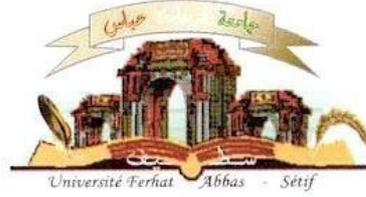


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1

Faculté des Sciences de la
Nature de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2024

Thèse

Présentée par

BOUTEFAHA Zineddine

Pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie**

Thème

Activités antioxydantes et protectrices des polyphénols

de l'extrait de *Teucrium polium*

Soutenue publiquement le 18/01/2024

Devant le jury

Président

BELHATTAB Rachid

Pr. UFA Sétif-1

Directeur

BELATTAR Noureddine

Pr. UFA Sétif-1

Examineurs

DEROUICHE Samir

Pr. Université d'El-Oued

AMRAOUI Nacer

MCA. UFA Sétif-1

FATMI Widad

MCA. Université de BBA

CHERIET Thamere

MCA. Université de Oum el Bouaghi

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu **ALLAH** le tout puissant d'avoir éclair mon chemin et d'avoir guidé mes pas, et qui sans lui nous ne sommes rien.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude et mes remerciements à mon directeur de thèse le Professeur **Noureddine BELATTAR** pour l'accueil heureux qu'il m'a accordé dans son laboratoire de recherche, pour sa disponibilité, son suivi tout au long de mes années de recherche, ses conseils, son soutien, sa générosité, sa gentillesse, son encouragement et sa confiance en moi tout au long de la préparation de ce travail.

Ma vive reconnaissance au **Pr. Rachid BELHATTAB**, professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, d'avoir accepté de présider le jury de soutenance de thèse,

Mes sincères remerciements vont également aux :

Pr. Derouiche Samir professeur à l'Université d'El-Oued,

Dr. Amroui Nacer, maitre de conférences A à l'université de Sétif 1

Dr. Fatmi Widad, maitre de conférences A à l'Université de Bordj Bou Arreridj,

Dr. Thamere Cheriet, maitre de conférences A à l'université de M'Sila,

D'avoir accepté de faire partie de jury de cette thèse. Je tiens à leur exprimer mes respectueuses grâces et considérations.

J'exprime également mes sincères remerciements et ma gratitude au **Pr. Mosaad Abdel-Wahhab**, professeur au département de toxicologie alimentaire et contaminants au niveau du Centre National de Recherche (le Caire), pour son aide et son soutien scientifique qu'il m'a fournies pendant mon séjour au Caire, ainsi que pour sa gentillesse et son accueil chaleureux.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.

المخلص:

يستخدم نبات *Teucrium polium* الذي ينتمي إلى عائلة Lamiaceae بشكل شائع في الطب التقليدي الجزائري كعلاج لمرض السكر وارتفاع ضغط الدم وكذا لإلتئام الجروح. الهدف من هذه الدراسة، في جزئها الأول، هو التعرف على المركبات الفينولية للمستخلصات الميثانولية والإيثانولية والمائية من *Teucrium polium* بواسطة HPLC، وتقييم أنشطتها المضادة للأكسدة وللسرطان في المختبر. في الجزء الثاني، تمت دراسة التأثير الوقائي للمستخلص الميثانولي من *T. polium* ضد السمية التي يسببها الأفلاتوكسين B1 في كبد و كليتي الجرذان. أشارت النتائج إلى أن أعلى محتوى من البوليفينول الكلي والفلافونويد تم الحصول عليه في المستخلص الميثانولي بواقع 1.96 ± 134.10 ميكروغرام / مغ و 38.85 ± 1.02 ميكروغرام / مغ على التوالي. أتاح تحليل HPLC للمستخلصات تحديد 12 مركبًا فينوليًا من بينها naringine باعتباره المركب الرئيسي. أظهرت مستخلصات *T. polium*، التي تم اختبارها في المختبر، نشاطًا معتبرًا في إزاحة الجذور الحرة فيما يتعلق بـ DPPH و ABTS. كما لوحظ نفس التأثير على اختبار القدرة الإرجاعية واختبار مسك الحديد مقارنة بالمعايير. كما أظهرت التجارب أيضًا خاصية قوية مضادة للسرطان ضد سلالات خلايا سرطان الثدي MCF-7 خاصة بالنسبة للمستخلص الميثانولي مقارنة مع doxorubicine ($IC_{50} = 14,2 \pm 1,3$ ميكروغرام / مل).

تمت دراسة التأثير الوقائي للمستخلص الميثانولي لـ *T. polium* ضد السمية التي يسببها AFB₁ في الفئران. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن إعطاء AFB₁ يسبب زيادة كبيرة في أنشطة الإنزيمات الكبدية (ALT و AST و ALP)، ومستويات المؤشرات الكلوية (الكرياتينين، وحمض البوليك، واليوريا)، وكذلك المؤشرات البيوكيميائية الأخرى كالكوليسترول، الدهون الثلاثية، LDL، المستضد السرطاني المضغي (CEA)، بروتين ألفا فيتوبروتين، TNF α ، إنترلوكين 6، MDA وانخفاض كبير في مستويات البروتينات الكلية في الدم، الألبومين، HDL، TAC، الكاتالاز والجلوتاثيون الكلي والكبد. أعادت معالجة الفئران بالمستخلص الميثانولي لـ *T. polium* بجرعتي 50 و 100 مغ/كغ قيم هذه المؤشرات الكيميائية الحيوية إلى مستوياتها الطبيعية تقريبًا. من جهة أخرى، أدت المعالجة بالـ AFB₁ إلى تغيرات كبيرة في أنسجة الكبد والكلى بالإضافة إلى سمية جينية كبيرة من خلال زيادة مستويات MNPCE وتكوين ذيل المذنب في نخاع عظم الفئران. سمح العلاج المشترك للفئران بالمستخلص و AFB₁ باستعادة البنية الطبيعية للكبد والكلى وتقليل السمية الجينية إلى حد كبير. من خلال هذه الدراسة يظهر أن لمستخلصات *Teucrium polium* مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية والخصائص الوقائية للكبد والكلى بفضل محتواها العالي من مادتي البوليفينول والفلافونويد.

الكلمات المفتاحية: *Teucrium polium*، مضادات الأكسدة، الأفلاتوكسين، عديدات الفينول، الإجهاد التأكسدي، السمية الكبد، السمية الكلوية.

Résumé

Teucrium polium appartenant à la famille des Lamiaceae est couramment utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne comme antidiabétique, antihypertenseur et cicatrisante. Le but de cette étude est d'identifier, dans une première partie, les composés phénoliques des extraits méthanolique, éthanolique et aqueux de *Teucrium polium* par HPLC, et d'évaluer, *in vitro* leurs activités antioxydantes, et anticancéreuses. Dans une deuxième partie, l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de *T. polium* contre la toxicité induite par l'Aflatoxine B₁ dans le foie et les reins des rats a été étudié. Les résultats indiquent que la teneur la plus élevée en polyphénols totaux et en flavonoïdes a été obtenue dans l'extrait méthanolique avec $134.10 \pm 1.96 \mu\text{g}/\text{mg}$ et $38.85 \pm 1.02 \mu\text{g}/\text{mg}$ respectivement. L'analyse HPLC des extraits a permis d'identifier 12 composés phénoliques parmi lesquels la naringine comme composé majeur. Les extraits de *T. polium*, testés *in vitro*, ont montré des activités antiradicalaires appréciables vis à vis de DPPH et de l'ABTS. Le même effet a été aussi observé sur le pouvoir réducteur et chélateur de fer par rapport aux standards. Une potentielle activité anticancéreuse potentielle contre les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 a également été établie, en particulier pour l'extrait méthanolique par rapport à la doxorubicine ($\text{IC}_{50} = 14,20 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{ml}$).

L'effet protecteur de l'extrait méthanolique de *T. polium* contre la toxicité induite par l'AFB₁ a été étudié chez le rat. Les résultats obtenus montrent que l'administration de l'AFB₁ provoque une augmentation significative des activités des enzymes hépatiques (ALT, AST et ALP), des taux de marqueurs rénaux (créatinine, acide urique, urée), ainsi que d'autres paramètres biochimiques tels que ; le cholestérol, les triglycérides, l'LDL, l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), l'alpha-fœtoprotéine, le TNF α , l'interleukine-6, le MDA et une diminution significative des taux des protéines totales sérique, de l'albumine, de l'HDL, de TAC, de catalase et de glutathion peroxydase hépatique et rénale. Le traitement des rats par l'extrait méthanolique de *T. polium* à 50 et 100 mg/kg a permis de rétablir les valeurs de ces marqueurs biochimiques presque à leurs niveaux normaux. D'autre part, le traitement par l'AFB₁ a entraîné des changements tissulaires significatifs dans le foie et les reins ainsi qu'une génotoxicité importante en augmentant les taux de MNPCE et la formation de queues de comète dans la moelle osseuse des rats. Le traitement combiné des rats par l'extrait et de l'AFB₁ a permis la restauration de l'architecture normale du foie et des reins et de diminuer la génotoxicité considérablement. Ainsi il apparaît que les extraits de *Teucrium polium* possèdent une large gamme d'activités biologiques et des propriétés protectrices du foie et des reins grâce à leur teneur élevée en polyphénols et en flavonoïdes.

Mots clés : *Teucrium polium*, Antioxydant, Aflatoxine B₁, Polyphénols, Stress oxydatif, Hépatotoxicité, Néphrotoxicité.

Abstract

Teucrium polium belonging to the Lamiaceae family is commonly used in Algerian traditional medicine as an antidiabetic, antihypertensive and healing agent. The aim of this study is to identify, in a first part, the phenolic compounds of methanolic, ethanolic and aqueous extracts of *Teucrium polium* by HPLC, and to evaluate, their antioxidant and anticancer activities *in vitro*. In a second part, the protective effect of the methanolic extract of *T. polium* against Aflatoxin B₁ induced toxicity in rat liver and kidney was studied. The results indicate that the highest content of total polyphenols and flavonoids was obtained in the methanolic extract with $134.10 \pm 1.96 \mu\text{g/mg}$ et $38.85 \pm 1.02 \mu\text{g/mg}$ respectively. HPLC analysis of the extracts identified 12 phenolic compounds, including naringin as the major compound. *T. polium* extracts, tested *in vitro*, showed appreciable free radical scavenging activity against DPPH and ABTS. The same effect was also observed on iron-reducing and chelating power compared with standards. This extract also showed potential anticancer property against MCF-7 breast cancer cell lines compared to the standard (doxorubicin), followed by ethanolic and aqueous extract respectively.

The protective effect of methanolic extract of *T. polium* against AFB₁-induced toxicity was studied in rats. The obtained data show that the administration of AFB₁ causes a significant increase in the activities of liver enzymes (ALT, AST and ALP), levels of renal markers (creatinine, uric acid, urea), as well as other biochemical parameters such as ; cholesterol, triglycerides, LDL, carcinoembryonic antigen (CEA), alpha-fetoprotein (AFP), TNF α , interleukin-6, malondialdehyde, and significantly decreased levels of serum total proteins, albumin, HDL, TAC and hepatic and renal catalase and glutathione peroxidase. Treatment of rats with methanolic extract of *T. polium* at 50 and 100 mg/kg restored the values of these biochemical markers almost to their normal levels. On the other hand, treatment with AFB₁ resulted in significant tissue changes in the liver and kidney as well as significant genotoxicity by increasing MNPCE levels and Comet tail formation in rat bone marrow. However, combined treatment of rats with both doses of the extract and AFB₁ resulted in restoration of normal liver and kidney architecture and significantly decreased genotoxicity. Thus, it appears that *Teucrium polium* extracts have a wide range of biological activities and protective properties for the liver and kidneys, thanks to their high polyphenol and flavonoid content.

Keywords: *Teucrium polium*, Aflatoxin B₁, Polyphenols, Oxidative stress, Antioxidant, Hepatotoxicity, Nephrotoxicity.

Liste des abréviations

- ABTS** : 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
- AFB₁** : Aflatoxine B₁
- AFBO** : AFB₁-exo-8,9 époxyde
- AFP** : Alpha-fetoprotein Tumor Marker
- ALP** : Phosphatase alcaline
- ALT** : Alanine Aminotransferase
- AST** : Aspartate Amino Transferase
- BHT** : Butylatedhydroxytoluene
- BHA** : Butylatedhydroxyanisole
- CHC** : Carcinome hépatocellulaire
- DPPH** : 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
- EDTA** : Ethylene diamine tetra acetic acid
- FBS** : Fetal bovine serum
- GPx** : Glutathion peroxidase
- GR** : Glutathion reductase
- GSH** : Glutathion
- HCC** : Hepatocellular carcinoma
- HRP** : Horseradish peroxidase
- IC₅₀** : Concentration inhibitrice de 50%
- MDA** : Malondialdehyde
- MN** : Micronoyau
- MTT** : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- MNPCE** : micronucleated polychromatic erythrocytes
- NOS** : Nitric oxide synthase
- NCE** : Normochromic erythrocytes
- OTM** : Olive tail moment
- PCE** : Polychromatic erythrocytes,
- ROS** : Reactive oxygen species
- TAC** : Total antioxidant capacity
- TMB** : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
- TM** : Tail moment
- TNF α** : Tumor necrosis factor alpha

Liste des tableaux

Tableau 1: Détail des séquences d'amorces pour les gènes amplifiés	42
Tableau 2: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de <i>T. polium</i>	44
Tableau 3: Composés phénoliques des extraits de <i>T. polium</i> déterminés par HPLC	45
Tableau 4: Activité cytotoxique de différents extraits de <i>T. polium</i> contre des cellules de cancer du sein MCF-7	51
Tableau 5: Paramètres de stress oxydatif dans le foie	60
Tableau 6: Paramètres de stress oxydatif dans les reins	60
Tableau 7: Effet de l'extrait de <i>T. polium</i> sur la formation de la queue de comète dans les cellules de la moelle osseuse de rats traités à l'aflatoxine B ₁	66

Liste des figures

Figure 1 : Classification des polyphénols.....	5
Figure 2: Structure générale des acides phénoliques.....	6
Figure 3: Structure générales des flavonoïdes.....	7
Figure 4: Feuilles et fleurs de <i>Teucrium polium</i>	14
Figure 5: Les principaux types des aflatoxines	21
Figure 6: Métabolisme de l'AFB ₁ chez l'homme et l'animal par le cytochrome P450	23
Figure 7: Droite d'étalonnage de l'acide gallique	27
Figure 8: Droite d'étalonnage de la rutine	28
Figure 9: Chromatogrammes HPLC des polyphénols standards (A), des polyphénols totaux des extraits méthanolique (B), éthanolique (C) et aqueux (D) de <i>T. polium</i>	46
Figure 10: l'IC ₅₀ des extraits et standards obtenus par le test ABTS.	48
Figure 11: Pouvoir réducteur des extraits de <i>T. polium</i>	48
Figure 12: Valeurs des A _{0.5} des extraits et des standards obtenues avec le test CUPRAC. ...	50
Figure 13: Effet cytotoxique de différentes concentrations des extraits de <i>Teucrium polium</i> contre la lignée cellulaire MCF-7.....	51
Figure 14: Effet de l'aflatoxine B ₁ et de l'extrait de TP sur le poids corporel.....	53
Figure 15: Effet de l'extrait méthanolique de TP sur les paramètres hépatiques des rats traités par l'aflatoxine B ₁	54
Figure 16: Effet protectif de l'extrait méthanolique de <i>T. polium</i> sur la fonction rénale chez les rats traités par l'aflatoxine B ₁	57
Figure 17: Effet de l'aflatoxine et de l'extrait de <i>T. polium</i> sur le profile lipiique chez les rats traités par l'aflatoxine B ₁	59
Figure 18: Effet de l'aflatoxine et de l'extrait de <i>T. polium</i> sur les taux des marqueurs tumoraux chez les rats traités par l'aflatoxine B ₁	63
Figure 19: Effet de l'extrait de <i>T. Polium</i> et de l'AFB ₁ sur l'apparition de MNPCes dans les cellules de moelle osseuse de rat.	65
Figure 20: Photomicrographies de fluorescence de cellules de moelle osseuse de rat traitées par l'extrait de <i>T. polium</i> et l'AFB ₁ . (a) des cellules intactes ; (b-f) différents modèles de formation de queue de comète.....	66
Figure 21: Effet de l'AFB ₁ , de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène TNF- α dans le foie de rat.	68
Figure 22: L'effet de l'AFB ₁ , de l'extrait de et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène IL-1 β dans le foie de rat.	69

