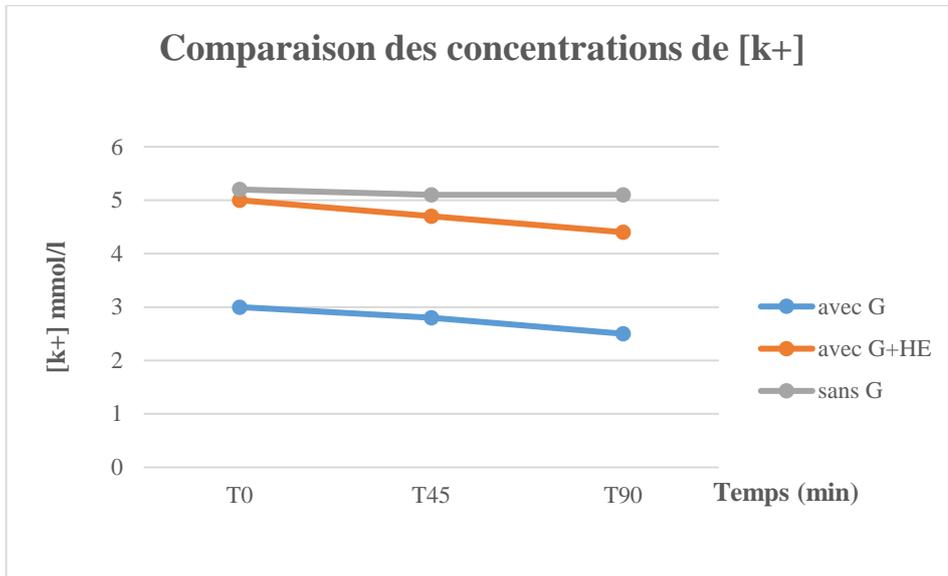


Figure 61: Concentration de [k+] intracellulaire.

✓ Test n°3

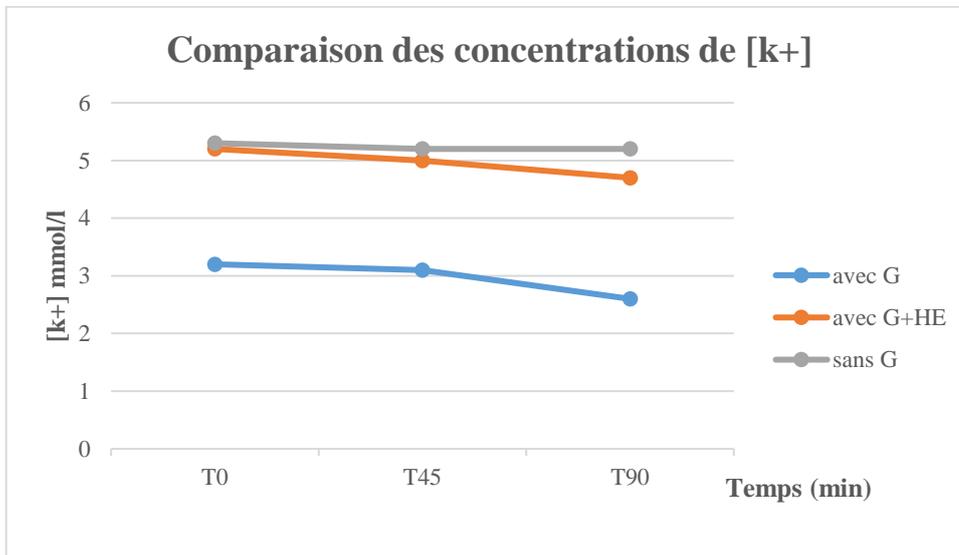


Figure 62: Concentration de [k+] intracellulaire.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°4

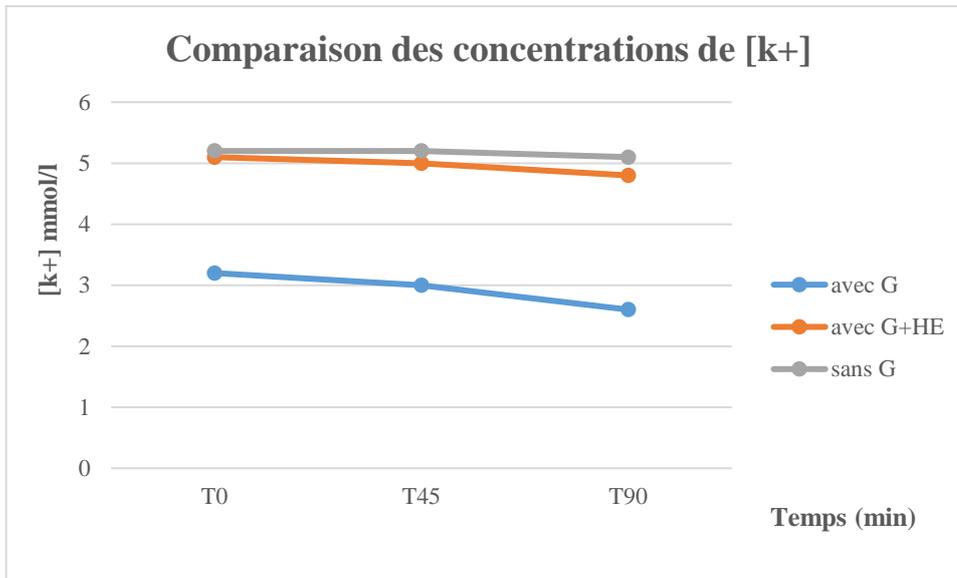


Figure 63: Concentration de [k+] intracellulaire.

✓ Test n°5

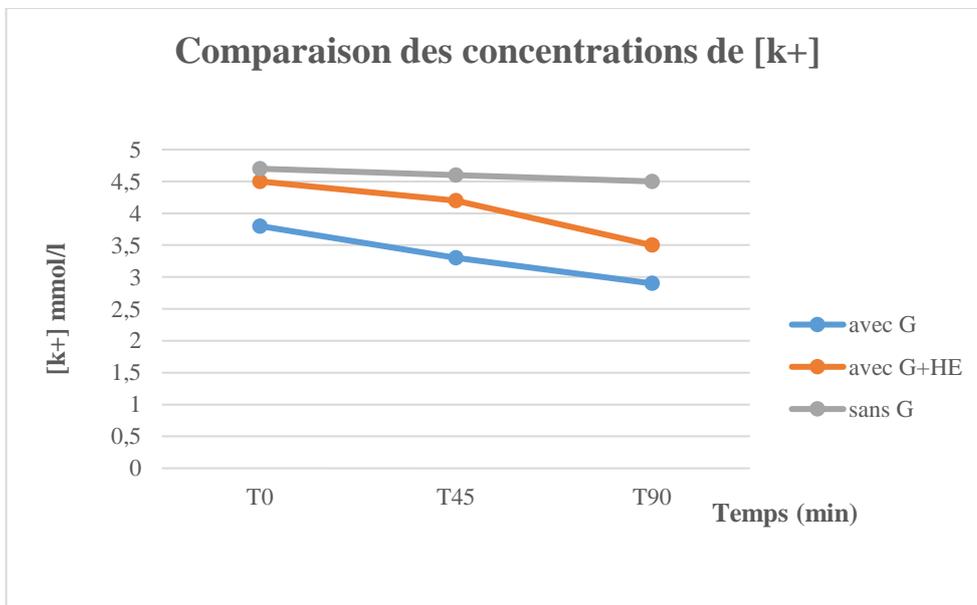


Figure 64: Concentration de [k+] intracellulaire.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°6

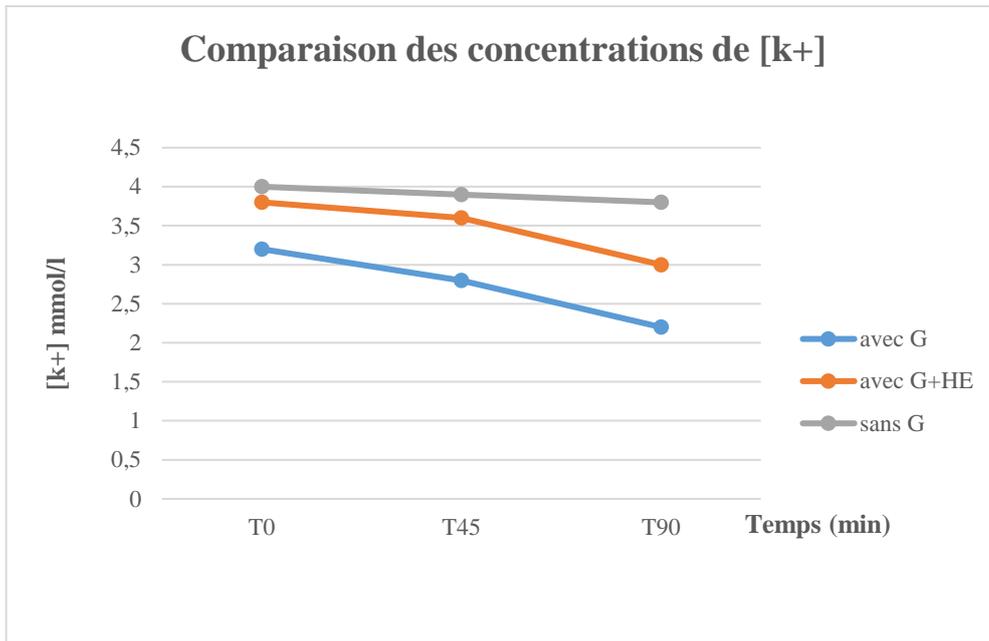


Figure 65: Concentration de [k+] intracellulaire.

✓ Test n°7

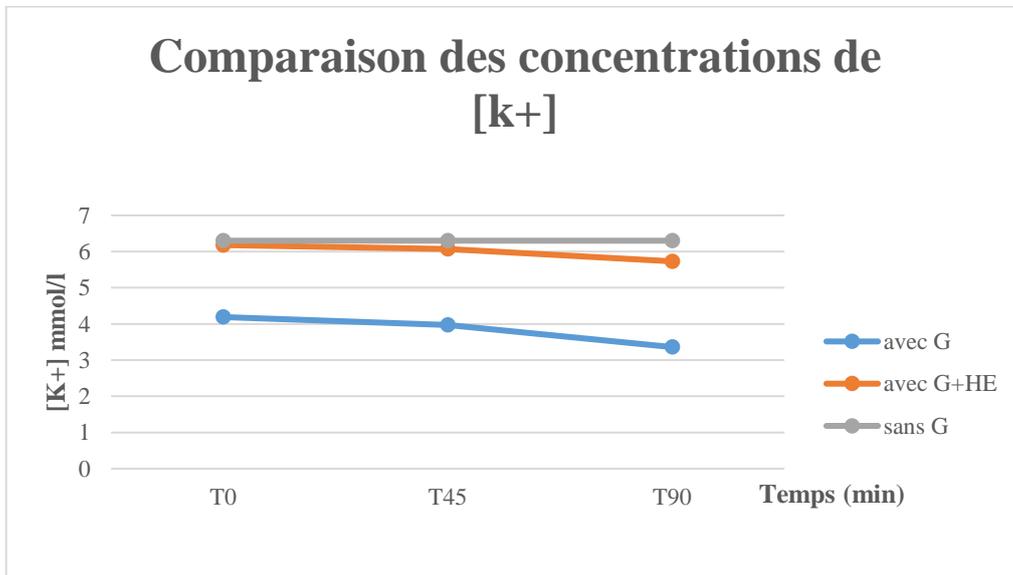


Figure 66: Concentration de [k+] intracellulaire.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°8

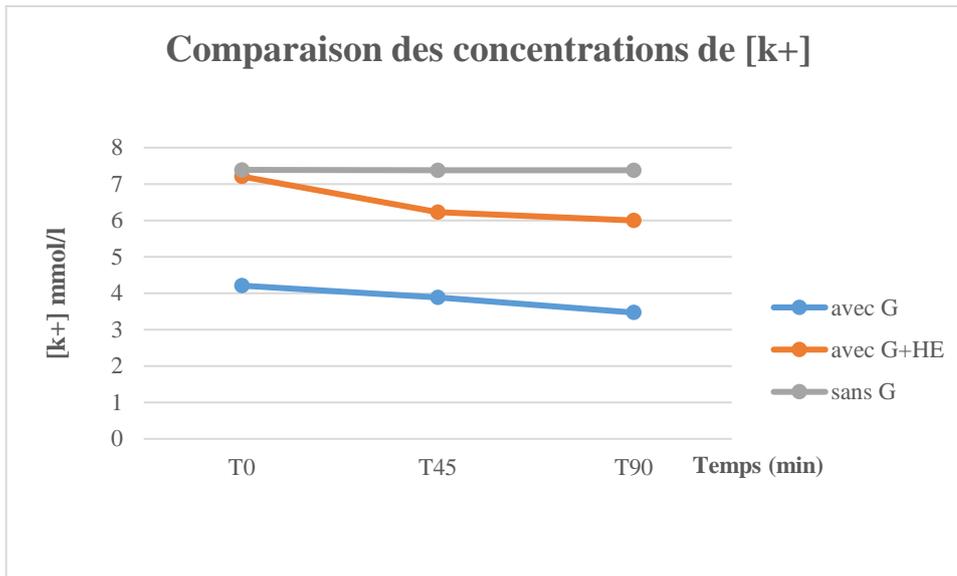


Figure 67: Concentration de [k+] intracellulaire.

Les résultats (test 2 → test 8) sont similaires à ceux obtenus dans la première manipulation (test 1).

B. Dosage de LDH intracellulaire

✓ Test n°1

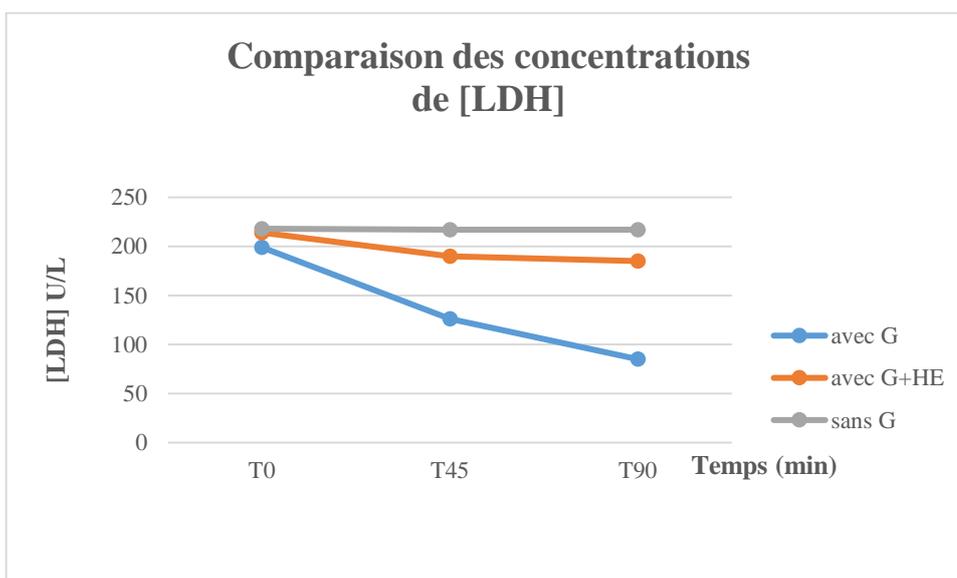


Figure 68: Concentration intracellulaire de LDH.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Dans la suspension contenant le Glucantime® nous avons détecté une diminution progressive de l'enzyme LDH au cours du temps.

En présence de l'HE de *Marrubium vulgare* les taux de LDH sont nettement plus élevés.

Cette diminution peut s'expliquer par la libération du LDH intracellulaire suite à une lyse de la membrane du globule rouge.

✓ Test n°2

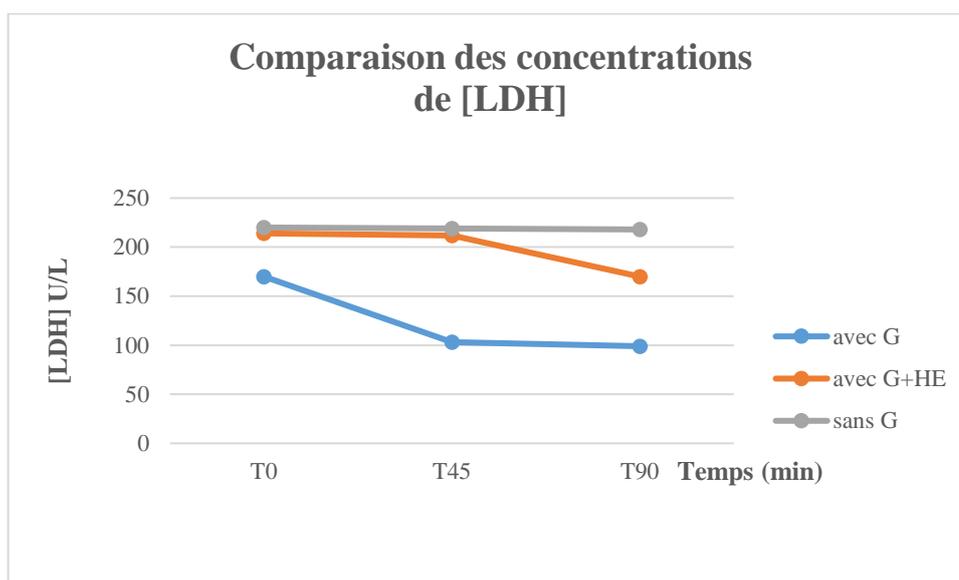


Figure 69: Concentration intracellulaire de LDH.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°3

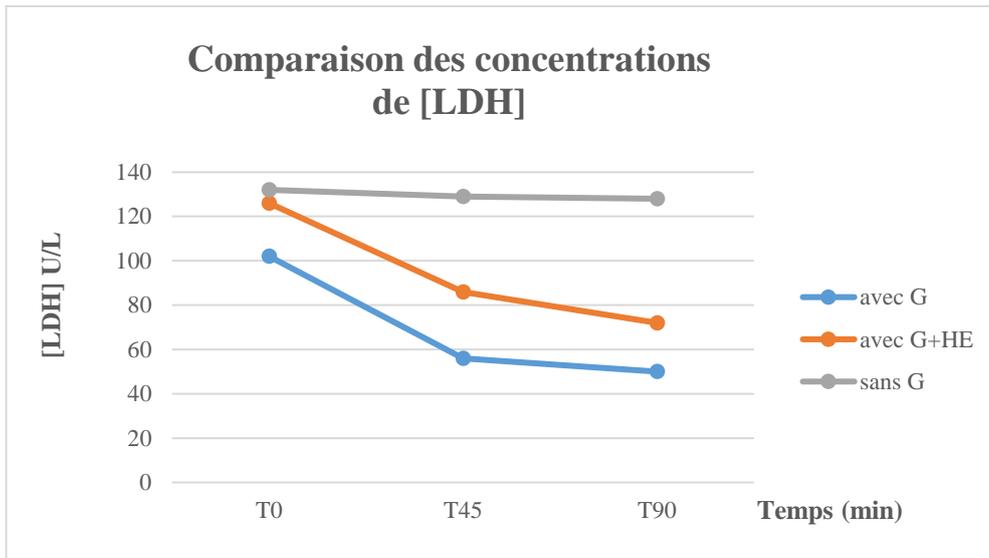


Figure 70: Concentration intracellulaire de LDH.

✓ Test n°4

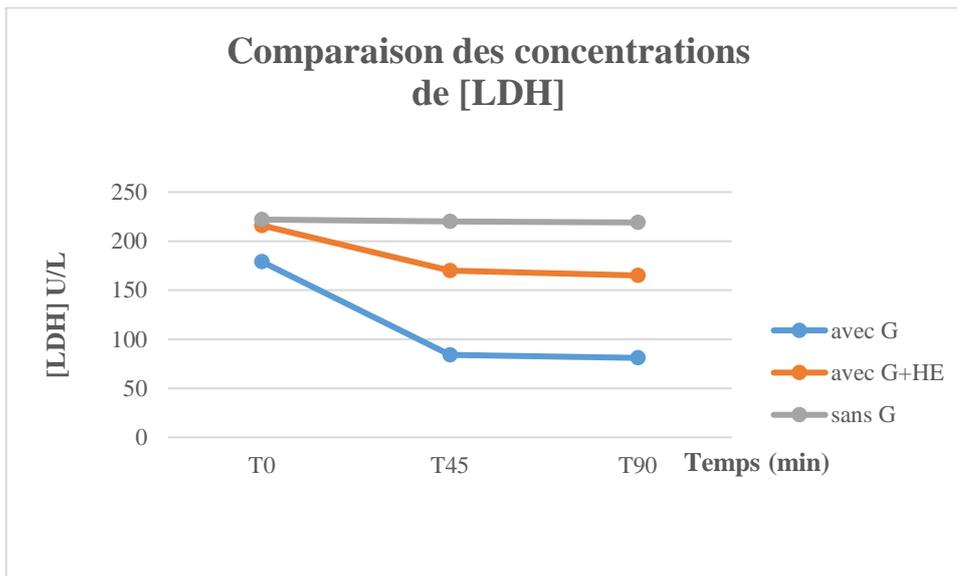


Figure 71: Concentration intracellulaire de LDH.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°5

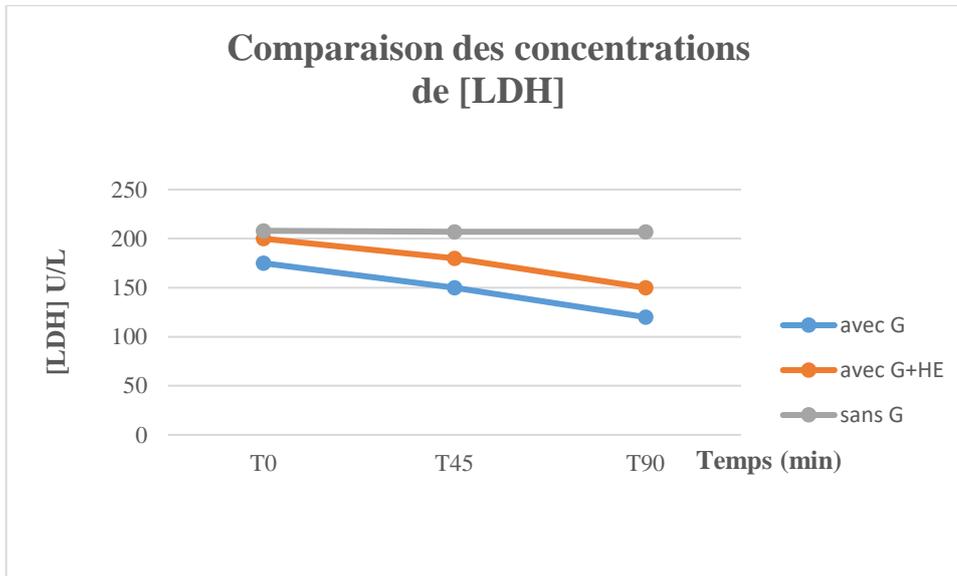


Figure 72: Concentration intracellulaire de LDH.