Figure 23: Effet de l'AFB ₁ , de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène IL-2 dans le foie de rat.....	69
Figure 24 : Effet de l'AFB ₁ , de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène IL-6 dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM de trois échantillons.....	70
Figure 25: Effet de l'AFB ₁ , de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène Nrf2 dans le foie de rat.	71
Figure 26: Effet de l'AFB ₁ , de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène iNOS dans le foie de rat.....	71
Figure 27: Photomicrographie d'une coupe du foie des rats témoins.....	73
Figure 28: Photomicrographie d'une section du foie des rats traités avec 50 mg/kg de l'extrait de <i>T. Polium</i>	74
Figure 29: Photomicrographie du foie des rats traités avec 100 mg/kg de l'extrait.....	74
Figure 30: Photomicrographies de sections de foie de rats traités avec l'AFB ₁	74
Figure 31: Photomicrographies de sections de foie de rats traités avec (a) AFB ₁ plus l'extrait à 50 mg/kg et (b) AFB ₁ plus l'extrait à 100 mg/kg.....	75

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

Synthèse bibliographique

2	La Phytothérapie.....	3
2.1	Les plantes médicinales	3
2.2	Métabolites secondaires des plantes médicinales	4
2.2.1	Les polyphénols.....	4
2.2.1.5	Biosynthèse des polyphénols.....	8
2.2.1.6	Les polyphénols comme antioxydants.....	9
2.2.2	Les terpènes.....	10
2.2.3	Les alcaloïdes	12
2.3	Les plantes médicinales en Algérie	13
2.4	Présentation de la plante : <i>Teucrium polium</i>	13
2.4.1	Description botanique	14
2.4.2	Taxonomie et systématique	14
2.4.3	Usage traditionnel de la plante	15
2.4.4	Propriétés pharmacologiques de <i>Teucrium polium</i>	15
3	Les aflatoxines.....	20
3.1	Structure et propriétés physicochimiques des aflatoxines.....	20
3.2	Métabolisme	21
3.2.1	Toxicité de l'aflatoxine B ₁	21
3.2.2	Protection et détoxification de l'AFB ₁ par les substances phytochimiques.....	23

Partie pratique

1	Matériel et méthodes.....	26
1.1	Matériel végétal	26
1.2	Préparation des extraits.....	26
2	Méthodes.....	26
2.1	Détermination de la teneur en des polyphénols totaux.....	26
2.2	Détermination de la teneur en flavonoïdes	27
2.3	Analyse des polyphénols d'extraits de <i>T. polium</i> par HPLC	28
2.4	Evaluation de l'activité antioxydante <i>In vitro</i>	28
2.5	Cytotoxicité de l'extrait contre les cellules cancéreuses du sein MCF-7	30
2.6	Effet protecteur de l'extrait méthanolique contre la toxicité induite par l'aflatoxine B ₁ 31	
2.6.1	Dosage des paramètres biochimiques	31
2.6.1.1	Dosage des marqueurs sériques du foie.....	32

2.6.1.2	Dosage des marqueurs sériques des reins.....	33
2.6.1.3	Le profile lipidique	35
2.6.1.4	Détermination de taux de TNF alpha	37
2.6.1.5	Dosage de l'interleukine 6	37
2.6.1.6	Dosage des marqueurs tumoraux.....	38
2.6.1.7	Evaluation du statut oxydatif.....	39
2.6.1.8	Evaluation de la génotoxicité	41
a)	Test des micronoyaux (MN).....	41
b)	Essai d'électrophorèse sur gel monocellulaire (test des comètes)	41
c)	Évaluation de l'expression des gènes hépatiques par qRT-PCR	42
2.7	Analyses histologiques	43
2.8	Analyses statistiques.....	43
3	Résultats et discussion	44
3.1	Evaluation des polyphénols et des flavonoïdes totaux	44
3.2	Composition phénolique des extraits.....	45
3.3	Évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	46
3.4	Activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses du sein MCF-7	50
3.5	Effet protecteur de l'extrait méthanolique contre la toxicité induite par l'aflatoxine B ₁ 52	
3.5.1	Poids corporel.....	52
3.5.2	Evaluation paramètres biochimiques	53
3.5.2.1	Marqueurs sériques du foie.....	53
3.5.2.2	Marqueurs sériques des reins.....	55
3.5.2.3	Le Profil lipidique.....	58
3.5.2.4	Paramètres de stress oxydatif de foie et des reins	60
3.5.2.5	Dosage des marqueurs tumoraux.....	62
3.5.2.6	Génotoxicité.....	64
a)	Test de micronoyaux	64
b)	Test des comètes.....	65
c)	Effets sur l'ARNm des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans le foie ...	68
d)	Effet sur l'expression du facteur (Nrf2) et de l'oxyde nitrique inductible dans le foie 70	
3.5.3	Analyse histologique	73
	Conclusion	77
	Références bibliographiques.....	79

1 Introduction

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des maladies remonte à l'histoire de la vie humaine. Ces dernières années, une tendance croissante à la médecine alternative ou traditionnelle a été remarquée. Les plantes médicinales sont universellement considérées comme des sources importantes de nouvelles substances chimiques ayant des effets thérapeutiques potentiels. De ce fait, la médecine moderne dépend beaucoup des plantes dont les vertus thérapeutiques ont été confirmées.

Teucrium polium est reconnu depuis longtemps dans la médecine populaire pour le traitement de nombreux états pathophysiologiques, tels que les troubles gastro-intestinaux, les inflammations, le diabète et les rhumatismes (Boudjelal et al., 2013). De plus, cette espèce est connue pour sa richesse en métabolites secondaires tels que les polyphénols et les huiles essentielles. Il a été démontré que l'extrait de *Teucrium polium* induit des effets hypotenseurs, anti-inflammatoires, hypoglycémiques, antispasmodiques, antibactériens et antipyrétiques (Rahmouni et al., 2017 ; Gharaibeh et al. 1989). La plupart de ces effets ont été liés aux propriétés antioxydantes et de piégeage des radicaux libres.

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires produits par différentes souches de champignons, comme *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, que l'on retrouve largement comme contaminants dans une grande variété de cultures (céréales, oléagineux, noix et épices) (Bouhetet Oswald, 2005). Différentes études ont confirmé que ces composés sont toxiques, cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs chez les animaux et les humains dont le foie est le principal organe cible. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a indiqué que les aflatoxines sont cancérigènes pour l'homme.

Le large éventail d'effets indésirables causés par d'aflatoxine est appelé aflatoxicose et il est classé en intoxication aiguë causée par une courte exposition à une grande quantité de toxines et caractérisée par des lésions hépatiques graves, une immunosuppression, des dysfonctionnements nutritionnels et le cancer. Parmi ces toxines, l'aflatoxine B₁ (AFB₁) est considérée comme la plus récurrente et la plus délétère. Chez l'homme, cette toxicité a été évaluée en association avec différentes épidémies d'intoxication aiguë, notamment dans les pays en développement et les diverses études *in vitro* ont démontré que la cancérogénicité de l'AFB₁ s'exerce principalement lors de son métabolisme par les cytochromes P450 (CYP450) dans le foie et ont élucidé le mécanisme de sa toxicité (Crespi et al., 1990; Ueng et al., 2002).

L'exploration de nutraceutiques protecteurs vis à vis du stress oxydatif et des autres effets toxiques induits par l'aflatoxine ou tout autre molécule toxique constitue un défi pour la santé humaine au niveau de leur efficacité avec une faible toxicité et des effets secondaires

minimes. Les produits phytochimiques avec ces avantages, agissent par des voies multiples et visant des cibles diverses, ce qui favorise leur utilisation dans la prévention et le traitement des intoxications.

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont l'objectif consiste à évaluer, *in vitro*, les activités antioxydante et cytotoxique des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de *Teucrium polium*. En deuxième lieu nous avons étudié l'effet protecteur de l'extrait méthanolique *Teucrium polium* contre la toxicité induite par l'Aflatoxine B₁ chez les rats.

Notre travail est structuré comme suit :

La première partie est consacrée à une revue bibliographique nécessaire pour comprendre, discuter et interpréter les résultats obtenus.

La seconde partie englobe les travaux personnels avec les méthodes appliquées au niveau des différents compartiments de l'approche :

Une extraction qui permet l'obtention des extraits de la plante

- ✓ Une identification quantitative et qualitative des molécules bioactives présentes dans les extraits par HPLC
- ✓ La détermination de la teneur en composés phénoliques des extraits et l'évaluation *in vitro* de leurs activités biologiques.
- ✓ L'étude de l'effet protecteur de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* vis-à-vis de la toxicité induite par l'Aflatoxine B₁ chez les rats.

Phytothérapie

2 La Phytothérapie

L'homme a toujours souffert des infections par des bactéries, des champignons, des virus et des parasites, mais aussi des inflammations, de rhumes, de problèmes digestifs, de douleurs et bien d'autres troubles de santé. Les traitement moderne, qui est basé sur des médicaments synthétiques et des antibiotiques, n'est apparu qu'au cours des 150 dernières années (Wink, 2015). Auparavant, l'homme devait compter sur les médicaments issus de la nature, principalement des plantes, mais aussi des champignons et des animaux. Les systèmes médicaux du monde entier, développés il y a des milliers d'années, s'appuyaient fortement sur la phytothérapie. Le traitement des infections et des troubles de la santé par des plantes médicinales implique des produits naturels actifs, principalement de faible poids moléculaire avec diverses activités (Leite et al., 2021) biologiques et structures chimiques (appelés métabolites secondaires) (Bruce, 2022).

Le mot "phytothérapie" provient des termes grecques : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement". C'est l'une des plus anciennes pratiques thérapeutiques utilisées par l'homme et à pour but de prévenir et de traiter certains troubles fonctionnels et certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes et de préparations à base de plantes. L'utilisation des plantes médicinales est actuellement très populaire en tant que médecine complémentaire et alternative dans les pays les plus développés et continue d'être le premier soin dans les pays les moins développés en raison de son faible coût et de son accès facile (Leite et al., 2021).

2.1 Les plantes médicinales

Une plante médicinale est toute plante utilisée pour soulager, prévenir ou guérir une maladie ou pour modifier les processus physiologiques et pathologiques, ou utilisée comme source de médicaments ou de leurs précurseurs. Une préparation phytopharmaceutique ou un médicament à base de plantes est un médicament manufacturé obtenu exclusivement à partir de plantes (parties aériennes et non aériennes, sucs, résines et huiles), soit à l'état brut, soit sous forme de formulation pharmaceutique (Rates, 2001). Dans diverses cultures humaines à travers le monde, plus de 50 000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicales. Cependant, la répartition des plantes médicinales dans le monde n'est pas uniforme (Jamshidi-Kia et al., 2018).

La flore naturelle est devenue une source très utile pour l'amélioration de la santé et la guérison de nombreuses maladies dans diverses communautés humaines. En effet, une variété d'espèces de plantes est utilisée dans de nombreuses parties du monde pour remédier à plusieurs

maladies. Bien que l'Organisation Mondiale de la Santé ait indiqué que le système primaire de soins de santé pour 60 % de la population mondiale est représenté par la médecine traditionnelle, un grand nombre d'espèces végétales ayant des activités biologiques potentielles n'ont pas été explorées (Li et Vederas, 2009). L'efficacité des médicaments traditionnels est devenue aujourd'hui une réalité en raison de leur meilleure compatibilité avec le corps humain, de leur meilleure acceptabilité culturelle dans le monde entier et de leurs moindres effets secondaires (Verma et Singh, 2008).

A l'heure actuelle, les plantes demeurent indéniablement une source importante de médicaments, soit parce que leurs constituants sont de précieux principes actifs, soit parce que les chimistes sont parvenus à modifier la structure de certaines molécules qu'elles renferment, afin de les rendre moins toxiques, plus efficaces, ou de leur conférer une meilleure biodisponibilité. Les composés phytochimiques d'intérêt thérapeutiques peuvent provenir de nombreuses parties de la plante telles que l'écorce, les feuilles, les fleurs, les racines, les fruits, les graines, etc. avec des teneurs variables (Lehmann 2013).

Les plantes médicinales, tout comme les médicaments, est susceptible d'exposer les populations à des effets indésirables parfois graves, et des intoxications. De ce fait, il est nécessaire d'établir une réglementation spécifique, visant à garantir la qualité pharmaceutique, la sécurité d'emploi et l'efficacité thérapeutique du médicament à base de plantes.

2.2 Métabolites secondaires des plantes médicinales

Les métabolites secondaires des plantes sont des composés chimiques produits par la cellule végétale par le biais de voies métaboliques dérivées des voies primaires. Il a été démontré que les métabolites secondaires possèdent divers effets biologiques, qui constituent la base scientifique de l'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle de nombreuses communautés anciennes. Ils ont été décrits comme antibiotiques, antifongiques et antiviraux et capables donc de protéger les plantes contre les agents pathogènes (Pagare et al., 2015). Les métabolites secondaires des plantes sont classés en plusieurs catégories en fonction de leur structure chimique.

2.2.1 Les polyphénols

Les polyphénols constituent l'un des groupes de substances les plus courants et les plus répandus chez les plantes. On les trouve dans tous les organes végétatifs, ainsi que dans les fleurs et les fruits. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires impliqués dans la défense chimique des plantes contre les prédateurs et dans les interférences plante-plante.

Les aliments d'origine végétale contiennent naturellement des polyphénols ; ces composés présentent un large éventail de structures complexes. Le monomère de base des polyphénols est le cycle phénolique et ils sont généralement classés en acides phénoliques et en alcools phénoliques. Ces composés peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structurels qui lient ces cycles les uns aux autres (figure 2). On distingue ainsi les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes (Manach et al., 2004).

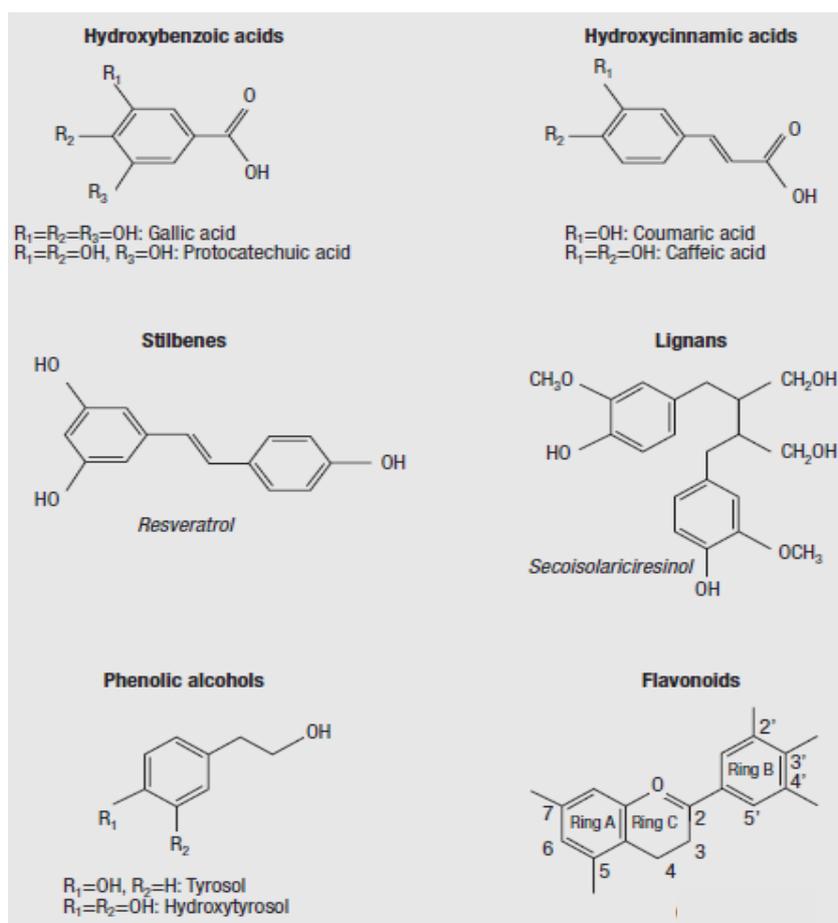


Figure 1 : Classification des polyphénols (D'Archivio et al., 2007)

2.2.1.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques qui peuvent être divisés en deux types principaux, les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Figure 2). Les acides hydroxybenzoïques qui contribuent à l'alimentation humaine sont rares, et c'est la raison pour laquelle ils ne sont pas considérés actuellement comme présentant un grand intérêt nutritionnel. Les dérivés de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque ont des squelettes en C1-C6 et en C3-C6, respectivement. Certains acides phénoliques se trouvent sous

forme libre dans les légumes et les fruits, mais la coque et les graines contiennent des acides phénoliques sous forme liée (Adomet Liu, 2002; Chandrasekara et Shahidi, 2010; K.-H. Kim et al., 2006).

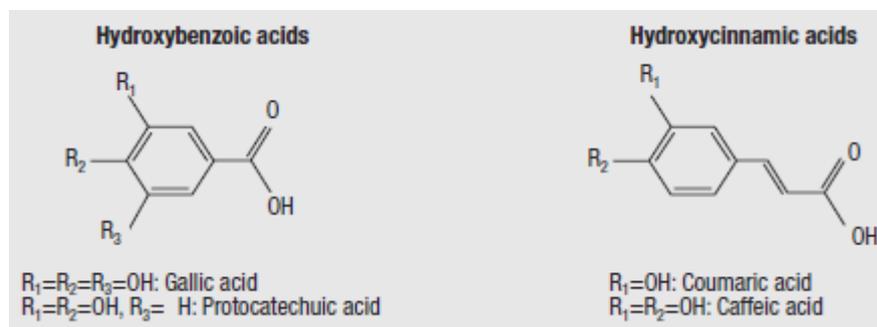


Figure 2: Structure générale des acides phénoliques (D'Archivio et al., 2007)

2.2.1.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes partagent un squelette carboné commun de diphenylpropanes, deux cycles benzéniques (cycle A et B) reliés par une chaîne linéaire à trois carbones. La chaîne centrale à trois atomes de carbone peut former un cycle pyrané fermé (cycle C) avec l'un des cycles benzéniques. Les flavonoïdes sont eux-mêmes divisés en 6 sous-classes, selon l'état d'oxydation du cycle pyranique central : flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, anthocyanidines et flavanols (catéchines et proanthocyanidines) (Figure 3). Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, et la liste ne cesse de s'allonger. Cela s'explique par l'existence de nombreux modèles de substitution dans lesquels les substituants primaires (comme le groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (c'est-à-dire être plus glycosylés ou acylés), ce qui donne parfois des structures très complexes (Harborne et Williams, 2000).

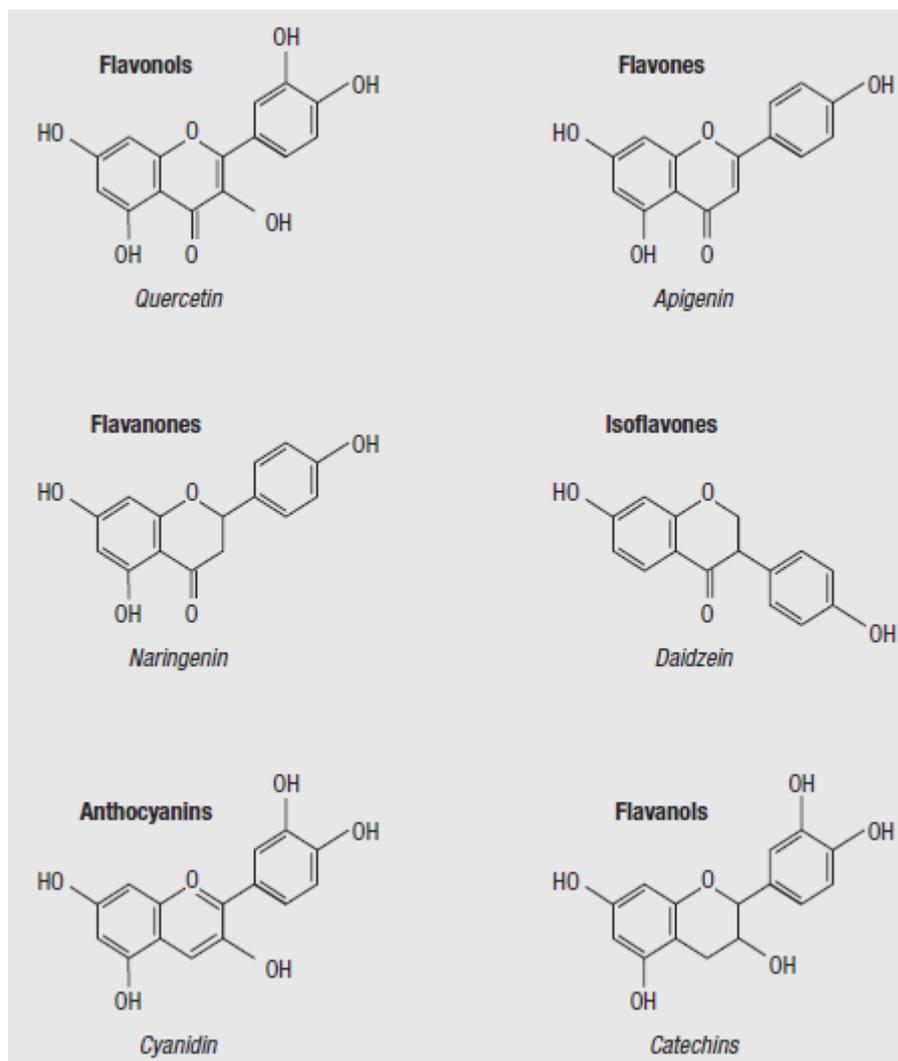


Figure 3: Structure générales des flavonoïdes (D'Archivio et al., 2007)

2.2.1.3 Stilbènes

Les stilbènes sont des composés non flavonoïdes présentant une structure carbonée particulière en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène.

Ils existent en deux formes isomériques : la forme *cis* et la forme *trans* qui est la forme la plus stable et bioactive (Mérillon et al., 1997). Le resvératrol et ses dérivés, tels que le ptérostilbène, l'oxyresvératrol ou les viniférines, sont les stilbènes les plus connus en raison de leurs diverses activités biologiques puissantes et de leurs propriétés médicinales qui ont été largement étudiés (Dubrovina et Kiselev, 2017). Les dérivés du resvératrol varient en fonction du nombre de groupements hydroxyle, des substitutions par les sucres, les groupements méthoxy, par la conformation et par le degré d'oligomérisation (Mérillon et al., 1997).

2.2.1.4 Lignanes

Les lignanes sont produits par dimérisation oxydative de deux unités phénylpropane. Ils sont présents dans la nature sous forme libre, tandis que leurs dérivés glycosidiques ne sont qu'une forme mineure. Les graines de lin représentent la principale source alimentaire, contenant jusqu'à 3,7 g/kg de secoisolariciresinol (Adlercreutz et Mazur, 1997). La microflore intestinale métabolise les lignanes en entérodiol et en entérolactone. L'intérêt pour les lignanes et leurs dérivés synthétiques est croissant en raison de leurs applications potentielles dans la chimiothérapie du cancer et de divers autres effets pharmacologiques (Saleem et al., 2005).

2.2.1.5 Biosynthèse des polyphénols

Comme tous les composés phénoliques, les acides phénoliques tels que l'acide gallique et l'acide cinnamique sont considérés comme des métabolites de la voie du shikimate. La biosynthèse des polyphénols complexes tels que les flavonoïdes est liée au métabolisme primaire par des intermédiaires dérivés des plastes et des mitochondries, chacun nécessitant une exportation vers le cytoplasme où ils sont incorporés dans des parties distinctes de la molécule. Le cycle aromatique B et le cycle chromane sont considérés comme provenant de l'acide aminé phénylalanine, lui-même un produit de la voie du shikimate, tandis que le cycle A provient de trois unités de malonyl-CoA (Kumar et Pandey, 2013). Ces trois unités sont ajoutées par des réactions séquentielles de décarboxylation et de condensation.

La phénylalanine ammoniac lyase (PAL) est une enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes qui catalyse la conversion de la phénylalanine en cinnamate, ce qui conduit ensuite aux structures C6-C3. L'intermédiaire final 4-coumaroyl-CoA et trois molécules de malonyl-CoA sont ensuite condensés pour donner la première structure flavonoïde naringénine chalcone par l'enzyme chalcone synthase (CHS). La chalcone est isomérisée par la chalcone flavanone isomérase (CHI) en une flavanone. Cet intermédiaire flavanone est essentiel car c'est de là que partent toutes les classes de flavonoïdes, y compris leurs sous-groupes. La chalcone est également le point de départ des isoflavones et des coumestrols par l'intermédiaire de différentes enzymes, dont la CHI et l'isoflavone synthase (IFS). Par exemple, les intermédiaires (2S)-flavanones sont catalysées par la flavanone 3-hydroxylase (F3H) en dihydroflavonols, qui sont ensuite réduits par la dihydroflavonol réductase (DFR) en flavan-3,4-diols (leucoanthocyanines), qui sont convertis en anthocyanidines par l'anthocyanidine synthase (ANS). La glucosylation des flavonoïdes est catalysée par la glucosyltransférase (Tsao et McCallum, 2009 ; Bohm, 1998).

2.2.1.6 Les polyphénols comme antioxydants

Les polyphénols sont des métabolites secondaires que les plantes produisent pour se protéger des autres organismes. Il a été démontré que les polyphénols alimentaires jouent un rôle important dans la santé humaine. Une consommation élevée de fruits, de légumes et de céréales complètes, qui sont riches en polyphénols, a été associée à une diminution du risque de nombreuses maladies chroniques, notamment le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'inflammation chronique et de nombreuses maladies dégénératives (Pandey et Rizvi, 2009). Plusieurs études ont révélé que beaucoup de ces maladies sont liées au stress oxydatif sous l'effet des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Les composés phytochimiques, en particulier les polyphénols, contribuent de manière prédominante à l'activité antioxydante totale des fruits. Les polyphénols se sont avérés être de puissants antioxydants capables de neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Le système hautement conjugué et certains modèles d'hydroxylation tels que le groupe 3-hydroxy dans les flavonols ont de grande importance dans les activités antioxydantes. Les polyphénols inhibent la génération de radicaux libres, réduisant ainsi le taux d'oxydation en inhibant la formation ou en désactivant les espèces réactives et les précurseurs des radicaux libres (Swallah et al., 2020).

Les polyphénols agissent fréquemment comme des piègeurs directs de radicaux dans les réactions en chaîne de peroxydation des lipides (briseurs de chaîne). En brisant cette chaîne, les polyphénols donnent un électron au radical libre pour le neutraliser et devenir eux-mêmes des radicaux stables (moins réactifs), arrêtant ainsi les réactions en chaîne (Guo et al., 2009).

Outre le piégeage des radicaux, les polyphénols sont également connus comme des chélateurs de métaux. La chélation des métaux de transition tels que le Fe^{2+} peut réduire directement la vitesse de la réaction de Fenton, empêchant ainsi l'oxydation causée par les radicaux hydroxyles hautement réactifs (Perron et Brumaghim, 2009). D'autres mécanismes tels que l'inhibition de la xanthine oxydase et l'augmentation des antioxydants endogènes sont également considérés comme des effets importants des polyphénols (Ouyang et al., 2018; Wu et al., 2010). Les polyphénols peuvent induire des enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase qui décomposent respectivement les hydroperoxydes, le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes, et inhiber l'expression d'enzymes telles que la xanthine oxydase (Du et al., 2007).

Si les activités antioxydantes directes et indirectes des polyphénols peuvent jouer un rôle important dans la réduction du stress oxydatif par le biais des mécanismes mentionnés précédemment, les rôles réels de ces composés au niveau cellulaire peuvent être plus compliqués. Il est devenu clair que les substances phytochimiques, en particulier les

polyphénols et leurs métabolites *in vivo*, n'agissent pas seulement comme des antioxydants conventionnels donneurs d'hydrogène ou d'électrons, mais qu'ils peuvent exercer des actions modulatrices dans les cellules en agissant sur les voies de signalisation des protéines kinases et des lipides kinases (Das et al., 2016; Mansuri et al., 2014). Compte tenu de leurs effets bénéfiques potentiels, les polyphénols représentent un groupe chimique prometteur pour lequel des études supplémentaires, y compris des essais cliniques, devraient être menées afin d'acquérir une compréhension claire de leurs mécanismes d'action, en tant qu'antioxydants ou modulateurs de la signalisation cellulaire (García-Aguilar et al., 2021).

2.2.2 Les terpènes

Les terpènes constituent le groupe le plus important et le plus diversifié de composés secondaires végétaux. Le nom "terpène" est dérivé du mot "turpentine", qui vient lui-même de l'ancien français "térébinthe", qui signifie "résine". Ils sont tous dérivés chimiquement d'unités d'isoprène à 5 carbones assemblées de différentes manières (Hoffmann, 2003). Les terpènes sont classés en fonction du nombre d'unités isoprène dans la molécule ; un préfixe dans le nom indique le nombre d'unités terpéniques comme suit :

2.2.2.1 Hémiterpènes

Ils sont constitués d'une seule unité d'isoprène. L'isoprène lui-même est considéré comme le seul hémiterpène, mais les dérivés contenant de l'oxygène, tels que l'acide angélique isolé de *Angelica archangelica* et l'acide isovalérique du *Vaccinium myrtillus*, sont des hémiterpénoïdes (Mabou et Yossa, 2021).

2.2.2.2 Monoterpènes

Ils sont constitués de deux unités d'isoprène et ont la formule moléculaire $C_{10}H_{16}$. Ce sont des composants importants des huiles essentielles des plantes ou des huiles volatiles. Les monoterpènes sont généralement présents dans les membres de certaines familles de plantes, telles que les Lamiacées, les Pinacées, les Rutacées et les Apiacées, à partir desquelles de nombreuses huiles essentielles sont produites commercialement. Les monoterpènes et autres terpènes volatils ont un certain nombre d'utilisations médicinales très répandues. Des composés tels que le camphre et le menthol sont utilisés comme contre-irritants, analgésiques et agents anti-démangeaisons. De nombreux monoterpènes ont été utilisés comme anthelminthiques (Ghori et al., 2016; Ninkuu et al., 2021).

2.2.2.3 Sesquiterpènes

Ils sont constitués de trois unités d'isoprène et ont la formule moléculaire de $C_{15}H_{24}$. D'après leur origine biogénétique, il existe plus de 200 types structurels différents de

sesquiterpènes. Ces composés peuvent être classés en trois groupes principaux en fonction de leur structure : acyclique (le farnésol), monocyclique (le bisabolol) et bicyclique (le caryophyllène). Un certain nombre de lactones sesquiterpéniques présentent des activités antibactériennes, antifongiques et antiprotozoaires (Ninkuu et al., 2021). Le rhizome d'*Atractylodis*, issu d'*Atractylodis macrocephala*, est utilisé cliniquement comme diurétique, analgésique et anti-inflammatoire. Cette activité est liée à la présence de composés actifs, notamment l'eudesma-4(14)-7(11)-dien-8-one et l'atractylénolide I (Zhang et al., 2021).

2.2.2.4 Diterpènes

Ils sont composés de quatre unités d'isoprène et ont la formule moléculaire $C_{20}H_{32}$. Les diterpènes sont classés en composés acycliques et macrocycliques. Les diterpènes peuvent être des structures à 6 anneaux ou des structures fusionnées à 5 et 7 anneaux. En outre, de nombreux diterpènes possèdent des systèmes cycliques supplémentaires. La vitamine A, un diterpénoïde, est désignée, avec les composés apparentés, sous le nom de "carotènes". En outre, *Teucrium chamaedrys* (germandrée) et *T. scorodonia* (sauge des bois), de la famille des Labiées, produisent des diterpènes de type néoclérothane. Ils sont utilisés en phytothérapie comme diaphorétiques et antirhumatismaux (Bagci et al., 2010).

Les diterpènes sont des hydrocarbures non volatils avec la formule moléculaire $C_{20}H_{32}$. Ils sont composés de quatre unités isoprènes, dont la structure est très variée. Ils comprennent des formes linéaires, bicycliques, tétracycliques, pentacycliques ou macrocycliques (Yadav et al., 2014). Les diterpènes provenant de diverses sources ont montré des effets inhibiteurs contre les microbes pathogènes, les ravageurs herbivores et les mauvaises herbes. En outre, *Teucrium chamaedrys* (germandrée) et *T. scorodonia* (sauge des bois), de la famille des Labiées, produisent des diterpènes de type néoclérothane. Ils sont utilisés en phytothérapie comme diaphorétiques et antirhumatismaux (Bagci et al., 2010).

2.2.2.5 Triterpènes

Les triterpénoïdes sont des composés dont le squelette carboné est basé sur six unités d'isoprène et qui sont dérivés de l'hydrocarbure acyclique en C_{30} , le squalène. Ils ont des structures cycliques relativement complexes, la plupart étant des alcools, des aldéhydes ou des acides carboxyliques (Mabou et Yossa, 2021).

Ces composés sont les précurseurs des stéroïdes, tant les plantes. Les acides β -boswelliques (triterpène de type ursane) et les acides α -boswelliques (triterpène de type oléane) isolés de la résine d'oléo-gum de *Boswellia carterii* sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires et anti-rhumatismales (Culioli et al., 2003).