✓ Test n°6

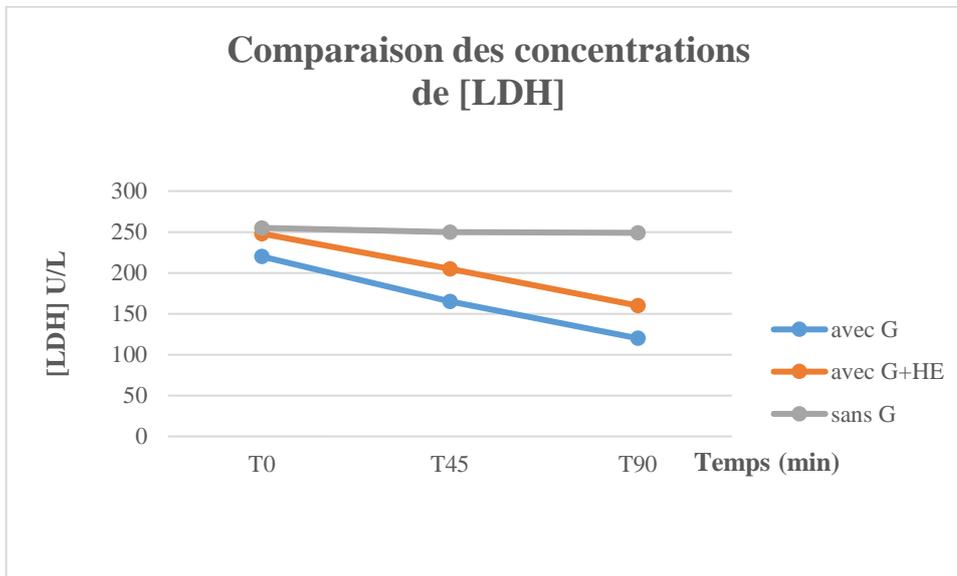


Figure 73: Concentration intracellulaire de LDH.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°7

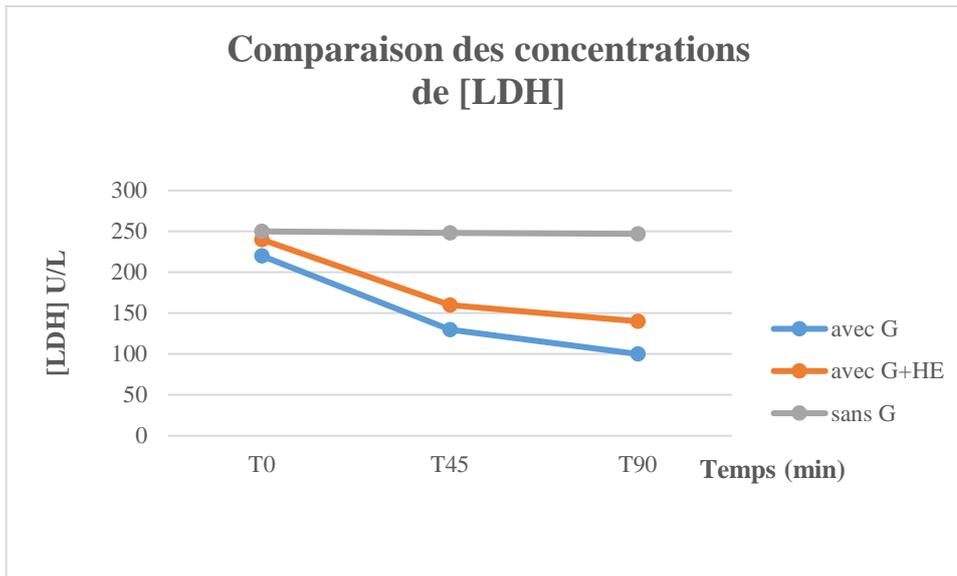


Figure 74: Concentration intracellulaire de LDH.

✓ Test n°8

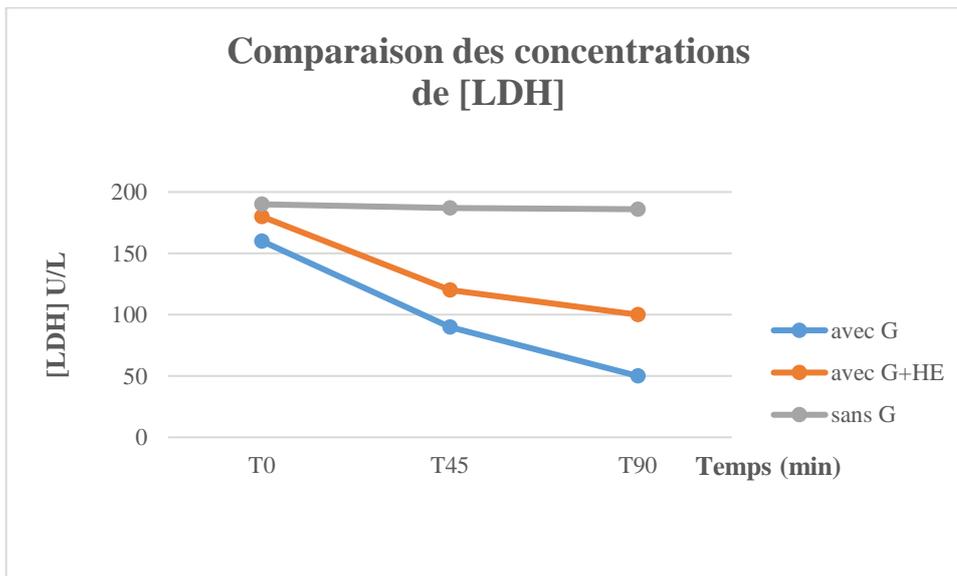


Figure 75: Concentration intracellulaire de LDH.

Les résultats (test 2 → test 8) sont similaires à ceux obtenus dans la première manipulation (test 1).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

C. Dosage de l'hémoglobine extracellulaire

✓ Test n°1

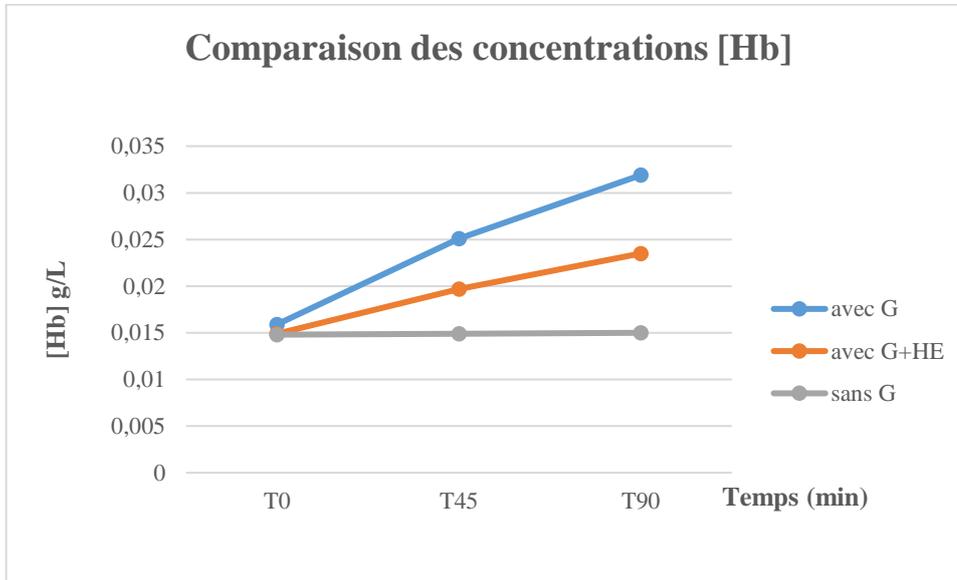


Figure 76: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

Nous avons observé une augmentation progressive des concentrations d'hémoglobine extracellulaire dans la suspension contenant le Glucantime au cours du temps. Cependant, En présence de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. nous avons constaté des niveaux réduits d'hémoglobine extracellulaire.

✓ Test n°2

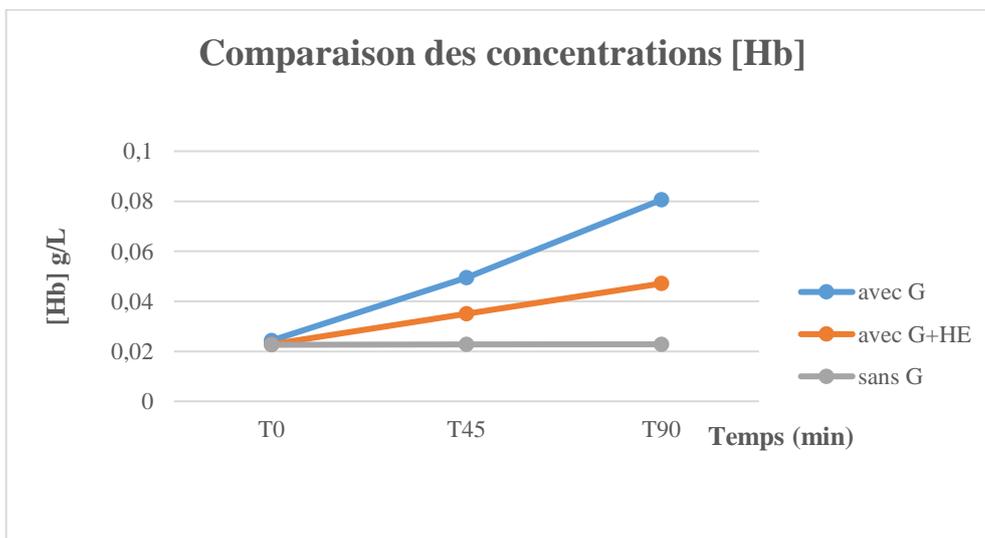


Figure 77: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°3

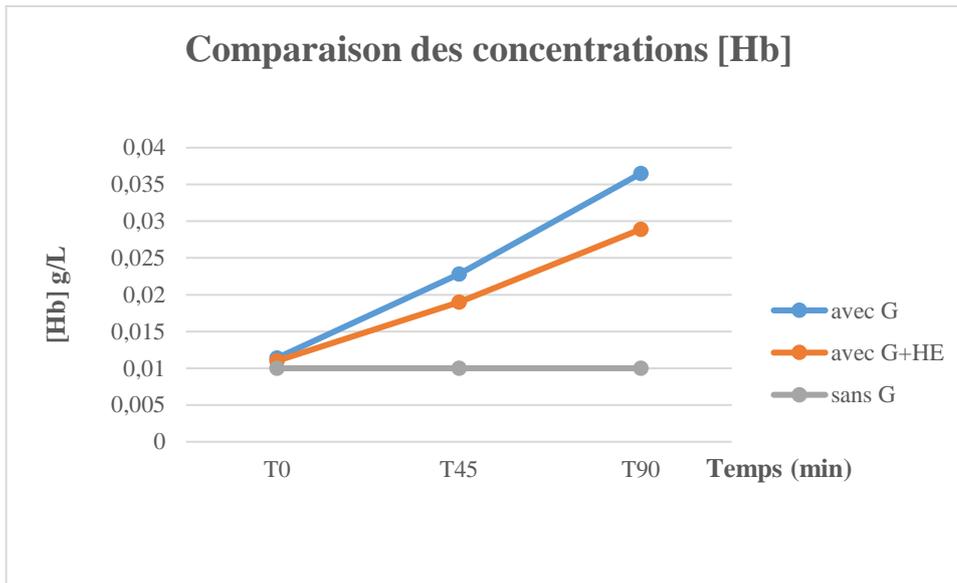


Figure 78: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

✓ Test n°4

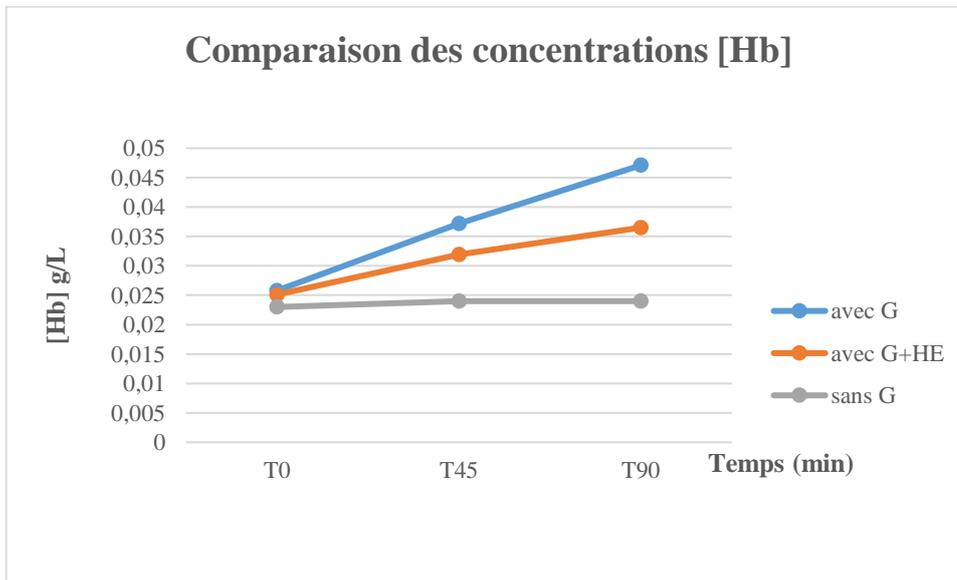


Figure 79: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°5

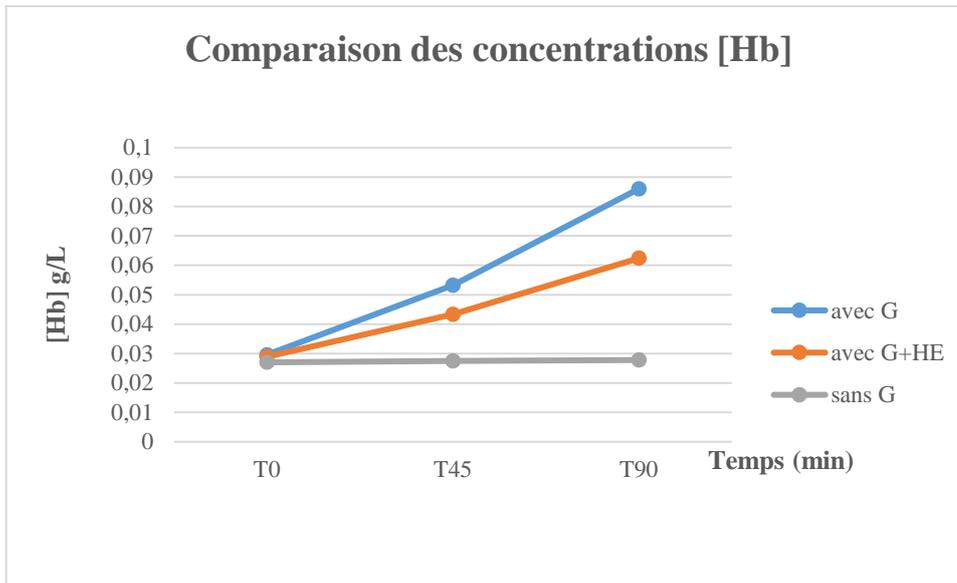


Figure 80: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

✓ Test n°6

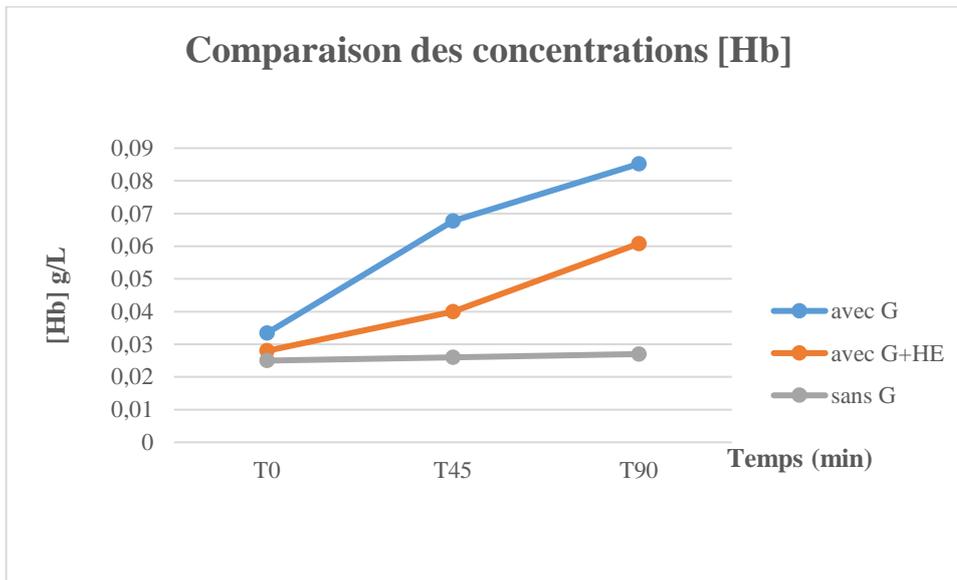


Figure 81: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Test n°7

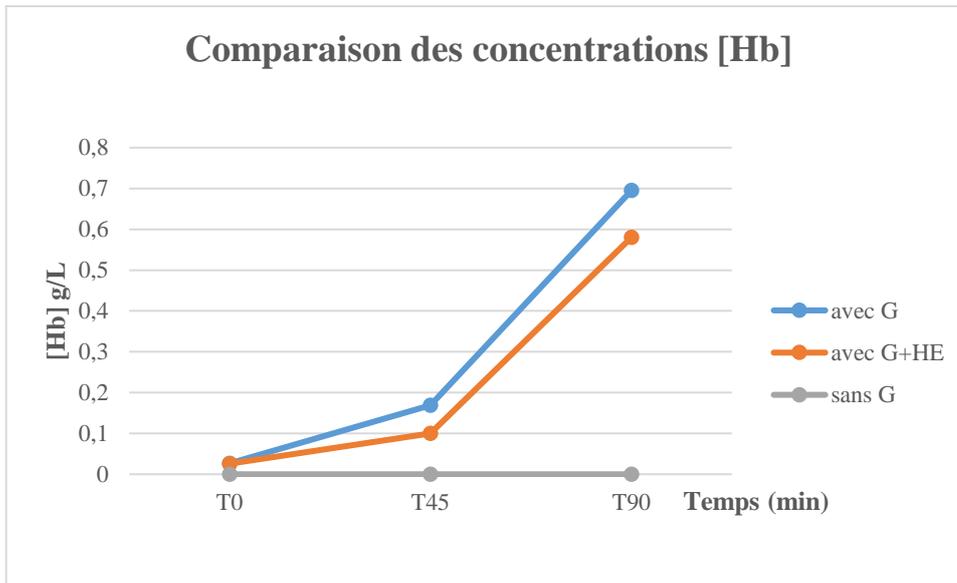


Figure 82: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

✓ Test n°8

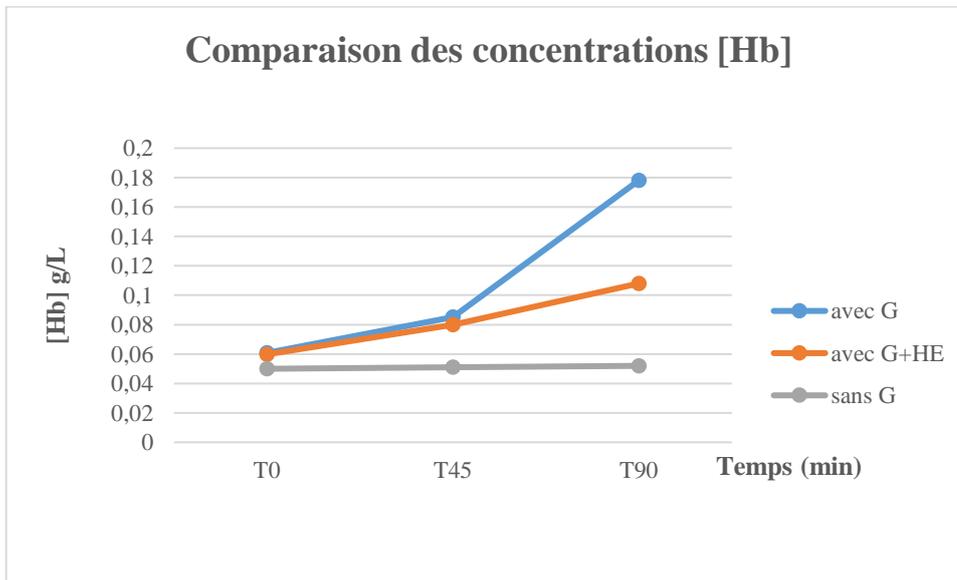


Figure 83: Concentration extracellulaire de l'hémoglobine.

Les résultats (test 2 → test 8) confirment les observations faites lors de la première manipulation (test 1).

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

D. Dosage des paramètres du stress oxydant

✓ Catalase

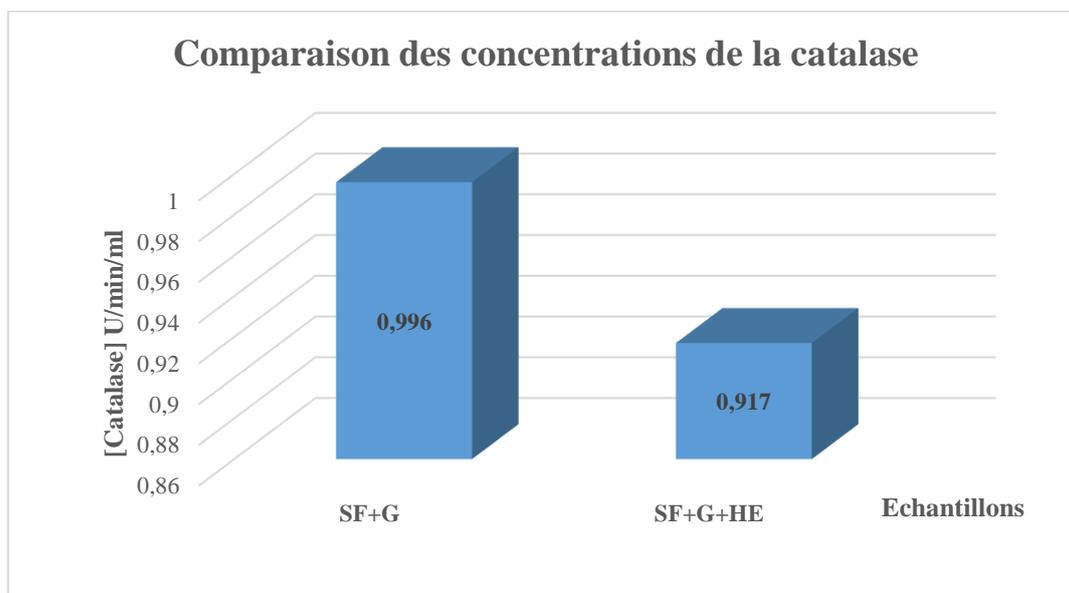


Figure 84: Activité de la catalase en présence et en absence de l'HE de la plante *Marrubium vulgare* L.

Les résultats ont montré une concentration élevée de catalase dans la suspension cellulaire contenant uniquement du Glucantime®, cette réaction au stress oxydatif induit par la molécule a provoqué l'augmentation de cette enzyme antioxydante.

Cependant, en présence de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* on a observé une faible concentration de la catalase cela pourrait indiquer que l'huile essentielle en tant qu'antioxydant aide à réduire le stress oxydatif ce qui diminue les besoins de produire autant de catalase.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Glutathion réduit (GSH)

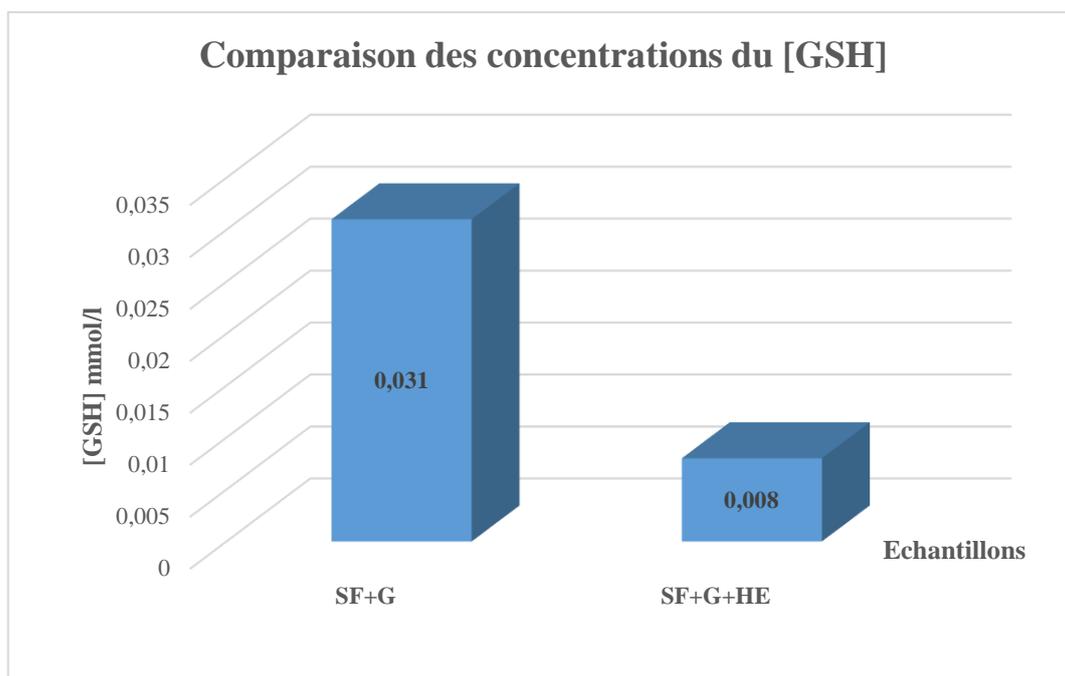


Figure 85: Différence des concentrations du [GSH] en présence et en absence de l'HE de la plante *Marrubium vulgare* L.