Les terpènes comprennent également les sesquiterpènes (sept unités isoprènes, $C_{35}H_{56}$), les tétraterpènes (huit unités isoprènes, $C_{40}H_{64}$) ainsi que les polyterpènes (Ninkuu et al., 2021).

2.2.3 Les alcaloïdes

Ils sont des composés organiques comportant au moins un atome d'azote dans un cycle hétérocyclique. Leur définition est problématique, car ils ne représentent pas un groupe homogène de composés, que ce soit de point de vue chimique, biochimique ou physiologique. Bien que les plantes contenant des alcaloïdes soient utilisées par l'homme depuis au moins 3 000 ans, les composés responsables de cette activité n'ont été isolés et caractérisés qu'au dix-neuvième siècle. Selon leur structure chimique de base, les types d'alcaloïdes de base sont les suivants : acridones, aromatiques, carbolines, éphédras, ergots, imidazoles, indoles, bisindoles, indolizidines, manzamines, oxindoles, quinolines, quinozoles, phénylisoquinolines, phényléthylamines, pipéridines, purines, pyrrolidines, pyrrolizidines, pyrroloindoles, pyridines et tétrahydroisoquinolines simples (Bruce, 2022).

La plupart, de ces composés ont une réaction alcaline ; à l'état naturel, ils sont généralement salifiés par des acides organiques (tartrates, malates) ou combinés à des tanins (Dewick, 2009). À l'état pur, la plupart des alcaloïdes sont des solides cristallisables, incolores et non volatils. Néanmoins, certains sont colorés, comme la sanguinarine (orange) ou la berbérine (jaune) et certains alcaloïdes exempts d'oxygène apparaissent sous forme de liquides huileux (nicotine (III), coniine). La plupart des alcaloïdes ont un goût amer (Faehrich et al., 2021).

Possédant un atome d'azote accepteur de protons et un ou plusieurs atomes d'hydrogène d'amine donneur de protons, les alcaloïdes forment facilement des liaisons hydrogène avec les protéines, les enzymes et les récepteurs. Cette caractéristique, associée à la présence fréquente de groupes fonctionnels accepteurs et donneurs de protons, tels que les hydroxyles phénoliques et les groupements polycycliques, explique la bioactivité exceptionnelle des alcaloïdes (Kittakoop et al., 2014). Les propriétés pharmacologiques comprennent des propriétés analgésiques (codéine), stimulantes du système nerveux central (brucine), dépressives du système nerveux central (morphine), antihypotensives (éphédrine), antihypertensives (résérpine), antipyrétiques (quinine), anticholinergique (atropine), antiémétique (scopolamine) (Robbers et al., 1996), ocytocique et vasoconstricteur (ergométrine), antitumoral (colchicine et vinblastine) (Dewick, 2009; Dhyan et al., 2022).

2.3 Les plantes médicinales en Algérie

Avec une superficie de 2 381 741 km², l'Algérie est le plus grand pays riverain de la Méditerranée. Il est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des territoires du pays. Ce sont des savoir-faire ancestraux transmis de génération en génération chez les populations, le plus souvent rurales. C'est un héritage familial oral, dominant en particulier chez les femmes âgées et illettrées. Dans le Hoggar et en absence de médecins, dans certaines contrées isolées, les Touaregs se soignent avec les plantes médicinales et aromatiques dont ils connaissent le secret transmis de père en fils. En Kabylie, lorsqu'il y a de la neige et que les routes sont coupées, les montagnards utilisent des plantes médicinales et aromatiques pour se soigner (fumigation de feuilles d'eucalyptus contre la grippe). Dans la steppe pendant les transhumances, les nomades utilisent l'armoise blanche pour lutter contre les indigestions (Mokkadem, 2004).

La richesse de la flore algérienne est donc incontestable, elle recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques (FAO, 2012)

Ces plantes sont certes abondantes, mais dispersées géographiquement et ont des potentialités de rendement faible, leur contrôle est difficile, leur exploitation ne suffit pas à couvrir les besoins nationaux de la médecine, la pharmacie et de l'herboristerie.

2.4 Présentation de la plante : *Teucrium polium*

Les Lamiaceae sont l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs comprenant environ 250 genres et plus de 7000 espèces. La plupart des plantes de cette famille sont aromatiques et sont largement utilisées comme herbes culinaires et comme plantes médicinales dans la médecine traditionnelle (Napoli et al., 2020). Le genre *Teucrium* est un genre pérenne, polymorphe et cosmopolite, comprenant plus de 300 espèces poussant à l'état spontané dans les régions tempérées d'Europe, en particulier la Méditerranée, et l'Afrique du Nord (Djordjevic et al., 2018). Ce genre est représenté par plus de 340 espèces dont 20 se trouvent en Algérie, et 12 sous espèces ont été signalées par Quezel et Santa (1963).

Différents noms sont donnés à cette espèce en fonction de la population et du lieu où elle se trouve. Les plus connus sont ; khayata, hamzoucha, hamria, djertil, j'ada, Mezouqach, Takmazzut (targui ou berbère), Jeadà (Jordan), germandrée tomenteuse (Français), Germander (Anglais), poliot (Italien) (Autore et al., 1984; Tariq et al., 1989).

2.4.1 Description botanique

Connu sous le nom de Germandrée tomenteuse en français ou Djaïda en arabe, *Teucrium polium* L. est une plante vivace, herbacée, avec une odeur poivrée au frottement. C'est une plante presque ligneuse avec des tiges de 20 à 40 cm de haut et a un aspect blanc et cotonneux portant des feuilles opposées sessiles, linéaires lancéolées ou oblongues, en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut (Boullard, 2003) (Figure 4). Les feuilles sont opposées sessiles en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut. Ces feuilles, blanches tomenteuses sur les deux faces ont les bords enroulés. Les fleurs forment des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées (Christodoulakis et al., 2010).



Figure 4: Feuilles et fleurs de *Teucrium polium*

2.4.2 Taxonomie et systématique

Selon Rahmouni et al. (2021), *Teucrium polium* est classé comme suit :

Règle : Plantae

Branche : Spermatophyta

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiale

Famille : Lamiaceae

Genre : *Teucrium* **Espèce :** *polium*

2.4.3 Usage traditionnel de la plante

Teucrium polium est l'une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle dans les régions méditerranéennes et ce depuis plus de 2000 ans (Khazaei et al., 2017). La décoction des parties aériennes de *T. polium* est utilisée pour le traitement des maux de tête et les troubles gastro-intestinaux. Elle est également utilisée comme analgésique, anorexique, antipyrétique, cholagogue, tonique, vermifuge, antispasmodique et antinociceptive (Allahtavakoli et al., 2012; Gharaibeh et al., 1989; Meguellati et al., 2019; Parsaeet Shafiee-Nick, 2006). Les feuilles sont légèrement poivrées et étaient couramment utilisées pour préparer du thé et pour épicer les salades et les fromages de chèvre (Meguellati et al., 2019). En médecine traditionnelle algérienne, les parties aériennes de *T. polium* L. Sont utilisées en décoction pour le traitement du diabète, de l'hypertension et sous forme de poudre mélangée de la vaseline ou de la cire d'abeille, comme agent cicatrisant (Boudjelal et al., 2013).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur la composition chimique des parties aériennes de *Teucrium polium* par des méthodes chromatographiques. Ces études ont noté la présence des composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes et les tanins (Parsae et Shafiee-Nick, 2006), les saponines, les stéroïdes et les alcaloïdes (Sharifi-Rad et al., 2022). Les flavonoïdes qui ont été isolés de *T. polium* comprennent entre autres ; l'apigénine-7-glucoside, l'apigenin 5-galloylglucoside, la luteolin 7-glucoside, la rutine, le cirsiol, la cirsimaritrine, la salvigénine et l'eupatorine la vicénine-2 a partir des racines, des parties aériennes et des fleurs de la plante (Kawashty et al., 1999; Rizk et al., 1986; Sharififar et al., 2009; Verykokidou-Vitsaropoulou et Vajias, 1986). D'autres études ont révélé que les huiles essentielles de cette plante sont composées principalement des monoterpènes, des diterpènes, des sesquiterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes oxygénés (Djabou et al., 2012).

2.4.4 Propriétés pharmacologiques de *Teucrium polium*

De nombreuses activités biologiques de différents extraits de cette plante ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*. En effet, les études expérimentales, pharmacologiques et cliniques menées au cours des dernières années ont montré que les l'extrait et les composants isolés de différentes parties de *T. polium* ont des effets biologiques spécifiques, telles que les activités antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, hypoglycémiant, analgésique, diurétique, antipyrétique et antispasmodique.

2.4.4.1 Capacités antioxydantes

Les propriétés thérapeutiques des plantes médicinales sont souvent attribuées à leur pouvoir antioxydant. Cette activité antioxydante est étroitement corrélée à la teneur en

composés phénoliques (Moein et Moein, 2010). Différentes études scientifiques ont démontré que *T. polium* possède une activité antioxydante et un pouvoir de piégeage des radicaux libres élevés.

A cet égard, il a été rapporté que l'extrait aqueux préparé à partir des feuilles de *T. polium* inhibe la peroxydation lipidique induite par le fer (ions ferreux $[Fe^{2+}]$) dans le foie de rat avec le même degré que le Trolox (Ljubuncic et al., 2005). L'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. polium* a été également déterminée et ses résultats obtenus montre une grande activité de piégeage des radicaux libres ($IC_{50} = 26,30 \mu\text{g/ml}$) par rapport aux standards naturels et synthétiques, tels que la rutine ($IC_{50} = 9,28 \mu\text{g/ml}$), et le BHA ($IC_{50} = 5,39 \mu\text{g/ml}$) (Stankovic et al., 2012).

Dans une autre étude menée par Couladis et al. (2003), ils ont évalué les propriétés antioxydantes des plantes aromatiques grecques de la famille des lamiacées. Parmi les 21 plantes testées, ils ont constaté que l'extrait éthanolique de *T. polium*, ainsi que neuf autres plantes, ont présenté la même activité antioxydante que l' α -tocophérol dans l'inhibition de la superoxydation de l'acide arachidonique induite par le complexe bléomycine-Fe (II) en malondialdéhyde (MDA). L'effet de *T. polium* sur l'oxydation de différents tissus a été également étudié et les effets inhibiteurs de l'extrait de la plante contre la peroxydation ont été prouvés. En effet, dans une étude réalisée par Suboh et al. (2004), l'extrait méthanolique de *T. polium* protège les globules rouges contre la peroxydation lipidique induite par l'hydrogène.

2.4.4.2 Effets anti-inflammatoires

Dans une étude préliminaire de Capasso et al. (1983), l'activité anti-inflammatoire de l'extrait alcoolique de *T. polium* a été évaluée contre l'œdème de la patte induit par la carraghénine chez des rats Wistar mâles. Les résultats ont indiqué que l'extrait testé possède une activité anti-inflammatoire suffisante par rapport à celle de l'indométhacine. Dans une autre étude, l'extrait aqueux de *T. polium* a inhibé le développement de l'œdème de la patte induit par la carraghénine chez les rats après la 5^{ème} heure de traitement de manière significative avec un pourcentage de 79% plus importante que celui de l'indométhacine (62%) (Rahmouni et al., 2017). Ces auteurs ont conclu que la présence de flavonoïdes et de polyphénols pourrait être à l'origine de cette activité et cela par le blocage à la fois des voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase de l'acide arachidonique.

2.4.4.3 Effet hypoglycémiant

La propriété hypoglycémiant de *T. polium* a été rapportée dans plusieurs études, qui ont démontré une forte activité antidiabétique de cette plante. En effet, Gharaibeh et al. (1989),

ont montré que l'extrait aqueux de la partie aérienne de *T. polium* provoque des réductions significatives de la concentration de glucose dans le sang 4 heures après une administration intraveineuse et 24 heures après une administration intrapéritonéale chez les rats normoglycémiques et les rats hyperglycémiques traités par la streptozotocine ($p < 0,05$).

Dans une étude de Tatar et al. (2012), les effets des extraits des parties aériennes de *T. polium* sur les tests de tolérance au glucose par voie orale et l'histologie du pancréas chez les rats diabétiques traités par la streptozocine, ont été étudiés. L'examen histopathologique, ainsi que les évaluations biochimiques, ont indiqué que le traitement des rats diabétiques avec *T. polium* a entraîné la régénération des îlots pancréatiques et la réduction de la gravité des pancréas diabétiques induits par la streptozotocine. Ces auteurs ont conclu que l'extrait des parties aériennes de *T. polium* stimule probablement la réparation du pancréas et peut être cliniquement bénéfique comme agent pour restaurer ou maintenir le tissu pancréatique contre les lésions.

2.4.4.4 Activités anticancéreuses

Ces dernières années, les propriétés anticancéreuses de *T. polium* ont été évaluées dans plusieurs expériences et les effets cytotoxiques d'extraits et de dérivés de cette plante contre des cellules cancéreuses ont été rapportés.

Dans une étude menée par Stankovic et al., (2011), l'activité antiproliférative et proapoptotique des extraits méthanoliques de différentes espèces de *Teucrium* et leurs effets sur le statut prooxydant/antioxydant dans les cellules HCT-116 ont été étudiés. Le test MTT a indiqué que toutes les espèces, y compris *T. polium*, réduisent significativement la viabilité cellulaire de manière dose-dépendante, avec des valeurs d'IC₅₀ très faibles. Parmi toutes les espèces, les extraits méthanoliques de *T. polium* ont eu un effet cytotoxique modéré après 24 h (IC₅₀ = 77,83 ± 0,4 µg/ml) et 72 h (IC₅₀ = 253,39 ± 1,61 µg/ml) d'exposition.

Dans une autre étude réalisée par Rajabalian (2008), l'effet anticancéreux de l'extrait méthanolique de *T. polium*, a été testé en combinaison avec la vincristine, la vinblastine et de la doxorubicine contre les lignées cellulaires tumorales suivantes :

Mélanome (Skmel-3), ostéosarcome (Saos-2), cancer du côlon (SW480), cancer du sein (MCF-7), lignée cellulaire épidermique orale (KB), carcinome de la vessie (EJ) et carcinome épidermoïde (A431). Toutes ces combinaisons ont montré un fort effet synergique dans l'inhibition de la croissance cellulaire ($0,13 < CI < 0,36$). En outre, les combinaisons avec la vincristine et la vinblastine ont entraîné une apoptose massive (>80 %) par rapport à l'effet des médicaments individuels.

2.4.4.5 Activités anti microbiennes

Bien que *T. polium* ne soit pas utilisé de manière extensive pour traiter les infections dans la médecine traditionnelle, certains rapports se sont intéressés à étudier l'activité antibactérienne de la plante. Les huiles essentielles de *T. polium* ont eu une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-négative et Gram-positive. En effet, l'huile essentielle de *T. polium* a été testée contre cinq bactéries (trois Gram⁺ et deux Gram⁻) et trois champignons, à différentes concentrations. Les résultats ont montré cette huile présente des effets sur *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, avec des concentrations minimales inhibitrices de 3 à 5 µl/ml (Belmekki et al., 2013). Dans une autre étude, Sevindik et ses collaborateurs (2016) ont déterminé l'activité antibactérienne et la composition chimique des huiles essentielles de *T. polium*. Ils ont montré que cette plante possède un effet inhibiteur sur des micro-organismes résistants, y compris *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ainsi que sur différentes souches de collection telles que l'ATCC 6538 (*S. aureus*), le Q157:H7 (*Escherichia coli*) et le CCM 99 (*Bacillus cereus*). Ces études ont démontré que les huiles de cette plante possèdent une activité antibactérienne relativement bonne et qu'elles peuvent-être utilisées comme source de composés antiseptiques à des fins médicinales.

2.4.4.6 Activité hépatoprotectrice

Dans une étude réalisée par Panovska et al. (2007), l'activité hépatoprotectrice de l'extrait d'acétate d'éthyle de *T. polium* a été étudiée sur des rats présentant des lésions hépatiques induites par le CCl₄. Les résultats ont montré que l'administration de l'extrait de *T. polium* à une dose de 25mg/kg a significativement augmenté l'activité de la SOD et la teneur en GSH sérique. L'examen histologique a montré une restauration significative de l'état histomorphologique des cellules hépatiques. Une autre étude a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle à la dose de 0,5 g de poudre de feuilles/kg de poids corporel/jour était capable de prévenir l'incidence de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) (Amini et al., 2009) induite chez des rats mâles par des régimes déficients en méthionine/choline (MCD). L'extrait de *T. polium* a non seulement empêché le développement de la NASH, mais a également diminué les taux sériques des enzymes hépatiques telles que la phosphatase alcaline (ALP), l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT) à 51 %, 50 % et 30 %, respectivement. En outre, les activités des enzymes hépatiques SOD, GPx et le glutathion réductase (GR) du foie ont également été augmentées de 118 %, 88 % et 67 %, respectivement. Les résultats des analyses Western blot et de la PCR en temps réel ont montré que les niveaux

de facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) et de facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), deux des cytokines impliquées dans les lésions hépatiques, ont nettement diminué chez les rats traités avec l'extrait par rapport au groupe MCD (Amini et Yazdanparast, 2009; Amini et al., 2011).

Les Aflatoxines

3 Les aflatoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par différents champignons, induisant des réponses toxiques appelées mycotoxicoses. Elles affectent les produits agricoles et peuvent être dangereuses pour l'homme et l'animal qui consomment les aliments contaminés (Bouhet et Oswald, 2005).

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires produits par différentes souches de champignons, comme *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, largement présents comme contaminants dans une grande variété de cultures (céréales, oléagineux, fruits à coque et épices) (Marchese et al., 2018).

Les aflatoxines ont été découvertes pour la première fois en Angleterre à la suite d'une épidémie touchant les volailles. Plusieurs centaines de milliers de dindons ont été victimes de ce que l'on appelait alors "Turkey X disease" au cours de l'année 1960 (Blount, 1961). La toxine isolée du champignon contaminant les aliments distribués aux dindons (*Aspergillus flavus*) a été nommée aflatoxine. Le nom est un acronyme formé en combinant la lettre "A" pour *Aspergillus*, "FLA" pour *flavus* et toxine signifiant poison (Rustom, 1997).

3.1 Structure et propriétés physicochimiques des aflatoxines

Il existe près de 20 types d'aflatoxines différents, dont les quatre principaux sont les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ (Figure 5). L'aflatoxine B₁ (AFB₁) et l'aflatoxine B₂ (AFB₂) sont produites par l'*Aspergillus flavus*, tandis que les quatre isoformes (B₁, B₂, G₁, G₂) sont produites par l'*Aspergillus parasiticus* (Bennett et Klich, 2003). Les lettres B et G font référence à la couleur des aflatoxines sous la lumière UV (B pour bleu ; G pour vert), et les indices 1 et 2 font référence à leur position relative sur une plaque de chromatographie en couche mince (Ayub et Sachan, 1997). L'aflatoxine B₁ est la plus toxique des aflatoxines et elle est considérée par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) comme l'hépatocarcinogène naturel le plus puissant (CIRC, 1993). De point de vue physico-chimique, la structure des aflatoxines consiste en noyaux de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB₁ et AFB₂) ou des lactones hexatomiques (AFG₁ et AFG₂) (Ayub et Sachan, 1997).

Les aflatoxines sont des cristaux incolores à jaune pâle, présentant une fluorescence sous la lumière UV. Elles sont très peu solubles dans l'eau (10-20 µg/ml) et très solubles dans les solvants moyennement polaires comme le chloroforme. Ils sont instables à la lumière UV en présence d'oxygène, instables dans des conditions de pH extrême (<3 ou >10). Le cycle lactone s'ouvre dans les conditions alcalines et les aflatoxines sont détruites, mais cette réaction est réversible en cas d'acidification (Vankayalapati, 2018). Elles sont stables et très résistantes

aux différents procédés de transformation alimentaire tels la torréfaction, l'extrusion et la cuisson (Marin et al., 2013).

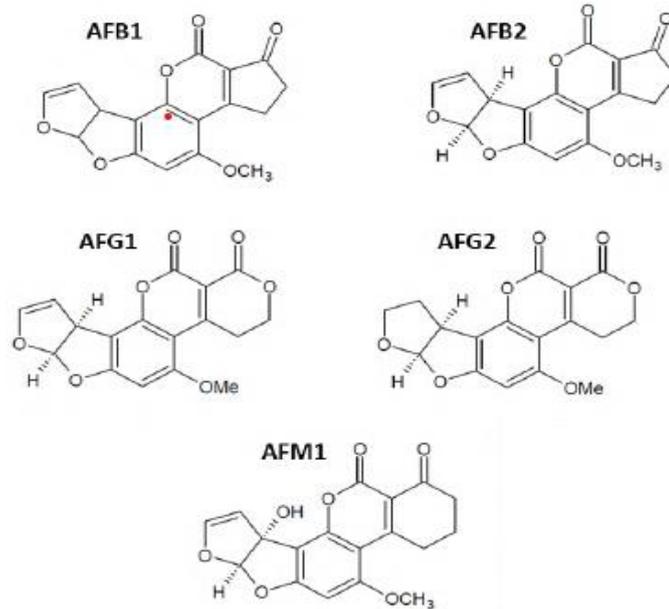


Figure 5: Les principaux types des aflatoxines

Les aflatoxines sont synthétisées à partir d'acétyl-CoA issu du catabolisme de glucose. Elles sont synthétisées au cours de 18 étapes biologiques sous le contrôle d'un énorme groupe de gènes voisins qui s'étalent sur une région d'environ 60-70 kb du chromosome. Cette biosynthèse comporte au moins trois étapes, à savoir la formation du produit primaire, l'hydroxyversicolorone (de la première à la huitième étape), du produit intermédiaire, la versicolorine B (de la neuvième à la douzième étape) et du produit final, l'AFB₁ (de la treizième à la dix-huitième étape). Au cours de la biosynthèse de l'AFB₁, plusieurs enzymes clés, dont le nicotinamide-adénine dinucléotide, la forme réduite du nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate et la 2S-adénosylméthionine, sont nécessaires pour la biosynthèse (Bennett et Klich, 2003; Trail et al., 1995).

3.2 Métabolisme

3.2.1 Toxicité de l'aflatoxine B₁

L'exposition humaine à l'aflatoxine est due à la consommation quotidienne de riz, de maïs, d'arachides, etc. Les AFB₁ présents dans les cultures pénètrent dans le corps humain *via* la chaîne alimentaire et peuvent affecter gravement la santé humaine en provoquant des lésions hépatiques chroniques aboutissant au cancer du foie (Fan et al., 2021).

L'AFB₁ n'a pas d'activité mutagène en soi. Il est principalement métabolisé au niveau du foie pour engendrer plusieurs métabolites tels que l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H₁ et l'AFQ₁ (Do et Choi, 2007). Il existe deux phases de biotransformations :

- Phase 1

Les réactions de phase 1 sont généralement des processus oxydatifs, réducteurs ou hydrolytiques et fournissent une structure chimique nécessaire aux réactions de la phase 2 qui sont généralement des réactions de conjugaison. L'AFB₁ est oxydé par les sous-familles CYP450 et des isoformes spécifiques d'enzymes en plusieurs produits. Un seul d'entre eux, l'époxyde d'AFB₁, semble être mutagène, alors que les autres sont des produits de détoxification. L'époxyde d'AFB₁ putatif est généralement considéré comme la forme électrophile active de l'AFB₁, qui peut attaquer les hétéroatomes nucléophiles d'azote, d'oxygène et de soufre dans les constituants cellulaires (Swenson et al., 1974). L'oxydation de l'AFB₁ extrêmement réactif médiée par le CYP450 en 8,9-époxyde est considérée comme la principale voie de bio activation (phase 1) (Swenson et al., 1977). Cette conversion en époxyde est la phase de réaction qui permet la liaison covalente aux macromolécules cellulaires (l'ADN et/ou les protéines). Cette réaction peut impliquer un certain nombre d'isoenzymes du CYP450, dont les 1A2 et 3A4 (Aoyama et al., 1990). L'AFB₁-8,9-époxyde réagit avec l'atome N⁷ de la guanine pour former un adduit d'ADN pro-mutagène (AF-N⁷-guanine). Les adduits d'ADN sont assez résistants aux processus de réparation de l'ADN, ce qui provoque des mutations génétiques et donc le développement de cancers, en particulier les carcinomes hépatocellulaires (Figure 6) (Wild et al., 2000; Wild et Turner, 2002).

Le CYP450 3A4 joue un rôle majeur dans l'activation de l'AFB₁ en raison de son activité intrinsèque envers ce substrat, et le niveau élevé de cette enzyme est présent dans le foie humain. Le CYP450 1A2 et certains autres CYP450 humains contribuent également dans l'activation de l'AFB₁, mais ils jouent un rôle moindre (Crespi et al., 1990; Ueng et al., 2002). Le CYP450 3A4 forme principalement l'AFB-2,3-époxyde génotoxique, tandis que le CYP450 1A2 forme les deux isomères l'endo-8,9-époxyde non génotoxiques et l'exo-8,9-époxyde (Ueng et al., 2002). Le CYP450 1A2 a une grande affinité pour la bio-activation de l'AFB₁ à de faibles concentrations de substrat après une exposition par voie alimentaire (Wild et Turner, 2002). Certains des intermédiaires de l'AFB₁ subissent un métabolisme beaucoup plus important en phase 2 en se liant au GSH afin de créer le composé polaire et moins toxique qui est simplement excrété dans l'urine et la bile. Cependant, les intermédiaires AFBO et AFB₁-dihydroxyde ont conduit à la cancérogénicité, tandis que l'AFB₂ provoque une toxicité aiguë, une nécrose hépatique et une inhibition des enzymes de métabolisation cellulaire (Dhanasekaran et al., 2011).

- Phase 2

Les réactions de la phase 2 conduisent à la détoxification des aflatoxines impliquent la conjugaison à l'acide glucuronique, au sulfate et au GSH. Les métabolites des AFB de la phase 1 subissent un métabolisme enzymatique de phase 2 par les glutathion-S-transférases (GST) qui catalysent principalement les réactions de conjugaison. Après l'oxydation de phase 1, l'AF peut être facilement conjugué avec des groupes SH (dans les réactions de phase 2), ce qui permet une détoxification et une élimination plus efficace de la toxine. Chez un certain nombre d'espèces de mammifères, l'AFB₁-8,9-époxyde est efficacement conjugué avec le GSH réduit dans une réaction catalysée par la GST (Neal et Green, 1983; Wang et al., 1999).

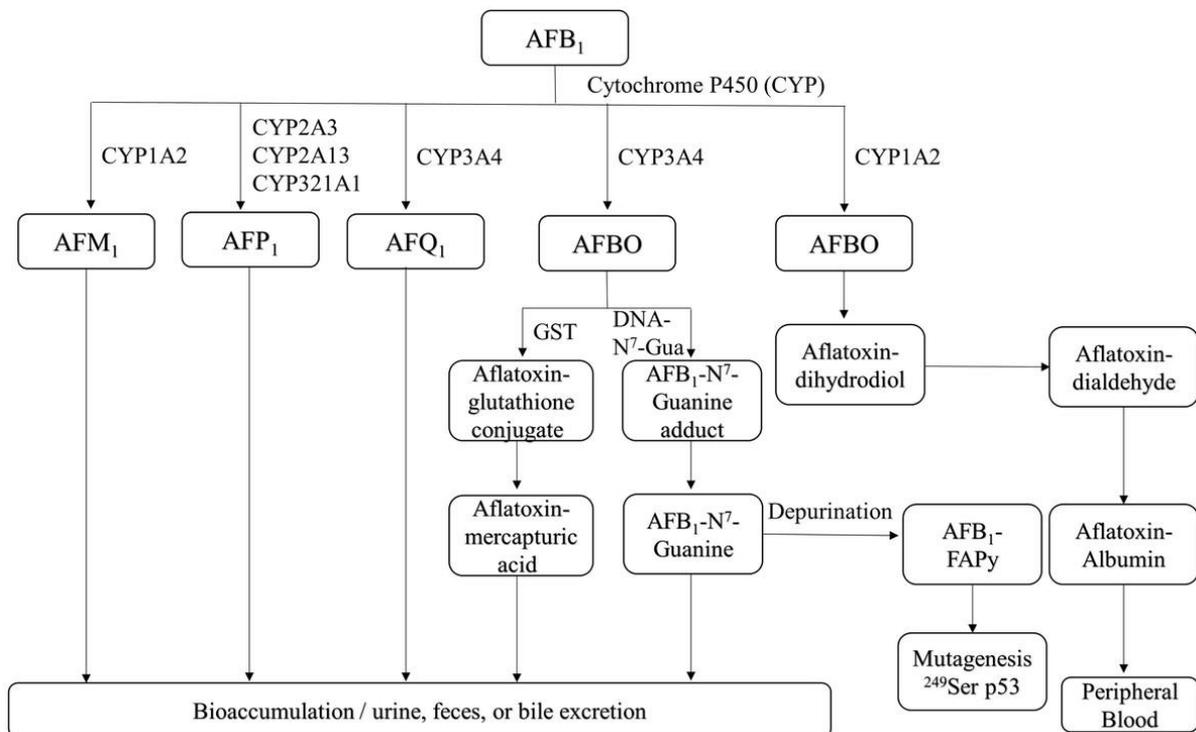


Figure 6: Métabolisme de l'AFB₁ chez l'homme et l'animal par le cytochrome P450

3.2.2 Protection et détoxification de l'AFB₁ par les substances phytochimiques

Contrairement aux médicaments synthétisés chimiquement, les composés phytochimiques présentent une faible toxicité et moins d'effets secondaires, ce qui a poussé de plus en plus les chercheurs à se concentrer sur la prévention et le traitement de la toxicité hépatique par des substances phytochimiques.

Il est rapporté que l'effet des substances phytochimiques sur la toxicité hépatique induite par l'AFB₁ consiste principalement à améliorer les capacités antioxydantes et anti-inflammatoires des tissus hépatiques, et à réguler l'expression des gènes des enzymes détoxifiantes pour atténuer la toxicité hépatique ou prévenir son développement et sa détérioration (Fan et al., 2021).

Plusieurs études ont montré que les flavonols polyhydroxylés tels que la robinétine, la quercétine, la fisétine et la morine inhibent la formation d'adduits d'ADN induits par l'AFB₁ en agissant sur l'activité des enzymes microsomaux du foie (Bhattacharya et Firozi, 1988). Les données cliniques montrent que la silymarine a un bon effet thérapeutique sur les lésions hépatiques toxiques, l'hépatite aiguë et chronique, et la cirrhose du foie. En effet, Rastogi et al. (2001b) ont rapporté que la silymarine (20 mg/kg/jour pendant 14 jours) peut rétablir les niveaux de peroxydes lipidiques et des antioxydants enzymatiques à des niveaux proches des normales chez des rats traités par l'AFB₁ (2 mg/kg/jour) durant 6 semaines de traitement. Elle peut réduire la formation d'AFBO, éliminer les ROS et réparer les membranes cellulaires endommagées pour protéger le foie. La quercétine, un flavonoïde alimentaire, a également un effet similaire. Elle protège le foie en renforçant le système de défense antioxydant des hépatocytes et en inhibant la peroxydation lipidique. Par conséquent, elle fournit une protection contre les dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif (Silva et al., 2008). Cet effet a été démontré sur des cellules HepG2 exposées à l'AFB₁ pendant 2 heures où la quercétine (5 µg/mL) a pu réduire les dommages de l'ADN de 60,56 % à 32,33 % (Barcelos et al., 2011).

Les polyphénols contenus dans les fruits, les légumes et les céréales peuvent réduire efficacement l'incidence des maladies du foie causées par les mycotoxines, notamment l'AFB₁. Les proanthocyanidines de l'extrait de pépins de raisin pourraient améliorer la capacité de réparation de l'ADN *via* la régulation des gènes de réparation des dommages de l'ADN induits par l'AFB₁ pour les cellules de moelle osseuse du rat (Bakheet et al., 2016). Chez les poulets de chair traités par l'AFB₁ (1 mg/kg de poids corporel), la supplémentation alimentaire en proanthocyanidines (250 mg/kg de poids corporel) a amélioré les capacités antioxydantes et réduit significativement la concentration de l'AFB₁ dans le foie, ce qui suggère que ces molécules peuvent inhiber l'absorption de l'AFB₁ dans le système gastro-intestinal ou le foie.

La curcumine (200 mg/kg) dérivée des rhizomes de *Curcuma longa* L. prévient les lésions oxydatives du foie causés par l'AFB₁ (25 µg/kg) en ajustant les niveaux des marqueurs enzymatiques sériques et en inhibant la peroxydation lipidique chez les rats adultes (El-Agamy, 2010). Muhammad et al., (2018) ont prouvé que la curcumine est un excellent antidote pour réguler l'autophagie des hépatocytes, et le supplément de curcumine dans le régime alimentaire

des poulets de chair (450 mg/kg d'aliments) peut leur fournir une résistance efficace à l'inflammation induite par l'AFB₁ (5 mg/kg d'aliments).