Nous avons remarqué une diminution du taux de GSH dans la suspension contenant l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* par rapport à celle du Glucantime® ce résultat est semblable à celui de catalase vue que le GSH joue le rôle d'un antioxydant non enzymatique.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Malondialdéhyde (MDA)

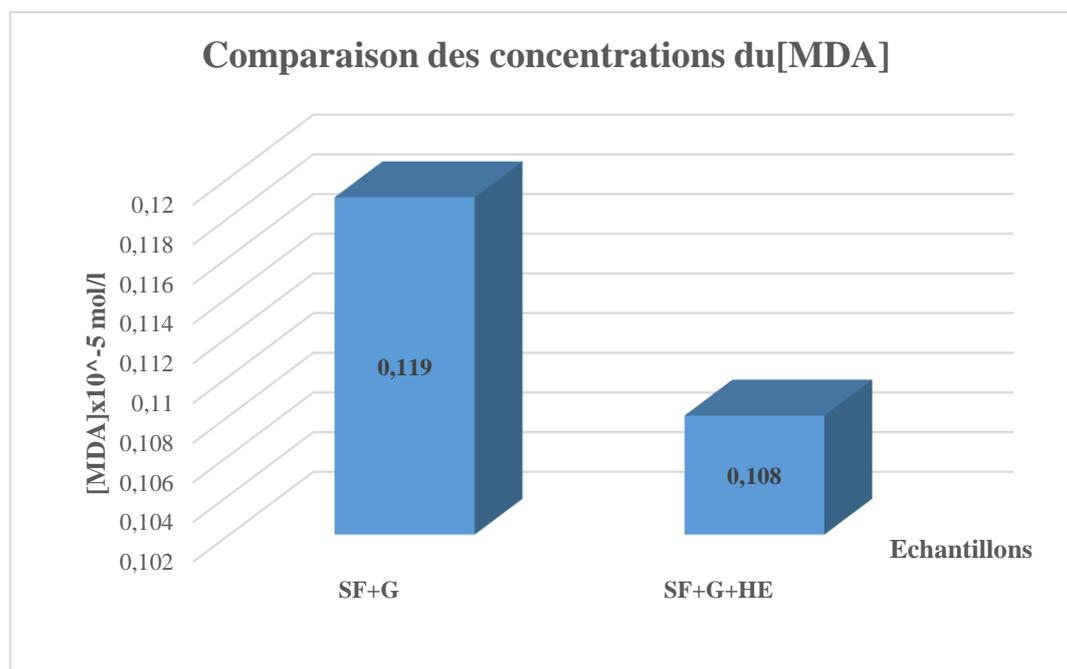


Figure 86: Taux du MDA en présence et en absence de l'HE de la plante *Marrubium vulgare* L.

Nous avons observé une concentration élevée en MDA dans la suspension cellulaire qui contient le Glucantime® par rapport à la suspension contenant à la fois le Glucantime® et l'huile essentielle.

Ces résultats ont montré que les dommages oxydatifs provoqués par le Glucantime entraînent une augmentation des niveaux du MDA, marqueur de la peroxydation lipidique. Toutefois, la diminution du taux de MDA en présence de l'huile essentielle suggère que cette dernière a un effet protecteur en neutralisant les radicaux libres dans le système étudié.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

✓ Protéines carbonylées

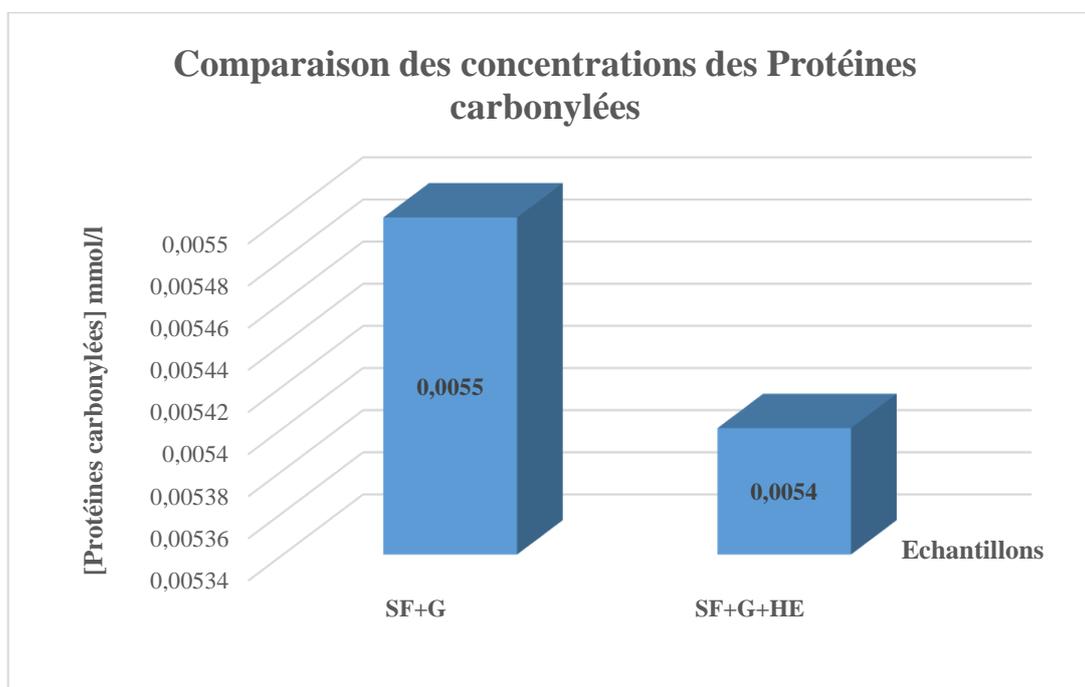


Figure 87: Teneur des protéines carbonylées en présence et en absence de l'HE de la plante *Marrubium vulgare* L.

Nous avons remarqué une faible concentration en protéines carbonylées dans la suspension cellulaire contenant l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* comparé à celle du Glucantime® ce résultat est semblable à celui du MDA vu que les protéines carbonylées sont des marqueurs de la peroxydation protéique.

DISCUSSION

DISCUSSION

- **Selon le rendement de l'huile essentielle**

Dans la présente étude, le rendement en huile essentielle, était de l'ordre de 0,045%

Ce qui est significativement plus faible que les valeurs obtenues dans l'étude de KADRI et al en 2011 et TABET ZATLA en 2017 réalisée en Tunisie et en Algérie respectivement, où le rendement de *Marrubium vulgare* L atteignait 0,34% et 0,3% ^(141, 177).

Le rendement faible que nous avons obtenu est dû à plusieurs facteurs tels que le stade de développement végétatif. Dans le cas de notre plante la récolte a été effectuée en plein hiver correspondant à la période du début végétatif, qui est généralement caractérisée par une faible teneur en huile essentielle contrairement au stade du début de la floraison (printemps).

D'autres facteurs qui peuvent influencer le rendement comprennent les facteurs génétiques, la méthode d'extraction et les conditions pédoclimatiques. De plus, le rendement en huile au cours de la croissance de la plante est particulièrement sensible aux conditions environnementales (la lumière, la disponibilité des nutriments, et la longueur du jour⁽¹⁷⁸⁾).

- **Selon les paramètres biochimiques**

- **Potassium intracellulaire**

Les résultats enregistrés concernant la variation des concentrations du potassium intracellulaires à partir des points tests de la suspension contenant le Glucantime® ont révélé une diminution considérable de celui-ci au cours du temps.

Par comparaison, nos résultats concordent avec ceux obtenus par les études de **BELHACHEM et MANSOUR BENAOUF** ainsi que celle d'**ARAB et CHARAF** portant sur la toxicité hémolytique de Glucantime® sur le globule rouge réalisée en 2013 et 2020 ^(179, 180).

En revanche, il est à noter que cette diminution de la concentration du potassium dans la suspension cellulaire contenant le Glucantime® et l'HE était moins importante. Dans certaines études, telles que celle menée par **BENMIRA et ATTAR** en 2017, l'utilisation de l'albumine a été associée à une réduction de la toxicité du Glucantime® et à une normalisation des valeurs du potassium intracellulaire. Cependant, peu d'études ont évalué spécifiquement le dosage du potassium intracellulaire en présence de l'HE de *Marrubium vulgare*⁽¹⁸¹⁾.

- **LDH intracellulaire**

Les résultats obtenus à partir des points de tests de la suspension contenant le Glucantime® ont montré ainsi une diminution significative des concentrations intracellulaires de LDH au cours du

DISCUSSION

temps. Cela ne peut être expliqué que par la lyse de la membrane et sa libération dans le milieu extracellulaire.

Nos résultats rejoignent d'autres études où il y avait une diminution des concentrations intracellulaires de LDH de T0 à T90⁽¹⁸²⁾.

Cependant, l'inclusion de l'huile essentielle dans la suspension a révélé une diminution moins remarquable de la concentration par rapport à celle provoquée par le Glucantime®.

Une étude publiée par la revue canadienne de physiologie et de pharmacologie réalisée en Tunisie portant sur l'activité protectrice de *M. vulgare* contre la toxicité hépatique du cyclophosphamide a constaté que l'extrait de la plante a été bénéfique à réduire des dérèglements pathologiques de 4 paramètres dont le LDH⁽¹⁸³⁾.

Ce qui est en accord avec les rapports précédents prouvant ainsi l'effet anti-hémolytique de l'HE de *M. vulgare*. D'autres études ont confirmé ce même constat⁽¹⁸⁴⁾.

– Hémoglobine extracellulaire

Selon les résultats obtenus, nous avons observé une augmentation progressive de la concentration d'hémoglobine libérée au cours du temps dans la suspension qui contient uniquement le Glucantime®.

Ce résultat concorde avec de nombreuses études confirmant ainsi l'effet hémolytique de Glucantime® sur la membrane des globules rouges^(181, 182)

De plus, nous remarquons que la durée de contact entre le Glucantime® et les globules rouges influe sur l'intensité de l'hémolyse. En effet, l'augmentation des concentrations de T0 à T90 nous laisse suggérer que plus la durée d'exposition entre le Glucantime® et la membrane des globules rouges est longue, plus la destruction de la membrane cellulaire est importante.

Ce qui rejoint l'étude menée par **BELHACHEM et MANSOUR BENAOUF**⁽¹⁷⁹⁾.

En revanche, la suspension contenant l'huile essentielle montre des niveaux d'hémoglobine extracellulaire nettement inférieurs. Cela suggère que l'huile essentielle a la capacité de réduire les dommages causés par le Glucantime® et de protéger les membranes des cellules érythrocytaires contre les phénomènes hémolytiques induits par cette molécule. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par **Belalit et Mayouf** en 2019 dans la wilaya de Bordj Bou Arreridj⁽¹⁸⁵⁾.

DISCUSSION

- **Discussion des paramètres du stress oxydant**

- **Catalase et GSH**

Les résultats obtenus à partir du dosage de catalase et GSH ont révélé chacun une augmentation de leurs activités en présence du Glucantime®.

Ces observations mettent en évidence une tentative de l'organisme de restaurer l'équilibre redox altéré par le médicament.