Matériel et méthodes

1 Matériel et méthodes

1.1 Matériel végétal

La récolte de la partie aérienne de *Teucrium polium* a été effectuée pendant le mois de Juin 2019 dans la région de Amoucha (Wilaya de Sétif, 36.346135, 5.427050). L'identification a été faite par Pr. Laouer Hocine, Laboratoire de valorisation des substances naturelles, Université de Sétif 1. La partie aérienne de la plante utilisée dans les expériences a subi un nettoyage et un lavage à l'eau pour éliminer toutes les traces de poussière puis séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré et à température ambiante. La plante sèche est broyée à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées afin de pouvoir récupérer une poudre fine et homogène. La poudre obtenue a été ensuite conservée hermétiquement dans des récipients en verre et stockée à l'abri de la lumière pour des prochaines utilisations.

1.2 Préparation des extraits

Les extraits de *Teucrium polium* ont été préparés selon la méthode décrite par (Contini et al., 2008) avec une légère modification. 50 g de poudre des feuilles de *Teucrium polium* ont été délipidés deux fois dans 400 ml de l'hexane pendant 2 heures afin d'éliminer les lipides, suivi par une filtration. Le résidu dégraissé a été ensuite extrait avec de l'eau ou du méthanol ou de l'éthanol à (80 %) sous agitation constante pendant une nuit à température ambiante. Les extraits aqueux et hydroalcoolique sont ensuite filtrés sur verre fritté après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes. Les résidus récupérés ont subi une seconde extraction dans les mêmes conditions pendant 4 heures et le filtrat a été récupéré après centrifugation et filtration. Les deux filtrats ont été mélangés et le solvant a été évaporé à l'étuve à 40 °C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec.

2 Méthodes

2.1 Détermination de la teneur en des polyphénols totaux

L'évaluation des teneurs en polyphénols totaux des extraits de *Teucrium polium* a été effectué selon la méthode décrite par (Siddiqui et al., 2017), en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est formé d'acide phosphomolybdique $H_3PMO_{12}O_{40}$ et d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ qui est réduit par l'oxydation des phénols en oxyde bleu de tungstène W_8O_{23} et de molybdène Mo_8O_3 . La coloration bleu produite possède une absorption maximale aux environs de 765 nm. Un volume de 200 μ l de l'extrait est mélangé avec 1 ml du réactif de Folin–Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0,8 ml de carbonate de sodium

à 7,5% (Na₂CO₃). L'ensemble est laissé réagir à température ambiante pendant 1h et demi et la lecture est faite à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc. La quantité des polyphénols totaux contenue dans l'extrait est calculée à partir de l'équation de régression $y = 0.0096x + 0.0272$ ($R^2 = 0.99$) (Figure 7) et exprimée en microgramme d'équivalent acide gallique par milligramme de l'extrait.

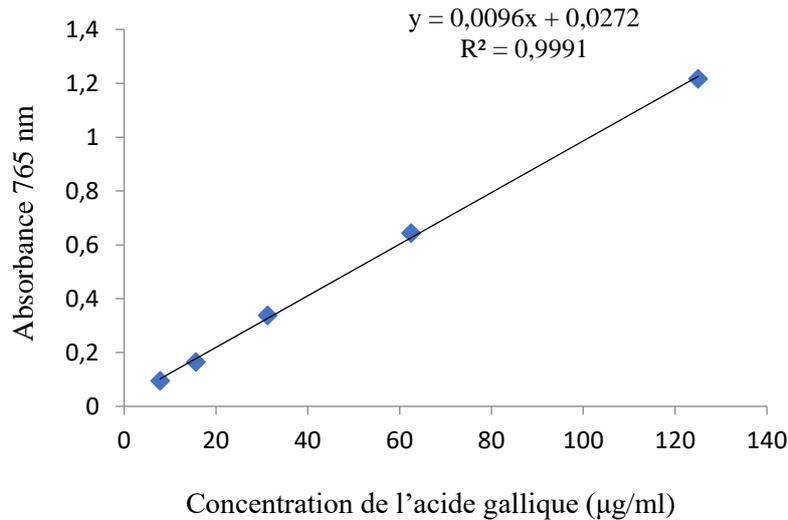


Figure 7: Droite d'étalonnage de l'acide gallique

2.2 Détermination de la teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits étudiés a été effectuée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Djeridane et al., 2006). L'AlCl₃ forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes OH des phénols. Ce complexe jaune absorbe la lumière (visible) à une longueur d'onde de 430 nm. Un standard d'étalonnage a été préparé en utilisant des solutions de rutine préparées dans le méthanol à différentes concentrations. Pratiquement 1 ml de solution d'AlCl₃ (2%) préparé dans le méthanol est ajouté à 1 ml de la solution d'échantillon ou du standard (Rutine). Le mélange est incubé pendant 10 min puis la lecture est effectuée à 430 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait est exprimée en µg d'équivalent rutine par mg de l'extrait (µg EqR/mg de l'extrait) qui a été déduit de l'équation de régression $y = 0.0161 + 0.006x$ ($R^2 = 0.999$) (Figure 8).

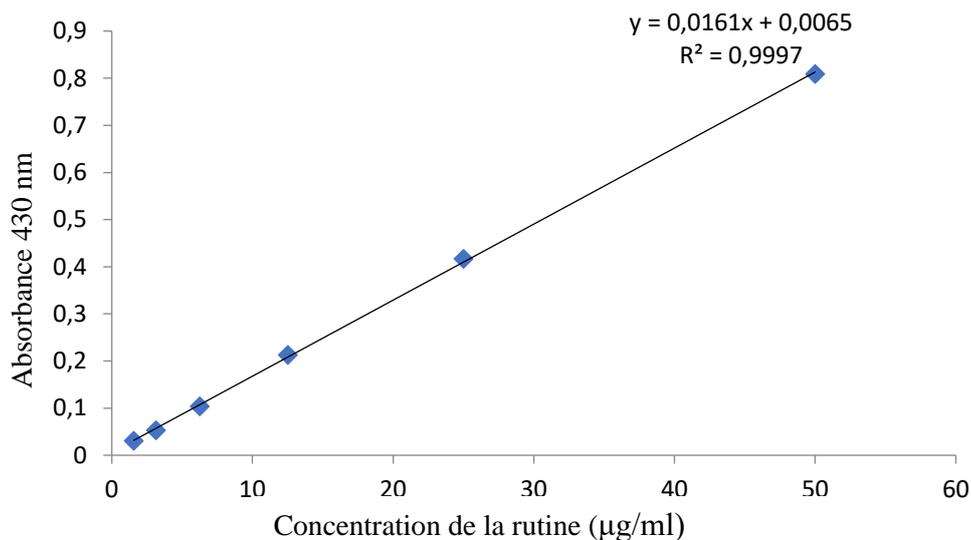


Figure 8: Droite d'étalonnage de la rutine

2.3 Analyse des polyphénols d'extraits de *T. polium* par HPLC

La composition en polyphénols de différents extraits de *Teucrium polium* a été déterminée par HPLC (Agilent série 1260). L'analyse a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 (4,6 mm id × 250 mm, 5 µm) par injection d'un volume de 10 µl puis une élution en gradient a été réalisée en faisant varier la proportion de solvant A (eau) et de solvant B (0,02% trifluoro - acide acétique dans l'acétonitrile), à un débit de 1 ml/min. Le gradient de solvant était le suivant : 0-5 min 80 % A ; 8-12 min 50% A; 12-16 min 80% A et les fractions d'élution ont été contrôlées par un détecteur UV à 280 nm. Toutes les séparations ont été effectuées à 35 °C.

2.4 Evaluation de l'activité antioxydante *In vitro*

2.4.1 Activité de piégeage du radical DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picryldrazyl (DPPH) est un radical libre stable. Cette stabilité est due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. La délocalisation des électrons donne également lieu à la couleur violette profonde, caractérisée par une bande d'absorption de la solution de DPPH à environ 517 nm. La réduction des radicaux DPPH[•] par des agents antioxydants entraîne une décoloration de la solution. Afin d'évaluer le potentiel antioxydant à travers piégeage du radical DPPH par les extraits étudiés, le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie.

L'activité de piégeage du DPPH a été mesurée comme décrit par (Sánchez-Moreno et al., 1998). Tout d'abord, des solutions des extraits à différentes concentrations ont été préparées dans du méthanol (5-200 mg/ml), puis, 50 µl de chaque extrait ont été ajoutés à 1950 µl de

solution méthanolique de DPPH (0,2 mM). Le mélange a été agité et incubé pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante et l'absorbance des solutions a été lue à 517 nm. Du méthanol a été utilisé à la place de l'échantillon pour obtenir l'absorbance du contrôle. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme antioxydants standards à des fins de comparaison. L'activité de piégeage de radical pour chaque extrait a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Activité de piégeage de DPPH (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

Où A_0 est l'absorbance du contrôle et A_1 est l'absorbance de l'échantillon, et l'effet de piégeage a été estimée par la concentration inhibitrice à 50 % (CI_{50}) qui a été déduite de la courbe d'inhibition.

2.4.2 Test de l'ABTS

L'activité antiradicalaire a été également évaluée par le test de décoloration du radical cation ABTS^{•+} selon la technique utilisée par (Re et al., 1999). L'ABTS a été dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM. La solution du radical cation ABTS^{•+} a été préparée en mélangeant à volumes égaux la solution mère d'ABTS à une concentration de 7 mM avec une solution de persulfate de potassium à 2,45 mM. Le mélange réactionnel est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 18 h à température ambiante. Ensuite, 160 µl de la solution d'ABTS^{•+} a été mélangé avec 40 µl d'extrait ou de la référence (BHT et BHA) à différentes concentrations. Après une incubation de 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon} / A \text{ contrôle}] \times 100$$

2.4.3 Evaluation du pouvoir réducteur

Le dosage de pouvoir réducteur mesure la capacité d'un antioxydant à donner des électrons. La présence des réducteurs provoque la conversion du complexe Fe^{3+} /ferricyanure à la forme ferreuse qui sert d'important indicateur de leur capacité antioxydante.

Le pouvoir réducteur des extraits de *T. polium* a été évalué selon (chung et al., 2005). Pour cela, 0,5 ml de solution de l'extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 1,25 ml de tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1,25 ml de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange a été ensuite incubé pendant 30 min à 50 °C et 5 ml d'acide trichloracétique (1%) ont été ajoutés pour arrêter la réaction avant de centrifuger le mélange pendant 10 min à 3000 tr/min. Un volume de 1,25 ml de la solution surnageante a été mélangé avec 1,25 ml de l'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ (0,1%) et l'absorbance a été lue à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

2.4.4 Test de CUPRAC

La méthode CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc) et cuivre (Cu_{2+}). En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre–néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm (Apak et al., 2004).

La capacité antioxydante via ce test a été évaluée selon la méthode décrite par Apak et al. (2004). En bref, dans une plaque à fond rond de 96 puits, 40 μl des dilutions de différents extraits avec 50 μl de la solution CuCl_2 (10 mM) ont été ajoutés puis, dans chaque puits, 50 μl de la solution de néocuproïne (7,5 mM) et 60 μl de tampon NH_4Ac (1 M, pH 7,0) ont été ajoutées. L'absorbance a été mesurée après 60 min à 450.

2.5 Cytotoxicité de l'extrait contre les cellules cancéreuses du sein MCF-7

La cytotoxicité des différents extraits a été déterminée par la méthode conventionnelle basée sur le test de réduction du MTT (Ginouves et al., 2014). Des cellules de cancer du sein MCF-7 (obtenues auprès de l'ATCC via Holding Company for Biologiques Produits and Vaccins, VACSERA, Le Caire, Egypte) ont été cultivées dans des plaques de 96 puits à une densité de 10^4 cellules/puits dans un volume final de 100 μl de suspension cellulaire (RPMI additionné de 10 % de FBS, 100 unités/ml de pénicilline et 100 mg/ml de solution de streptomycine). Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 48h sous 5% de CO_2 dans un incubateur, puis le surnageant a été prélevé et les cellules ont été traitées par les extraits de *T. polium* à différentes concentrations (1,5 - 100 $\mu\text{g/ml}$) pendant 48 h. Ensuite, 20 μl de solution de MTT dans le DMSO (5 mg/ml) ont été ajoutés dans chaque puits et une incubation supplémentaire de 4 h a été réalisée. La solution de MTT a été ensuite séparée, et 100 μl de DMSO sont ajoutés dans chaque puits pour dissoudre le formazan violet formé. L'absorbance de la solution obtenue a été mesurée à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaques (EXL 800, USA). La moyenne d'absorbance pour chaque extrait a été calculée, puis le pourcentage de viabilité des cellules est calculé comme suit :

$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{absorbance moyenne de l'échantillon traité}}{\text{absorbance moyenne de l'échantillon de contrôle}} \times 100$

Le contrôle est constitué des cultures non traitées contenant seulement des cellules dans le milieu. Le pouvoir d'inhibition des extraits contre les cellules cancéreuses du sein MCF-7 a

été évalué par l'IC₅₀ et comparé à la doxorubicine en tant qu'un médicament anticancéreux standard.

2.6 Effet protecteur de l'extrait méthanolique contre la toxicité induite par l'aflatoxine B₁

Des rats mâles Sprague Dawley pesant 150-160 g proviennent de Animal House Colony, National Research Centre, Dokki, Giza, Egypte, sont utilisés dans nos expériences. Les animaux ont été soumis à un régime alimentaire standard de laboratoire composé de : saccharose (30 %) ; caséines (16 %) ; amidon (35 %) ; l'huile d'arachide (10%) ; fibres (5%) p/p, achetés auprès de Meladco Feed Co., Auhor City, Le Caire, Égypte. Les animaux sont logés dans des cages en polycarbonate à couvercle filtrant dans une pièce exempte de toute source de contamination, avec un cycle photopériodique artificiel (obscurité/lumière 12h). La température et l'humidité dans le laboratoire sont $25 \pm 1^\circ\text{C}$. et $(50 \pm 5\%)$, respectivement.

Tous les animaux ont reçu des soins sans cruauté conformément aux directives du Comité pour le soin et l'utilisation des animaux du Center Nationale de Recherche.

Avant de commencer les expériences, soixante rats ont été divisés en six groupes (10 rats/groupe) et ont été maintenus à leur alimentation respective pendant 2 semaines comme suit:

Groupe 1 : Animaux témoins non traités qui se sont nourris avec un régime de base et de l'eau.

Groupe 2 : Groupe des animaux traités avec la dose de 50 mg/kg de l'extrait administré par voie orale.

Groupe 3 : Groupe des animaux traités avec la dose de 100 mg/kg de l'extrait administré par voie orale.

Groupe 4 : Groupe des animaux traités avec l'aflatoxine B₁ (80 µg/kg) quotidiennement par voie orale.

Groupe 5 : Groupe des animaux traités avec l'aflatoxine B₁ et l'extrait à 50 mg/kg quotidiennement par voie orale.

Groupe 6 : Groupe des animaux traités avec l'aflatoxine B₁ et l'extrait à 100 mg/kg quotidiennement par voie orale.

2.6.1 Dosage des paramètres biochimiques

Le sérum du sang recueilli dans les tubes secs a été utilisé pour le dosage des marqueurs biochimiques de certains organes vitaux (foie et reins). Les paramètres du profile lipidique ont été mesurés (taux de cholestérol, de triglycérides, de HDL et de LDL) selon la

procédure standard en utilisant l'analyseur clinique pictus 200 Random Access (Diatron). Les taux de l'IL-6, de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) de l'AFP et de TNF- α ont été déterminés selon les instructions du fabricant.

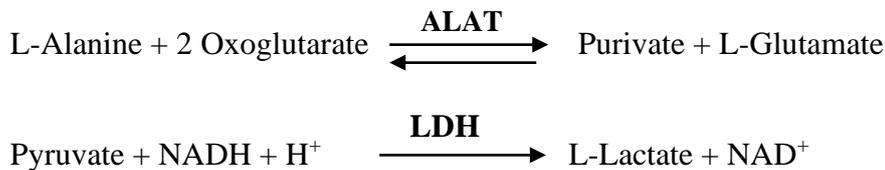
2.6.1.1 Dosage des marqueurs sériques du foie

L'alanine aminotransférase (ALAT) et l'aspartate aminotransférase (ASAT) sont des enzymes présentes principalement dans le foie, mais également dans les globules rouges, les cellules cardiaques, les tissus musculaires et d'autres organes, comme le pancréas et les reins.

Les niveaux d'ALAT et d'ASAT peuvent être utilisés en association avec d'autres enzymes pour surveiller l'évolution de divers troubles hépatiques. Les concentrations normales dans le sang sont de 5 à 35 U.l⁻¹ pour l'ALAT et de 5 à 40 U.l⁻¹ pour l'ASAT. Cependant, l'augmentation de leurs taux dans le sang témoigne d'une lésion cellulaire, le plus souvent dans le foie, parfois dans le cœur, les muscles ou les reins. Par conséquent, la quantité de l'ALAT et celle de l'ASAT dans le sang reflète la gravité des dégâts (Huang et al., 2006).

a) Dosage de l'activité de l'Alanine Aminotransférase l'ALAT

La série des réactions impliquées dans le système de dosage est la suivante :



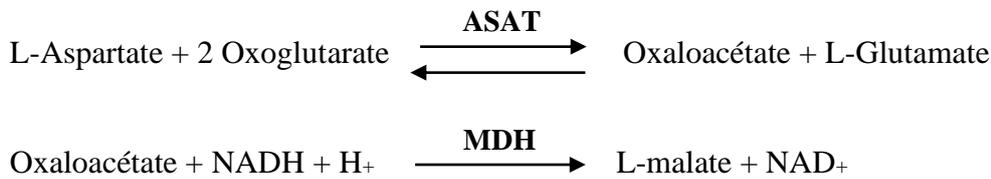
Le groupe amine est transféré par l'ALAT présent dans l'échantillon à partir de l'alanine vers l'atome de carbone du 2-oxoglutarate en produisant le pyruvate et du L-glutamate. Le pyruvate est réduit en lactate par le LDH présent dans le réactif avec oxydation simultanée du NADH en NAD⁺. La réaction est suivie en mesurant la diminution de l'absorbance due à l'oxydation du NADH en NAD⁺. Cette diminution est proportionnelle à l'activité de l'ALAT.

Dans un volume de 0,5 ml de de réactif I contenant du tampon phosphate (pH 7.4, 100 mM), du L-alanine (200 mM), de l' α -cetoglutarate (2 mM), est ajouté un volume de 0,1 ml de produit à doser (contrôle ou échantillon). Après agitation et incubation pendant 30 min à 37°, un volume de 0,5 ml de réactif coloré II (2,4-dinitrophénylhydrazine 2 mmol/l) a été ensuite ajouté et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 20 min avant l'ajout de 5 ml de NaOH.

Cinq minutes plus tard, La densité optique du produit coloré a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 546 nm contre un blanc d'eau distillée.

b) Dosage de l'activité de l'Aspartate Aminotransférase (ASAT)

Cette méthode repose sur le principe selon le schéma réactionnel suivant :



La détermination de l'activité de l'AST sérique a été effectuée à l'aide d'un kit de réactifs selon la méthode décrite par Reitman et Frankel (1957). Un volume de 0,5 ml de réactif I [tampon phosphate (100mM, pH 7,4), L-aspartate (100 mM), α -oxoglutarate (2mM)] a été incubé pendant 30 min à 37°C après l'ajout de 0,1 ml de sérum. Un volume de 0,5 ml de réactif II coloré [2,4-dinitrophénylhydrazine (2 mM)] a été ensuite ajouté, mélangé et laissé reposer à température ambiante pendant 20 min avant d'ajouter 5 ml de NaOH. Cinq minutes plus tard, la couleur développée a été mesurée à 546 nm contre un blanc d'eau distillée.

2.6.1.2 Dosage des marqueurs sériques des reins

a) Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine est fait par la méthode colorimétrique ou réaction de Jaffé (Fabinyet Ertingshausen, 1971; Labbé et al., 1996).

En effet, en milieu alcalin, la créatinine donne avec l'acide picrique un complexe coloré rouge orangé. La vitesse de développement de la coloration est proportionnelle à la concentration de la créatinine qui est mesurable au spectrophotomètre à une longueur d'onde λ égale à 495 nm. Ainsi, Des volumes égaux de 0,5 ml d'acide picrique (25 mM) et de d'hydroxyde de sodium (4 mmol/L) est incubé à 37°C. Ensuite 0,1 ml de produit à doser (étalon ou échantillon) est ajouté. Le mélange est agité, et après 30 et 120 secondes, les absorbances respectives A1 et A2 du standard (20 mg/l (177 μ mol/L) et de l'échantillon sont obtenues à 495 contre de l'eau déminéralisée. Le taux de la créatinine a été calculée comme suit :

$$\text{Concentration de la créatinine en mg/l} = \frac{(A2 - A1) \text{ Echantillon}}{(A2 - A1) \text{ Etalon}} \times \text{concentration de l'étalon}$$

$$\text{Concentration étalon de créatinine} = 20 \text{ mg/l}$$

b) Dosage de l'urée

L'urée est une des molécules permettant d'éliminer l'azote en excès dans l'organisme. L'uréogénèse a lieu exclusivement dans le foie lors du catabolisme des acides aminés. Lors d'une insuffisance rénale, l'urémie augmente et l'azoturie (urée urinaire) diminue. Cependant, cette augmentation de l'urée sanguine révèle indirectement un dysfonctionnement rénal car

l'urée est un indicateur peu spécifique puisqu'elle dépend aussi de l'ingestion de protéines, source d'acides aminés, et du fonctionnement hépatique (Gowda et al., 2010).

La méthode de dosage de l'urée selon (Fawcett et Scott, 1960) repose sur l'hydrolyse de l'urée en anhydride carbonique et ammoniacque par l'uréase. Les ions ammoniums forment avec le salicylate, le chlore et le nitroprussiate un complexe coloré bleu-vert appelé Indophénol. L'intensité de la coloration qui est proportionnelle à la concentration de l'urée, est mesurable au spectrophotomètre à une longueur d'onde λ égale à 600 nm.

0,5 ml de réactif A contenant du salicylate de sodium (60 mmol/l), du nitroprussiate de sodium (5,2 mmol/l), du tampon phosphate pH 6,7 (60 mmol/l) de l'EDTA (1.5 mmol) et de l'uréase (>5000 UI/ml), additionné de 0,5 ml de réactif B contenant de l'hypochlorite de sodium (18 mmol/l) et de l'hydroxyde de sodium (450 mmol/l) sont mélangés pour constituer le milieu réactionnel (1 ml). A ce milieu, 10 μ l de sérum à doser (étalon ou échantillons) sont ajoutés. Après agitation et incubation à température ambiante (16 à 25°C) pendant 5 min, la l'absorbance du produit à doser est lue en comparaison avec le blanc au spectrophotomètre à une longueur d'onde λ égale à 600 nm.

La concentration de l'urée a été calculée comme suit :

$$\text{Concentration de l'urée en g/l} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration Etalon}$$

- Concentration étalon de l'urée = 0,5 g/l

c) Détermination de la concentration de l'acide urique

Lors de ce test, l'uricase agit sur l'acide urique pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone et du peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène réagit avec un chromogène (dichloro-hydroxybenzène sulfonate et amino-antipyrine) pour former une quinonéimine, complexe de couleur rouge. L'absorbance mesurée à 520 nm est proportionnelle à la quantité d'acide urique dans l'échantillon.

Avant l'essai, mélanger des volumes égaux de réactifs 1 et 2. Réactif 1: Tampon chromogène (25 ml), Tampon Tris (50 mM) et 3,5, Dichloro 2-hydroxybenzensulfonate (5 mM) et réactif 2: (Un tensioactif, Uricase > 500 UI/L, Peroxydase > 2000 U/L, 4- Aminoantipyrine 0,20 mM). Un volume de 1 ml de réactif de travail a été mélangé avec 50 μ l d'échantillon ou d'étalon (6 mg/dl) et incubé pendant 10 min à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 520 nm contre le blanc. La concentration de l'acide urique a été calculée comme suit :

$$\text{Concentration de l'acide urique} \frac{\text{g}}{\text{l}} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times \text{Concentration Etalon}$$

d) Dosage des protéines totales

La concentration de protéines totales dans le sang humain est un paramètre biochimique couramment utilisé pour le diagnostic de nombreuses maladies. En effet, dans diverses pathologies, une diminution (hypoprotéïnémie) ou une augmentation (hyperprotéïnémie) de la concentration totale de protéines dans le sang est observée (Buzanovskii, 2017).

La détermination du taux de protéines totales a été réalisée en ajoutant 1 ml d'une solution composée de (NaOH à 0,47 M, Iodure de potassium à 23,3 mM, sulfate de cuivre (II) à 6,5 mM et de sodium-potassium tartrate à 22,1 mM) à 0,02 ml de l'échantillon ou de l'étalon (50 g/l) avant d'incuber le mélange pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance a été déterminée à 540 nm contre le blanc. La concentration de protéines a été calculée comme suit :

$$\text{Concentration de protéines (g/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times 5$$

e) Dosage de l'albumine

L'albumine est connue pour sa capacité à lier de nombreux types de composés organiques, y compris les colorants organiques. Lorsque l'albumine se lie au vert de bromocrésol (BCG), elle provoque une modification de l'absorbance maximale du BCG. Ce changement peut être mesuré par spectrophotométrie et utilisé pour déterminer la concentration d'albumine (Doumas et al., 1971).

Le taux de l'albumine a été mesuré à une longueur d'onde de 630 nm. Afin de mesurer le taux de l'albumine, 0,01 ml de l'échantillon ou de l'étalon sont ajoutés à 2,5 ml de réactif (Tampon succinate pH=4,2 à 50 mM et vert de bromocrésol à 0,75 g/L). Les absorbances de l'échantillon et de l'étalon à 50 g/L sont lues à une longueur d'onde de 630 nm contre le blanc. La concentration de l'albumine a été calculée comme suit :

$$\text{Concentration de l'albumine (g/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times 5$$

2.6.1.3 Le profil lipidique

a) Dosage de cholestérol

Dans ce dosage, l'étalon, l'échantillons et le blanc de cholestérol ont été dissous dans de l'isopropanol : NP40 (9:1, v:v) et traités de la même manière.

Au début, le cholestérol estérifié est hydrolysé en cholestérol libre par le cholestérol estérase. Le cholestérol libre est ensuite oxydé en cholest-4-en-3-one par la cholestérol oxydase avec libération de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier oxyde l' amino-4-antipyrine, en

présence de phénol et de peroxydase en une quinone imine colorée dont l'intensité de la coloration évaluée à 510 nm est proportionnelle à la quantité de cholestérol (Li et al., 2019).

Dans une plaque de 96 puits, 10 µl d'une solution de catalase à 100 U/ml ont été mis dans chaque puits et 40 µL de l'échantillon ont été ajoutés suivis d'une incubation de 15 min à 37°C. 150 µl de réactif A (tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,25 M, acide cholique 5 mM, Triton X-100 0,1 %, cholestérol oxydase 0,3 U/ml, HRP 1,3 U/ml et ADHP 0,4 mM) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée à 37°C pendant 15 min supplémentaires et la fluorescence a été lue à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 580 nm. La masse de cholestérol dans l'échantillon a été déterminée par régression linéaire en utilisant l'émission de fluorescence des blancs et des étalons de cholestérol (plage de 20 à 800 ng) (Robinet et al., 2010).

b) Dosage de triglycérides

Cette procédure implique une hydrolyse enzymatique des triglycérides par la lipase en glycérol et en acides gras libres. Le glycérol est alors phosphorylé par l'ATP formant du glycérol-3-phosphate (G-3-P) et de l'ADP dans une réaction catalysée par la glycérol kinase (GK). Le G-3-P est ensuite oxydé par la glycérol phosphate oxydase (GPO) en phosphate de dihydroxyacétone (DAP) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier est mesuré comme décrit pour le cholestérol.

Dans ce dosage, 1 ml de réactif de travail contenant [le p-Chlorophénol, la Lipoprotéine lipase (LPL), la Glycérol kinase (GK), la Glycérol-3-oxydase (GPO), la Peroxydase (POD) et du 4- Aminophénazone (4-AF) ATP] est mélangé avec 10 µl de l'échantillon ou du standard et incubé pendant 10 min à température ambiante. Finalement, les absorbances du standard et de l'échantillon sont lues en comparaison avec le blanc (Bucolo et David, 1973).

La concentration de triglycérides est calculée comme suite :

$$\text{Concentration de triglycérides (mg/dl)} = \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs Etalon}} \times 200(\text{conc. standard})$$

c) Dosage de cholestérol- HDL

La mesure du C-HDL passe par la précipitation du bloc LDL et VLDL. Cette méthode met en œuvre l'acide phosphotungstique et l'ion magnésium Mg. Elle implique plusieurs opérations généralement manuelles (prélèvements de l'échantillon et du surnageant après précipitation et centrifugation), de telle sorte que les résultats du C-HDL ne sont habituellement obtenus que le lendemain du prélèvement (Lopes-Virella et al., 1977).

500 µl de réactif A [Phosphotungstate (0,4 mmol/L) et Chlorure de magnésium (20 mmol/L)] sont ajoutés à 200 µl de sérum. Le mélange est agité 30 secondes au Vortex puis

laissé au repos pendant 10 minutes à température ambiante. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 minutes à 4000 rpm. Un volume de 100 µl de surnageant limpide a été ajouté à 1 ml de réactif B (réactif colorant et incubé à 37°C pendant 10 min).

Les absorbances de l'échantillon et du standard HDL (HDL-C) ont été lues à 500 nm contre un blanc contenant 100 µl d'eau distillée et 1 ml de réactif B et la concentration de HDL-C a été calculée suivant la relation :

$$\text{Concentration de HDL-cholestérol sérique (mg/dl)} = \frac{\text{A Ech}}{\text{Abs Et}} \times \text{conc. standard} \times \text{facteur de dilution}$$

d) Dosage de cholestérol- LDL

Le taux de cholestérol- HDL (mg/dl) peut être calculé à partir de la concentration du C-HDL et des triglycérides (TG) par la formule de FRIEDEWALD (Friedewald et al., 1972) :

$$\text{Chol LDL} = \text{Chol total} - \text{HDL Chol} - \text{TG}/5$$

2.6.1.4 Détermination de taux de TNF alpha

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), un membre de la superfamille des cytokines TNF/TNFR. Il est associé à l'inflammation chronique et au développement du cancer. L'expression du TNF-α dans le microenvironnement tumoral favorise l'invasion, la migration et les métastases des cellules tumorales dans le cas de plusieurs cancers (Salvatore et al., 2016).

Dans ce test, un anticorps monoclonal spécifique du TNF-α a été pré-revêtu dans les puits d'une microplaque de 96 puits. Les échantillons et les étalons sont ensuite ajoutés à ces puits et toute molécule de TNF-α présente dans l'échantillon se lie à l'anticorps immobilisé. Après l'incubation, les échantillons non liés sont retirés lors d'une étape de lavage, puis un anticorps biotinylé de détection spécifique du TNF-α est ajouté aux puits et se lie à la combinaison anticorps de capture-TNF-α dans l'échantillon. Après un deuxième lavage qui vise à éliminer toute combinaison non liée, la streptavidine conjuguée à la HRP est ajoutée aux puits. Après les étapes d'incubation et de lavage, une solution de substrat TMB est ajoutée aux puits et une couleur se développe. L'intensité de cette couleur est directement proportionnelle à la concentration de TNF-α présente dans l'échantillon. La solution d'arrêt change la couleur du bleu au jaune et l'intensité de la couleur est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur ELISA.

2.6.1.5 Dosage de l'interleukine 6

Dans ce dosage, l'ELISA en sandwich qui permet de détecter un échantillon d'antigène dans un sérum a été utilisée. Un anticorps monoclonal spécifique de l'IL-6 a été pré-fixé sur une microplaque. 100 µl d'échantillon ou d'étalon sont ajoutés dans les puits et incubés pendant 2h et 30min à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. 100 µl d'anticorps biotinés sont ajoutés

dans chaque puits et incubés pendant 1h à température ambiante suivi par un lavage qui élimine les anticorps non liés. 100 µl de solution de streptavidine sont ajoutés et incubés durant 45 minutes à température ambiante avant d'ajouter 100 µl de réactif de substrat TMB dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, 50 µl de solution d'arrêt sont ajoutés dans chaque puits et la lecture est immédiatement effectuée à 450 nm.

2.6.1.6 Dosage des marqueurs tumoraux

a) Taux de l'Antigène Carcino-Embryonnaire (CEA)

L'estimation du taux de CEA a été réalisée en ajoutant 100 µl de l'échantillon ou de standard dans les puits qui ont été ensuite incubés pendant 2h et 30 min à température ambiante ou pendant toute la nuit à 4°C avec une légère agitation. La solution a été jetée et lavée 4 fois avec la solution de lavage et après le dernier lavage, tout le tampon de lavage restant a été éliminé par aspiration ou décantation. Ensuite, 100 µl d'anticorps de détection biotinylé ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 1 heure à température ambiante avec une légère agitation puis la solution a été jetée. 100 µl de solution de streptavidine ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 45 minutes à température ambiante en secouant légèrement avant d'éliminer la solution.