Une étude menée en Chili par **Silvana López et al en 2015** ; sur la réactivité de l'antimoine pentavalent avec le sang humain par évaluation des effets redox a montré qu'une concentration de 200 ng/ml qui est approximativement 1000 fois inférieure au niveau thérapeutique recommandé par l'OMS était capable d'induire un déséquilibre redox et une augmentation des radicaux libres⁽¹⁸⁶⁾. Toutefois, la présence de l'huile essentielle entraînait une diminution significative de GSH et de catalase dans la suspension.

Nayeema Akther et al ; en 2013 ont mené une étude en Inde pour examiner l'impact de *Marrubium vulgare* L. sur l'hépatotoxicité induite par le paracétamol⁽¹⁸⁷⁾. Les résultats ont montré un rétablissement de GSH et catalase à des niveaux proches de la normale, cela valide et confirme les résultats préalables de la présente étude.

- **MDA et protéines carbonylées**

Nous avons observé une augmentation du taux de Malondialdéhyde (MDA) et des protéines carbonylées dans la suspension contenant le Glucantime. Cependant, l'ajout de l'HE de *Marrubium vulgare* a entraîné une réduction modérée de ces marqueurs de peroxydation lipidique et protéique. Ce qui est en accord avec les travaux de **Archi G. et Tourqui H** réalisés à El Oued en 2017 (188).

Ces résultats suggèrent que les propriétés antioxydantes de l'huile essentielle pourraient être à l'origine de ce mécanisme, en permettant la neutralisation des radicaux libres limitant ainsi les dommages oxydatifs. Ces conclusions ont également été confirmées par le biais d'autres études⁽¹⁸⁷⁾.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Aujourd'hui, on ne cesse d'assister à un retour à la nature et à la thérapeutique par les plantes en raison des effets néfastes de nombreux traitements conventionnels.

Vu que l'antimoniote de méglumine reste toujours le traitement de choix de la leishmaniose en Algérie, sa toxicité sévère fait discuter son indication thérapeutique.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à évaluer *In vitro* l'influence de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L. contre la toxicité du Glucantime®.

Le dosage de trois paramètres biochimiques nous ont permis d'établir l'effet anti-hémolytique de l'huile essentielle sur la membrane du globule rouge en présence de la molécule de Glucantime® notamment, la concentration intracellulaire du LDH, de potassium et d'hémoglobine extracellulaire. Nous avons également démontré son pouvoir antioxydant par le biais de la mesure des paramètres liés au stress oxydant (Catalase, GSH, MDA et protéines carbonylées).

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *M.vulgare* présente des propriétés protectrices à la fois sur la membrane du globule rouge en prévenant les phénomènes hémolytiques ainsi que sur la lutte contre les dommages induits par le stress oxydant.

Ces résultats restent partiels et ne constitue qu'un premier pas dans la recherche des substances naturelles aux propriétés anti-hémolytiques, d'autres travaux sur l'huile essentielle s'imposent au niveau pharmacologique et chimique, donc il serait intéressant à l'avenir d'approfondir l'étude phytochimique qui consiste en : l'identification et la caractérisation des composés actifs impliqués dans le pouvoir anti-hémolytique et antioxydant. Il serait aussi judicieux de compléter cette étude par des tests *in vivo* pour obtenir des résultats plus concrets.

D'autres recommandations sont suggérées :

- Explorer la possibilité d'utiliser l'HE de *Marrubium vulgare* en combinaison avec le Glucantime pour améliorer son efficacité et minimiser les effets secondaires ainsi optimiser son index thérapeutique.
- Optimiser les conditions d'extraction et le moment optimal de la récolte pour améliorer le rendement et maximiser la quantité de l'huile essentielle obtenue.
- Explorer d'autres extraits naturels afin de trouver de nouveaux composés possédant des propriétés anti-hémolytiques potentielles contre le Glucantime y compris l'hydrolat
- Explorer l'incorporation de l'huile essentielle dans des formulations spécifiques afin d'assurer sa sécurité et son efficacité à long terme.

Bibliographie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Gay E, Guegan H, Ameline M, Gangneux J-P. Les leishmanioses humaines: parasitoses importées et autochtones. *Revue Francophone des laboratoires*. 2015;2015(477):61-5.
2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(3):e0004349.
3. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*. 2017;57:1-29.
4. Zait H, Hamrioui B. Leishmanioses cutanées en Algérie Bilan de 386 cas diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger de 1998 à 2007. *Revue francophone des laboratoires*. 2009;2009(412):33-9.
5. Chaara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta tropica*. 2014;132:80-93.
6. Dedet JP. Leishmaniasis, leishmanioses : biologie, clinique et thérapeutique. *Emc - Maladies Infectieuses*. 2009;6.
7. Ayari C, Ben Othman S, Chemkhi J, Tabbabi A, Fisa R, Ben Salah A, et al. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Sintonius) clydei* (Sinton, 1928, Phlebotominae), from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Infect Genet Evol*. 2016;39:241-8.
8. Izri A, Bendjaballah-Laliam A, Sereno D, Akhoundi M. Updates on Geographical Dispersion of *Leishmania* Parasites Causing Cutaneous Affections in Algeria. *Pathogens*. 2021;10(3).
9. Vincent HM. William Boog Leishman: parasitologist and politician. *Parasitology*. 2017;144(12):1582-9.
10. Mouloua ADA, . Etude eco-epidemiologique de la leishmaniose canine en kabylie. *Universite Mouloud Mammeri*2014.
11. Sergent E, et al. "Transmission expérimentale du bouton d'orient (clou de Biskra) à l'homme par *Phlebotomus papatasi* (Scopoli)". *Annales de l'Institut Pasteur de Paris*. 1926;40.
12. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1990;65(3):111-25.
13. Boudrissa A, Cherif K, Kherrachi I, Benbetka S, Bouiba L, Boubidi SC, et al. [Spread of *Leishmania major* to the north of Algeria]. *Bull Soc Pathol Exot*. 2012;105(1):30-5.
14. Sasidharan S, Saudagar P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? *Parasitol Res*. 2021;120(5):1541-54.
15. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):229-43.
16. Benikhlef R HZ, Toudjine M, Djerbouh A, Bendali-Braham S, Belkaid M. Presence de *Leishmania infantum* MON-24 chez le chien [Detection of *Leishmania infantum* MON-24 in the dog]. 2004.
17. Belazzoug S. Isolation of *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 from *Psammomys obesus* Gretschmar, 1828 (Rodentia: Gerbillidae) in Algeria. 1983;77: Page 876.
18. Belazzoug. Découverte d'un *Meriones shawi* (rongeur, gerbillidé) naturellement infesté par *Leishmania* dans le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de Ksar Chellala (Algérie). *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique*. 1986;79: pages={630-3}

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

19. Harrat Z, & Boudrissa. Écologie des rongeurs réservoirs de la leishmaniose cutanée zoonotique en Algérie. . ARev Med Pharma,. 2009;48.
20. Bachi F. Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie. 2006.
21. Harrat Z, Hamrioui, B., Belkaid, M., & Tabet-Derraz, O. Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. . Bulletin de la société de pathologie exotique. 1995:180-4.
22. Harrat Z, Berrouane, Y., Abdesslam, S. B., Belkaid, M., & Tabet-Derraz, O. . La leishmaniose viscerale en Algerie. evolution de la leishmaniose viscerale dans le foyer de Grande Kabylie. Arch Inst Pasteur Algérie. 1992;58.
23. Pearson RD SA. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis.. Clin Infect Dis 1996.
24. Levine ND, et al. . "A Newly Revised Classification of the Protozoa* The committee on systematics evolution of the society of protozoologists." The Journal of protozoology. 1980.
25. S M. La leishmaniose canine et humaine à leishmania infantum en France 2016.
26. Dedet J-P, et al The parasite. Clinics in dermatology. 1999.
27. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. PLoS Pathog. 2013;9(10):e1003594.
28. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):e0004349.
29. Wilson R. Phlebotomine Sand Flies [Available from: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html.
30. Mouloua A, et al. Impact environnemental sur la répartition des leishmanioses dans le foyer de Tizi-Ouzou (Algérie). Revue de Medecine Veterinaire 2017: 252-61.
31. PC. G. THE LEISHMANIAS, WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ROLE OF ANIMAL RESERVOIRS. 1965 Feb.
32. S. B. Leishmaniasis in Mediterranean countries. Vet Parasitol. 1992.
33. Psammomys obesus. [Available from: <https://www.alamyimages.fr/photos-images/psammomys-obesus.html?sortBy=relevant>.
34. La leishmaniose du chien. [Available from: <https://jardinage.lemonde.fr/dossier-1906-leishmaniose-chien.html>.
35. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.
36. Vue d'un jeune garçon atteint de la leishmaniose viscérale (kala-azar) 5 novembre 1998 [Available from: <https://www.alamyimages.fr/la-leishmaniose-viscerale-vue-d-un-jeune-garcon-atteint-de-la-leishmaniose-viscerale-kala-azar-il-a-l-elargissement-du-foie-et-de-la-rate-hepatosplen-omeg-image335375163.html>.
37. Rioux J, Lanotte G, Pratlong F, Dereure J, Jarry D, Moreno G, et al. La leishmaniose cutanée autochtone dans le sud-est de la France. Résultats d'une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrénées-Orientales. Médecine et Maladies infectieuses. 1985;15(11):650-6.
38. Chaara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. Acta Trop. 2014;132:80-93.
39. siriano Ldr. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA [Available from: <https://www.slideserve.com/barth/leishmaniose-tegumentar-americana>.
40. AILLAUD MC. LA LEISHMANIOSE CANINE : PRISE EN CHARGE ET ACTUALITÉS: Université d'Aix-Marseille; LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE MARSEILLE; 2018.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

41. C. RA P P FSMON, M - L . DO R DA I N (C . R . , F. S. , Assistants du SSA ; M-L.D. , Spécialiste du SSA). L'ANTIMONIATE DE N-METHYL GLUCAMINE, OU GLUCANTIME®. Médecine Tropicale • 2000 • 60 • 4 • 343.
42. Acebey L, Jullian V, Sauvain M. Ethnopharmacologie et leishmanioses en Amérique latine. Ethnopharmacologia; 2008.
43. 2022. VIDAL.
44. Roberts WL, McMurray WJ, Rainey PM. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998;42(5):1076-82.
45. [Available from: https://pharmnet-dz.com/m-2055-glucantime-1-5g-5ml-sol-inj-im-ou-inj-locale-b-5#google_vignette].
46. KLOUZ PAA. ANTIPARASITAIRES Mécanismes d'action, Service de Pharmacologie Clinique, Centre National de Pharmacovigilance & Faculté de Médecine de Tunis:[81 p.].
47. [Giroud M. Pharmacologie Clinique(Antimoine et sels).1978:[pp 113-4. pp.]. Available from: <https://inchem.org/documents/pims/pharm/pmg678fr.htm>].
48. Antimony and salts. Available from: <https://inchem.org/documents/pims/pharm/pmg678fr.htm>.
49. B A, M J, Snchez-Moreno M. Metal-Based Therapeutics for Leishmaniasis. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment 2014.
50. Masamori E, Benitez A, Lim P. Assay of sodium stibogluconate (Pentostam). Report No 552: USAMRDC, Office of the Surgeon General Washington, DC; 1986.
51. Glucantime 1,5 g/5 ml, solution injectable, boîte de 5 ampoules de 5 ml. LE FIGAROfr santé.
52. santé). AAndsdmedpd. GLUCANTIME 1,5 g/5 ml, solution injectable Antimoniate de méglumine. NOTICE. Mis à jour le : 19/10/2022.
53. Stibogluconate de sodium / Sodium Stibogluconate in Français [Available from: <https://www.xn--lamdecine-d4a.com/medecine-fr/sodium-stibogluconate>].
54. Eléonore FJMNN. ATELIER SANTÉ-ENVIRONNEMENT EVALUATION ET GESTION DES RISQUES LIES A L'EXPOSITION A L'ANTIMOINE. FORMATION D'INGÉNIEUR DU GÉNIE SANITAIRE Avril 2004.
55. Gebel T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. Chemico-biological interactions. 1997;107(3):131-44.
56. BLANC P. UN CAS PROBABLE D'INTOXICATION AIGUEE PAR L'ANTIMOINE. 1980.
57. De Wolff FA. Antimony and health. British Medical Journal Publishing Group; 1995. p. 1216-7.
58. LYON MV BIAHFSaTG. ficheProduit"GLUCANTIME®". Date de mise à jour : 26-01-2022:4.
59. Passero LFD, Laurenti MD, Santos-Gomes G, Campos BLS, Sartorelli P, Lago JHG. *In vivo* antileishmanial activity of plant-based secondary metabolites. Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components: Elsevier; 2013. p. 95-107.
60. . Service dermatologie CHU Tlemcen. 2022.
61. Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M, Souissi A, Turki H, Boudaya S, et al. Glucantime® par voie parentérale: bénéfique versus toxicité. Médecine et maladies infectieuses. 2005;35(1):42-5.
62. Trop M. Effets indésirables du traitement systémique de la leishmaniose cutanée par glucantime®: Expérience tunisienne. Médecine tropicale. 2008;68(5):499.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

63. Matoussi N, Ameer H, Amor S, Fitouri Z, Becher S. Toxicité cardiaque de l'antimoniote de méglumine (Glucantime®). À propos d'une observation. *Médecine et maladies infectieuses*. 2007;37:S257-S9.
64. Romero GAS, Flores ÉMdM, Noronha EF, Macêdo VdO. High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals: a comparative approach using historical controls. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98:145-9.
65. Aronson NE, Wortmann GW, Johnson SC, Jackson JE, Gasser Jr RA, Magill AJ, et al. Safety and efficacy of intravenous sodium stibogluconate in the treatment of leishmaniasis: recent US military experience. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;27(6):1457-64.
66. Sellami K, Chami I, Chaari I, Bahloul E, Masmoudi A, Chaabane H, et al. Leishmaniose cutanée traitée par Glucantime® en intramusculaire : redouter une toxicité pancréatique ! *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2014;141(12).
67. Gharbi A, Chebbi M, Rabhi F, Euch DE, Doss N, Mokni M. Toxicité de l'antimoine de méglumine (Glucantime®) dans le traitement systémique des leishmanioses cutanées : étude de 100 observations. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2016;143(12).
68. Masmoudi A, Maalej N, Boudaya S, Turki H, Zahaf A. Les effets indésirables du Glucantime® en intralésionnel dans le traitement de la leishmaniose cutanée. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2006;36(4):226-8.
69. Minodier P, Jurquet A-L, Noël G, Uters M, Laporte R, Garnier J-M. Le traitement des leishmanioses. *Archives de pédiatrie*. 2010;6(17):838-9.
70. Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities. *Indian Journal of Medical Research*. 2006;123(3):345.
71. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, Lopez-Velez R, Garcia-Hernandez R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):e0006052.
72. Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*. 2003:91.
73. Pillou J-F. « Radicaux libres – Définition » 2014. Available from: <https://sante-medecine.journaldesfemmes.fr/fag/14139-radicaux-libres-definition>.
74. Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Delattre J. Radicaux libres et antioxydants. *Biochimie Pathologique Aspects Moléculaires et Cellulaires*. 2003:59-81.
75. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press, USA; 2015.
76. Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2005;41(2):143-64.
77. MacLaren D. *Advances in sports and exercise science series. Nutrition and sport Antioxidants and free radicals* Published by Elsevier's Health Sciences Rights Department: Philadelphia. 2007:153-75.
78. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(2):637S-46S.
79. Santé P. Available from: <https://www.pensersante.fr/les-radicaux-libres-quest-ce-que-cest>.
80. Sen C, Packer L, Hänninen O. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*: Elsevier; 2000.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

81. ROUAKI F. EFFETS DE L'INGESTION DE L'HUILE DE TOURNESOL OXYDEE ET DE LA SUPPLEMENTATION EN ALPHA-TOCOPHEROL SUR CERTAINS PARAMETRES STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DU TISSU CARDIAQUE CHEZ LE RAT EN CROISSANCE 2016.
82. Pastre J. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques 2005.
83. Duracková Z. Oxidants, antioxidants and oxidative stress. Dans: Anna Gvozdjakova (Ed.) Mitochondrial medicine: Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy. Springer-Verlag New York, LLC; 2008.
84. Haleng J, Pincemail J, Defraigne J-O, Charlier C, Chapelle J-P. Le stress oxydant. Revue médicale de Liège. 2007;62(10).
85. Favier A. Le stress oxydant. L'actualité chimique. 2003;108(10):863-32.
86. Marfak A. Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Mémoire, Université de Limoges, Limoges. 2003.
87. Van Antwerpen P. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: ciblage du système myéloperoxydase/péroxyde d'hydrogène/chlorure. 2006.
88. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? Comptes rendus biologies. 2004;327(7):649-62.
89. Halliwell B. Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. Advances in pharmacology. 1996;38:3-20.
90. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. médecine/sciences. 2011;27(4):405-12.
91. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. Annual review of nutrition. 1996;16(1):33-50.
92. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox biology. 2017;11:613-9.
93. Leroy P. Les composants du stress oxydant et les radicaux libres. Hegel. 2016;6(2):218-9.
94. Chaouche T. Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales 2014.
95. Poisson-Moreau de Lizerieux C. Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique: Paris 11; 2013.
96. Saada T. Effet protecteur du curcuma contre le stress oxydatif: university center of abdalhafid boussouf-MILA; 2022.
97. Kulawik P, Özogul F, Glew R, Özogul Y. Significance of antioxidants for seafood safety and human health. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2013;61(3):475-91.
98. L'équilibre radicaux libres/ Antioxydants. Available from: <https://www.orthodiet.org/fr/lequilibre-radicaux-libres-antioxydants>.
99. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions. 2006;160(1):1-40.
100. Carlberg I, Mannervik B. [59] Glutathione reductase. Methods in enzymology. 113: Elsevier; 1985. p. 484-90.
101. Théron P, Bonnefont-Rousselot D. Systèmes antioxydants endogènes. Radicaux libres et stress oxydant Paris, Lavoisier: p. 2005:87-111.
102. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013;1830(5):3217-66.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

103. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. Annual review of biochemistry. 1989;58(1):79-110.
104. Diallo A. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd.(Myrtaceae) 2005.
105. Singh U, Devaraj S, Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. Annu Rev Nutr. 2005;25:151-74.
106. Fabre G, Bayach I, Berka K, Paloncýová M, Starok M, Rossi C, et al. Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. Chemical Communications. 2015;51(36):7713-6.
107. Leger C-L. La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. Oléagineux, Corps gras, Lipides. 2000;7(3):258-65.
108. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical interventions in aging. 2007;2(2):219-36.
109. Evan A. Evans. Structure and deformation properties of red blood cells: Concepts and quantitative methods, Methods in Enzymology. Academic Press. 1989;173:3-35.
110. S. PK. Red blood cells. . Int J Biochem Cell Biol. 2002.
111. Dr.Otmani. Globule rouge [Available from: <http://4pharma.blogspot.com/2017/07/globule-rouge-drotmani.html>].
112. Red Blood Cells [Available from: <https://veteriankey.com/2-red-blood-cells/>].
113. Melo DR, Susana Silva, Alice Coimbra, Susana. Interplay between Erythrocyte Peroxidases and Membrane 2019/01/28.
114. Pasricha S-R. The red cell membrane, part 1: The role of the red cell membrane. Clinical advances in hematology & oncology : H&O 2014/08/01 12.
115. RN. W. Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus. Curr Diabetes Rev 2012 Sep.
116. Delaunay J. The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders. Blood Rev. 2007;21(1):1-20.
117. Lekeux KPaNKaNFaJCaP. Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. Annales De Medecine Veterinaire. 2007;151.
118. Yu J BD. Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein band 3 and lipid: effects of spectrin-actin association. . Proc Natl Acad Sci U S A. 1976.
119. Bio H. 2017 [Available from: <http://bio-28.blogspot.com/2017/01/membrane-plasmique.html>].
120. Kulbacka J, Choromanska A, Rossowska J, Wezgowiec J, Saczko J, Rols MP. Cell Membrane Transport Mechanisms: Ion Channels and Electrical Properties of Cell Membranes. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2017;227:39-58.
121. La membrane est une structure étanche aux molécules hydrophiles (aqueuses) [Available from: <https://fr.slideserve.com/dylan-brown/la-membrane-est-une-structure-tanche-aux-mol-cules-hydrophiles-aqueuses>].
122. Rossini GP, Bigiani A. Palytoxin action on the Na(+),K(+)-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. Toxicol. 2011;57(3):429-39.
123. Pivovarov AS, Calahorro F, Walker RJ. Na(+)/K(+)-pump and neurotransmitter membrane receptors. Invert Neurosci. 2018;19(1):1.
124. Bauer DE KS, Orkin SH. . Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the β -globin disorders. 2012 Aug 17.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

125. d'Angers. MZ-LdHCdC. physiologie du globule rouge 2011 [Available from: <https://www.hematocell.fr/globules-rouges-et-leur-pathologie/physiologie-du-globule-rouge>.
126. LIFE'STYLE D. QU'EST CE QUE L'HÉMOGLOBINE 2018 [Available from: <https://drepanolifestylefr.wordpress.com/2018/05/24/quest-ce-que-lhemoglobine/>.
127. Harmening DM. Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis. . FA Davis A, editor2009.
128. Jauréguiberry. S. Rétention et "pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisinine. 2015.
129. Megarbane B. Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : quand y penser et quelles précautions prendre ? Réanimation. 2008;17(4):399-406.
130. Koury MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. Annu Rev Nutr. 2004;24:105-31.
131. Joncas FH, Adjibade P, Mazroui R. [Role of HRI in apoptosis resistance]. Med Sci (Paris). 2014;30(10):882-8.
132. Group AP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical journal of the Linnean Society. 2009;161(2):105-21.
133. Dib S, Fadloun M. Evaluation (recherche de l'effet) de l'activité inhibitrice de l'extrait brut de marrubium vulgare L sur l'Alpha AMYLASE: Université L'Arbi Ben M'Hidi - Oum EL Bouaghi.
- Faculté Des Sciences Exactes Et Sciences De La Nature Et De La Vie.
- Département Des Sciences De La Nature Et De La Vie.; 2021.
134. Hameg T, Taleb D. Evaluation de l'activité antimicrobienne, et antioxydante des composés phénoliques du Marrube blanc «Marrubium vulgare»: Université Mouloud Mammeri; 2018.
135. Pierre M. La Bible des Plantes qui soignent. Éditions du Chêne ed2017.
136. Commons W. [Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Marrubium_vulgare0.jpg?uselang=fr.
137. Espagne) GCC-. 17/03/2019 [Available from: <https://www.pharmanatur.com/Canaries/Marrubium%20vulgare.htm>.
138. rares) Algdp. [Available from: <https://www.alsagarden.com/fr/boutique/marrube-blanc-marrubium-vulgare-graines/>.
139. BRUNETON J. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 5 ème édition, Lavoisier Tec et DOC ed2015.
140. ENCYCLOPEDIE DES PLANTES MEDICINALES. LAROUSSE. p. 232.
141. Amina TZ. Caractérisations chimiques et étude biologiques d'extraits de quatre plantes aromatiques " Daucus. carota ssp. sativus, Marrubium vulgare, Ballota nigra et Cynoglossum cheirifolium" de la région de Tlemcen: FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE; 2017.
142. Wahiba E. Étude phytochimique et biologique de Marrubium vulgare L. et Tetraclinis articulata (Vahl) Masters: UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE; 2021.
143. Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 1963.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

144. Al-Snafi AE, Al-Saedy HA, Talab TA, Majid WJ, El-Saber BatihaG J-SA. The bioactive ingredients and therapeutic effects of Marrubium vulgare-A review. International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive. 2021;1(2):9-21.
145. Aćimović M, Jeremić K, Salaj N, Gavarić N, Kiprovski B, Sikora V, et al. Marrubium vulgare L.: A phytochemical and pharmacological overview. Molecules. 2020;25(12):2898.
146. Valnet DJ. La phytothérapie Traitement des maladies par les plantes.
147. Trease Ea. Trease-and-Evans-Pharmacognosy-16th-Edition-[konkur.in]. 2009.
148. Asma G. Application des huiles essentielles dans la lutte microbiologique cas d'un cabinet dentaire: UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA FACULTE DES SCIENCES APPLIQUEES DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCÉDES; 2017.
149. Couic-Marinier F, Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques. 2013;52(525):18-21.
150. Philogène BJ, Regnault-Roger C, Vincent C. Biopesticides d'origine végétale: bilan et perspectives. Biopesticides d'origine végétale, 2e édition, Lavoisier Tec & doc, Paris, France. 2008:1-24.
151. Yabrir B. Essential Oil of Marrubium vulgare: Chemical Composition and Biological Activities. A Review. Natural Product Sciences. 2019;25(2).
152. Germacrène-D, β -Caryophyllène, δ -Cadinène, β -Bisabolène, Carvacrol. [Available from: <https://fr.wikipedia.org>.
153. DIB S, BOUTELDJI MR. Effets insecticides de l'extrait des feuilles du Marrubium vulgare L.(Marrube blanc) sur le puceron Aphis nerii (Homoptera: Aphididae): Université de Bouira; 2017.
154. Piochon M. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse: Université du Québec à Chicoutimi; 2008.
155. Montage d'extraction par Hydrodistillation.: Mohamed Bilal Goudjil; [Available from: https://www.researchgate.net/figure/Montage-d'extraction-par-Hydrodistillation_fig3_343615181/download.
156. Lucchesi M-E. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles: Université de la Réunion; 2005.
157. Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.: Mohamed Bilal Goudjil; [Available from: https://www.researchgate.net/figure/Montage-d'extraction-par-entrainement-a-la-vapeur-deau_fig4_343615181/download.
158. Bassereau M, Chaintreau A, Duperrex S, Joulain D, Leijts H, Loesing G, et al. GC-MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. 2. Data treatment strategies and method performances. Journal of agricultural and food chemistry. 2007;55(1):25-31.
159. Montage d'extraction par hydrodiffusion: Mohamed Bilal Goudjil; [Available from: https://www.researchgate.net/figure/Montage-d'extraction-par-hydrodiffusion_fig5_343615181/download.
160. Djillali B. Extraction et identification des huiles essentielles.: UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE D'ORAN « MOHAMED BOUDIAF » Faculté de Chimie Département de Chimie Physiques; 2015-2016.
161. Lucchesi ME, Chemat F, Smadja J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. Journal of Chromatography a. 2004;1043(2):323-7.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

162. Solvent-free microwave extraction (SFME) [Available from: https://www.researchgate.net/figure/Solvent-free-microwave-extraction-SFME-25-30_fig1_323464573].
163. Ali Esmail A-S, Hussein Ali A-S, Tayseer Ali T, Wajdi Jabbar M, Gaber El-Saber B, Jafari-Sales A. The bioactive ingredients and therapeutic effects of *Marrubium vulgare* - A review. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Sciences Archive*. 2021;1(2):09-021.
164. KIYOSHI YAMAGUCHI JLL, NAM-CHEOL KIM, and SEUNG JOON, BAEK. Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. 2006.
165. P M Kanyonga MAF, B Meddah, M Mpona, E M Essassi and Y Cherrah. assessment-of-methanolic-extract-of-marrubium-vulgare-for-antiinflammatoryanalgesic-and-antimicrobiologic-activities. 2011.
166. M. DSF. EVALUATION (RECHERCHE DE L'EFFET) DE L' ACTIVITE INHIBITRICE DE L' EXTRAIT BRUT DE MARRUBIUM VULGARE L SUR L'ALPHA AMYLASE.: Université L'Arbi Ben M'Hidi - Oum EL Bouaghi.; 2020.
167. Y. k. Etude de l'effet hypoglycémiant chez les rats diabétiques traités par l'extrait aqueux de *Marrubium Vulgare L.* (marrube blanc): saad dahlab; 2012.
168. Schlemper V, Ribas A, Nicolau M, Cechinel Filho V. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*. 1996;3(2):211-6.
169. Bremnes L. *The Compleat Book of Herbs : A Pratical Guide to Growing & Using Herbs*, Montoréal, Reader's Digest, 272 p.2005.
170. M. Rameshrad, K. Yousefi, FF, HS, SH, AK, N, et al. A methanolic extract of *Marrubium vulgare L.* suppresses inflammatory responses in isoproterenol induced myocardial infarction in rat. 2012.
171. Évaluation des effets biologiques (Activité antioxydante, antibactérienne et antifongique) de *Marrubium vulgare* 2015.
172. Nourooz-Zadeh J, TAJADDINI-SARMADI J, Ling KE, WOLFF SP. Low-density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochemical Journal*. 1996;313(3):781-6.
173. Aebi H. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*: Elsevier; 1974. p. 673-84.
174. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-7.
175. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 186: Elsevier; 1990. p. 464-78.
176. MEROUANE A. Caractérisation, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de trois espèces de sauges (*Salvia algeriensis*, *Salvia argentea* et *Salvia barrelieri*): SAADI. A; 2013.
177. Kadri A, Zarai Z, Békir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare L.* essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*. 2011;10(19):3908-14.
178. Sangwan N, Farooqi A, Shabih F, Sangwan R. Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth regulation*. 2001;34:3-21.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

179. BELHACHEM A, MANSOUR BENAOUF Y. QUELQUES TESTS DE TOXICITE DU GLUCANTIME.
180. Chaima A, Fatna C. Etude *In vitro* de la toxicité hémolytique du Glucantime® sur le globule rouge.
181. ATTAR N, BENMIRA M. Etude *In vitro* de l'influence de l'albumine sur la toxicité de GLUCANTIME.
182. ABED N, KHOUANI F. Etude *In vitro* de la toxicité du Glucantime sur le globule rouge 2017.
183. Ettaya A, Dhibi S, Samout N, Elfeki A, Hfaiedh N. Hepatoprotective activity of white horehound (*Marrubium vulgare*) extract against cyclophosphamide toxicity in male rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016;94(4):441-7.
184. Elberry AA, Harraz FM, Ghareib SA, Nagy AA, Gabr SA, Suliaman MI, et al. Antihepatotoxic effect of *Marrubium vulgare* and *Withania somnifera* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2010;1(4):247.
185. Belalit Houria MZ. Etude de l'activité anti-radicalaire et anti-hémolytique en présence de glucose de *Marrubium vulgare* et *Laurus nobilis* 2019.
186. Lopez S, Aguilar L, Mercado L, Bravo M, Quiroz W. Sb(V) reactivity with human blood components: redox effects. *PLoS One*. 2015;10(1):e0114796.
187. Akther N, Shawl A, Sultana S, Chandan B, Akhter M. Hepatoprotective activity of *Marrubium vulgare* against paracetamol induced toxicity. *Journal of Pharmacy Research*. 2013;7(7):565-70.
188. ARCHI G, TOURQUI H. l'étude de l'effet de *Marrubium vulgare* sur l'hépatotoxicité induite par l'alloxane chez les rattes de type Wistar albinos. 2018.

RESUME

Les dérivés stibiés pentavalents restent la principale option thérapeutique pour traiter les leishmanioses. En Algérie, l'antimoniote de méglumine (Glucantime®) est le traitement de première intention vu sa disponibilité et son efficacité approuvée. Toutefois, l'utilisation de ce médicament est associée à des risques parfois graves notamment les risques hémolytiques. De nombreuses recherches ont montré que *Marrubium vulgare* est utilisé pour le traitement de diverses maladies en raison de sa richesse en molécules à intérêt thérapeutique. L'objectif de cette étude était d'évaluer *In vitro* les activités anti-hémolytiques et antioxydantes de l'huile essentielle contre la toxicité du Glucantime. L'extraction a été effectuée par hydro-distillateur du type clevenger et le rendement obtenu était de 0,045%. L'HE a montré une activité anti-hémolytique en augmentant de manière significative les niveaux du potassium et de l'enzyme LDH intracellulaire à des taux de 4.4mmol/l et 185U/L respectivement et en réduisant celles d'hémoglobine extracellulaire à 0.0365g/L, l'activité antioxydante a été prouvée par le pouvoir de l'HE à réduire les concentrations de la catalase (0.917U/min/ml), GSH (0.008mmol/l), MDA (0.108mol/l) et protéines carbonylées (0.0054mmol/l). Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* possède la capacité à protéger les érythrocytes contre les phénomènes hémolytiques induits par le Glucantime cet effet peut être attribué au moins partiellement aux activités antioxydantes de l'huile essentielle. Cette étude laisse la porte ouverte à d'autres pistes de recherches envisagées dans le futur.

Mots clés : Leishmaniose, Glucantime, Hémolyse, Huile essentielle, *Marrubium vulgare* L.,

ABSTRACT

Pentavalent stibiated derivatives remain the main therapeutic option for treating leishmaniasis. In Algeria, meglumine antimoniate (Glucantime®) is the first-line treatment given its availability and approved efficacy. However, the use of this drug is associated with sometimes serious risks including hemolytic risks. Many studies have shown that *Marrubium vulgare* is used for the treatment of various diseases because of its richness in molecules of therapeutic interest. The objective of this study was to evaluate *In vitro* the anti-hemolytic and antioxidant activities of essential oil against the toxicity of Glucantime. Extraction was carried out by a clevenger-type hydro distiller and the yield obtained was 0.045%. HE demonstrated anti-hemolytic activity by significantly increasing the levels of potassium and intracellular LDH enzyme to levels of 4.4mmol/l and 185U/L respectively and reducing extracellular hemoglobin to 0.0365g/L, antioxidant activity has been proven by the power of the essential oil to reduce concentrations of catalase (0.917U/min/ml), GSH (0.008mmol/l), MDA (0.108mol/l) and carbonylated proteins (0.0054mmol/l). These results show that the essential oil of *Marrubium vulgare* has the ability to protect erythrocytes against the hemolytic phenomena induced by Glucantime. this effect can be attributed at least partially to the antioxidant activities of the essential oil. This study leaves the door open to other lines of research considered in the future.

Keywords: Leishmaniasis, Glucantime, Hemolysis, Essential oil, *Marrubium vulgare* L.

ملخص

تضل المشتقات الستيبية الخماسية الخيار الرئيسي لعلاج داء اللشمانيات. في الجزائر، ملح الانتيمونيات الميقلومين (Glucantime®) هو العلاج الأول نظرا لتوافره وفعاليتيه المعتمدة. ومع ذلك، يرتبط استخدام هذا الدواء بآثار جانبية خطيرة في بعض الأحيان بما في ذلك مخاطر انحلال الدم. أظهرت العديد من الدراسات أن نبات *Marrubium vulgare* L. يستخدم لعلاج شتى الأمراض بسبب ثرائه في الجزيئات ذات الأهمية العلاجية. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم في المختبر الأنشطة المضادة لانحلال الدم ومضادات الأكسدة للزيت الأساسي مقابل سمية هذا الدواء. تم استخراج الزيت الأساسي بواسطة مقطر مائي من نوع clevenger وكان المردود الذي تم الحصول عليه 0,045%. الزيت الأساسي أظهر نشاط مضاد لانحلال الدم من خلال زيادة مستويات البوتاسيوم (K+) وإنزيم (LDH) داخل الخلايا بشكل كبير إلى مستويات (4.4mmol/l) و 185U/L على التوالي وتقليل مستوى الهيموجلوبين (Hb) خارج الخلية إلى 0.0365g/L، وقد ثبت النشاط المضاد للأكسدة من خلال قوة الزيت الأساسي في تقليل تركيزات (0.0365g/L) catalase، (0.108mol/l) MDA، (0.008mmol/l) GSH، والبروتينات الكربونيلية (0.0054mmol/l). أظهرت هذه النتائج أن الزيت الأساسي لنبات له القدرة على حماية كريات الدم الحمراء ضد الظواهر الانحلالية المتسبب فيها هذا الدواء. هذا التأثير يعود بصفة جزئية على الأقل إلى الأنشطة المضادة للأكسدة للزيت الأساسي، تترك هذه الدراسة الباب مفتوح أمام خطوط البحث الأخرى المتخذة في المستقبل.

الكلمات الرئيسية: داء اللشمانيات، Glucantime، انحلال الدم، الزيت الأساسي، *Marrubium vulgare* L.