Finalement, un volume de 100 µl de TMB a été ajouté à chaque puits et incubé pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité avec une légère agitation. La lecture est immédiatement effectuée à 450 nm après l'ajout de la solution d'arrêt (50 µl).

b) Dosage de l'AFP

L'alpha-fœtoprotéine (AFP) est une protéine naturellement fabriquée par le foie et le sac vitellin d'un bébé en développement. Le taux d'AFP diminue peu après l'accouchement Mais il est absent normalement chez les adultes en santé. Cependant, une augmentation de l'AFP chez une personne peut indiquer la présence du carcinome hépatocellulaire (Galle et al., 2019).

Une méthode immuno-enzymatique a été utilisée pour quantifier le taux de l'AFP. Brièvement, 25 µl du sérum de l'échantillon ou de contrôle ont été ajoutés dans le puits assigné et 100 µl du réactif enzymatique anti-AFP ont été ajoutés. La microplaque a été incubé pendant 60 minutes à température ambiante après une légère agitation. 300 µl de tampon de lavage ont été utilisés deux ou trois fois pour un lavage complet. Ensuite, la solution de substrat (100 µl) a été ajoutés dans les puits et le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 minutes. 50 µl de solution d'arrêt ont été ajoutés à chaque puits suivi d'une légère agitation. Finalement, l'absorbance a été lue à 450 nm dans un lecteur de microplaques.

2.6.1.7 Evaluation du statut oxydatif

a) Par la peroxydation Lipidique

La réaction de dosage du malondialdéhyde, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532 nm, extractible par le butanol. La réaction colorée, observée avec l'acide thiobarbiturique, mesure non seulement le malondialdéhyde préexistant, mais aussi le malondialdéhyde formé par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction (Wang et al., 2022).

La formation de peroxyde lipidique a été déterminée dans l'homogénat du foie et des reins selon les méthodes décrites par (Sato, 1978) et Ohkawa et al. (1979). En bref, 1 ml de TBA (0,67 %) a été ajouté à 200 µl de l'homogénat tissulaire. Le mélange a été incubé dans un bain d'eau bouillante pendant 30 min. La quantité de TBARS formée dans chaque échantillon a été évaluée en mesurant la densité optique du surnageant à 532 nm par rapport à au blanc et les résultats sont exprimés en nmol MDA.g⁻¹ tissu.

b) Par la capacité antioxydante totale (TAC)

Dans ce test, un kit de réactifs a été utilisé pour déterminer la capacité antioxydante totale dans les homogénats de foie et de rein selon la méthode décrite par Koracevic et al. (2001). Le réactif de travail a été préparé en mélangeant un volume égal des réactifs 2 et 3 (Enzyme - Tampon) juste avant le test. Les réactifs 1 (substrat H₂O₂) ont été dilués 1000 fois avant l'utilisation dans l'eau distillée. Ensuite, un volume de 0,5 ml du substrat ont été ajoutés à 20 µl de l'homogénat pour l'échantillon et à 20µl d'eau distillée pour le blanc. Le mélange a été agité par un mélangeur vortex et incubé pendant 10 min à 37°C. 0,5ml du réactif de travail a été ajouté dans les tubes de blanc et de l'échantillon d'homogénat, suivi d'une incubation pendant 5 min à 37°C. Les absorbances du blanc et de l'homogénat ont été lues à 505 nm contre de l'eau distillée en utilisant un spectrophotomètre à double faisceau (UV-150-02, Shimadzu, Japon). La capacité antioxydante totale dans l'homogénat exprimée en nmol/gm de tissu a été calculée suivant formule :

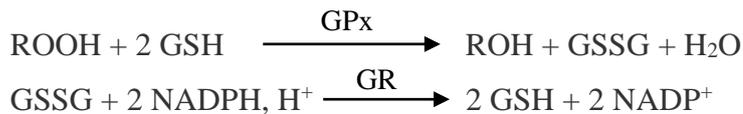
$$\text{Capacité antioxydante totale} = (\text{nmol/gm tissu}) = A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}} \times 3.33$$

c) Par l'activité de glutathion peroxydase

Les glutathion peroxydases constituent l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection. En effet, elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant

la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion (Cubas-Gaona et al., 2020) .

L'activité enzymatique de la GPx a été mesurée selon la méthode de Paglia et Valentine (1967). Elle est déterminée via la formation du glutathion oxydé (GSSG) à partir du glutathion réduit (GSH). Le système nécessite la présence d'un oxydant (cumène-H₂O₂) et de la glutathion réductase (GR) qui réduit le GSSG en oxydant le NADPH en NADP. La diminution de l'absorbance est mesurée à 430nm.



Pour réaliser ce test, 10 µl d'hydroperoxyde de cumène ont été dilués dans 10 mL d'eau distillée et mélangés par agitation vigoureuse. Puis, 0,05 ml de l'échantillon dilué a été mélangé avec 2,5 ml d'un réactif composé de glutathion, de glutathion réductase (GR) et de NADPH et 0.1ml de l'hydroperoxyde de cumène. L'absorbance initiale de l'échantillon et du blanc de réactif ont été lus après une minute et à nouveau après 2 minutes à 340 nm. La valeur du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon. Les résultats ont été exprimés en U /l. selon la formule suivante :

$$\text{Activité de GPx (U/L)} = 8412 \times \Delta A \text{ 340 nm / minute}$$

d) Par l'activité de catalase

La fonction principale de la catalase est la protection contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène (Tehrani et Moosavi-Movahedi, 2018): $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

La catalase réagit avec une quantité connue de H₂O₂ et la réaction est arrêtée après exactement une minute avec inhibiteur de catalase. En présence d'une peroxydase (HRP), le reste de H₂O₂ réagit avec l'acide 3,5-Dichloro -2-hydroxybenzène sulfonique (DHBS) et la 4-aminophénazone (AAP) pour former un chromophore dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la quantité d'eau. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la quantité de catalase dans l'échantillon original.



L'activité de la catalase dans le foie et les reins a été déterminée selon la méthode décrite par (Aebi, 1984) en utilisant un kit commercial. Dans ce test, la solution de H₂O₂ a été diluée 1000 fois juste avant l'utilisation. 50 µl de l'échantillon ou de standard ont été ajoutés à 0,5 ml

du tampon (Tampon phosphate, pH 7,0) et 0,1 ml de la solution diluée de H₂O₂. Le mélange a été incubé pendant 1 min à 25°C puis, 20 µl de 3,5-Dichloro -2-hydroxybenzene acide sulfonique (DHBS) et 50 µl de la solution contenant l'enzyme peroxydase et la 4-Aminoantipyrine ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés pendant 10 min. à 37°C et les absorbances de l'échantillon et de standard ont été lues contre leurs blancs à 510 nm. L'activité de la catalase a été exprimée en U/g de tissu selon la formule :

$$\text{Activité de la catalase U/g} = \frac{\text{A standard} - \text{A échantillon}}{\text{A standard.}} \times \frac{1}{\text{g de tissu utilisé}}$$

2.6.1.8 Evaluation de la génotoxicité

a) Test des micronoyaux (MN)

Le test des MN a été réalisé comme décrit en détail par Diab et al. (2018). Brièvement, les cellules de la moelle osseuse ont été recueillies dans du sérum bovin fœtal (FBS) et étalées sur des lames microscopiques propres. Les frottis ont été fixés dans du méthanol absolu, séchés à l'air, colorés selon May-Grünwald/Giemsa et analysés au microscope optique à un grossissement de 1000×. Les érythrocytes ont été classés comme suit : (1) érythrocytes polychromatiques (PCE) ; et (2) érythrocytes normochromatiques (NCE). Un total de 2000 PCE par animal a été noté pour déterminer la fréquence des érythrocytes polychromatiques micronucléés (MNPCE). Cinq cents érythrocytes ont été notés par animal pour déterminer le rapport de cytotoxicité comme suit : PCE/ (PCE+NCE).

b) Essai d'électrophorèse sur gel monocellulaire (test des comètes)

Le test des comètes a été réalisé comme décrit par Diab et al. (2018). Brièvement, les cellules de moelle osseuse mélangées à 0,8 % d'agarose à bas point de fusion ont été étalées sur des lames entièrement givrées et recouvertes avec de l'agarose à 1 % à l'aide d'un couvre-objet. Les lames ont été trempées dans un tampon de lyse cellulaire (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 10 contenant 1% de Triton X-100 et 10% de DMSO) pendant 2 h à 4°C dans l'obscurité. Les lames ont été maintenues dans un tampon alcalin fraîchement préparé et pré-refroidi (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH>13,0) pendant 20 minutes. Ensuite, les lames ont été soumises à une électrophorèse à 25 V et 300 mA pendant 30 minutes. Les lames ont ensuite été rincées avec un tampon Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) et colorées avec du bromure d'éthidium (20 µg/mL). Finalement, un microscope à fluorescence équipé d'une caméra numérique à un grossissement de 400× a été utilisé pour visualiser les lames. 200 cellules ont été analysées par animal à l'aide du logiciel automatique comet score™ (TriTek Corp, version

2.0.0.0, Sumerduck, VA 22742, États-Unis). Les dommages à l'ADN sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% Tail DNA), le moment de la queue (TM) et l'Olive Tail Moment (OTM).

c) Évaluation de l'expression des gènes hépatiques par qRT-PCR

L'ARN total a été extrait à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les procédures du fabricant. La concentration et la pureté de l'ARN ont été déterminées par le spectrophotomètre NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, États-Unis). L'intégrité de l'ARN a été confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour éliminer toute contamination de l'ADN, un kit de DNase sans RNase (Promega) a été utilisé. L'ARN total (1µg) a été converti en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit PreMix cDNA (iNtRON Biotechnology, Corée). L'ADNc obtenu a été stocké à 20 °C pour une utilisation ultérieure ou directement utilisé comme modèle de PCR semi quantitative. L'expression des gènes sélectionnés a été quantifiée à l'aide de la PCR quantitative en temps réel réalisée par le kit Master Mix SYBR™ Select, comme décrit précédemment (Kim et al., 2009).

Les séquences de l'amorce spécifique des gènes pour la GAPDH, l'interleukine-1 (IL1), l'interleukine-2 (IL2), l'interleukine-6 (IL6), du facteur de nécrose tumorale alpha TNF-α, et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1: Détail des séquences d'amorces pour les gènes amplifiés

ADNc	Numéro d'accession	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille du produit de RT-PCR
GAPDH	NM_017008.4	5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG 3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	496
β-actine	NM_031144	5'-CCACCATGTACCCAGGCATT-3'	5'-CGGACTCATCGTACTCCTGC-3'	189
IL-1β	NM_031512.2	5'-GACCTGTCTTTGAGGCTGAC-3'	5'-TTCATCTCGAAGCCTGCAGTG-3'	330
IL-2	NM_053836.1	5'-AACAGCGCACCCACTTCAA-3'	5'-TTGAGATGATGCTTTGACA-3'	400
IL-6	NM_012589.2	5'-ATCTGCCCTTCAGGAACAGC-3'	5'-AGCCTCCGACTTGTGAAGTG-3'	181
TNF-α	NM_012675.3	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'-ACCACCAGTTGGTTGTCTTTG-3'	256
Nrf2	NM_031789.2	5'-TTGGAGGCAAGACATAG-3'	5'-GGGCAACCTGGGAGTA-3'	251
iNOS	AY211532.1	5'-GGAGCGAGTTGTGGATTG-3'	5'-CCAGGAAGTAGGTGAGGG-3'	134

La PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) a été réalisée sur le système Stratagene Mx3005P Real-Time PCR (Agilent Technologies) dans un volume réactionnel de 20-µL en utilisant, 1 µL d'ADNc, 10 µM d'amorces avant et inverse, 10 µL de TOPreal™qPCR 2× PreMIX (SYBR Green with low ROX) (Enzymomics) et de l'eau sans ADNse. Tous les échantillons ont été amplifiés au minimum en triplicats. L'amplification a été réalisée avec une

dénaturation de 15 minutes à 95 °C, puis 40 cycles de 95 °C pendant 12 s, 56-63 °C pendant 15 s et 72 °C pendant 30 s.

Le niveau d'expression a été calculé à partir du nombre de cycles PCR (C_T) où la courbe de fluorescence accrue passe par une valeur seuil. L'expression relative des gènes cibles a été obtenue en utilisant la méthode comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$). Le ΔC_T a été calculé en soustrayant le C_T de la Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) (contrôle domestique endogène) de celui du gène cible tandis que le $\Delta\Delta C_T$ a été obtenu en soustrayant le ΔC_T du calibrateur de celui de l'échantillon testé. L'expression relative a été calculée à partir de la formule $2^{-\Delta\Delta C_T}$ basée sur la méthode de Livak et Schmittgen (2001) et (Abdel-Wahhab et al., (2020). Examen histologique

2.7 Analyses histologiques

Des échantillons de foie et de rein ont été fixés dans du formol neutre à 10%, déshydratés par une série graduelle d'alcools, nettoyés au xylène et inclus dans de la cire de paraffine. Des coupes de tissus (5 μm) ont été tranchées et colorées par des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine pour un examen microscopique (Bancroft et al., 1996).

2.8 Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD et en moyenne \pm SEM. les résultats des tests sont analysés par le logiciel « GraphPad. Prism Version 8.0 ». La différence entre le contrôle et les différents groupes est déterminée par le test ANOVA suivi du test Dunnett pour la comparaison et la détermination des taux de signification. Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme le niveau minimal de signification.

Résultats et discussion

3 Résultats et discussion

3.1 Evaluation des polyphénols et des flavonoïdes totaux

L'extraction de la partie aérienne de *Teucrium polium* a donné un rendement en extrait sec de 25 %. La teneur en composés phénoliques totaux déterminée à partir de la courbe standard ($y = 0,012x + 0,065$, $r^2 = 0,99$) est exprimée en μg EAG/mg de l'extrait (équivalents d'acide gallique). Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait méthanolique est le plus riche en polyphénols totaux suivi de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux (tableau 2) respectivement. La quantité des flavonoïdes déterminée par la méthode de l' AlCl_3 via la courbe d'étalonnage ($y = 0,016x + 0,006$, $r^2 = 0,999$) est exprimée μg ER/mg de l'extrait (équivalent rutine). Les résultats montrent également que l'extrait méthanolique contient la teneur la plus élevée en flavonoïdes suivi de l'extrait éthanolique puis de l'extrait aqueux.

Tableau 2: Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de *T. polium*

Extrait	Polyphénols (μg EAG/mg de l'extrait)	Flavonoïdes (μg ER/mg de l'extrait)
Méthanolique	134.10 ± 1.96	38.85 ± 1.02
Ethanolique	99.30 ± 1.34	31.64 ± 0.65
Aqueux	74.17 ± 1.15	18.26 ± 0.98

Ces résultats confirment la richesse de *T. polium* en composés phénoliques. Il a été suggéré que la variation en composés polyphénoliques entre ces extraits peut être due à la formation d'un complexe de certains composés phénoliques qui sont solubles dans le méthanol et l'éthanol et ont des poids moléculaires élevés ou plus de groupes phénoliques par rapport aux polyphénols contenus dans l'extrait aqueux. De plus, la combinaison d'eau et de solvant organique facilite la libération de tous les composés phénoliques qui sont solubles à la fois dans les solvants organiques et dans l'eau (Do et al., 2014). La teneur en polyphénols totaux de l'extrait méthanolique est légèrement supérieure à celle obtenue par Stankovic et al. (2011) dont la teneur était de $124,62 \pm 1,05 \mu\text{g}$ EAG/mg. Concernant la teneur en flavonoïdes, les résultats sont presque similaires pour l'extrait méthanolique avec 38,85 contre $41,23 \mu\text{g}$ ER/mg.

Dans ce contexte, des études antérieures ont suggéré que la matrice végétale, le solvant et les conditions d'extraction et le nombre de groupes hydroxyle sont les principaux facteurs

affectant le rendement en polyphénols dans l'extrait (Arabshahi-D et al. 2007; Liaudanskas et al. 2014).

3.2 Composition phénolique des extraits

Le profil chromatographique de l'HPLC des extraits a permis d'identifier un nombre différent de constituants en comparaison au profile des 12 standards utilisés (Fig. 9A). Ainsi il apparait que les deux extraits alcooliques méthanoliques (Fig. 9B) et éthanoliques (Fig. 9C) et l'extrait aqueux (Fig. 9D) présentent une forte similitude avec 8 constituants à l'exception de l'extrait aqueux qui a donné lieu à trois composés de plus à savoir l'acide chlorogénique, le pyrocatechol et le 4'.7 Dihydroxyisoflavone . Pour l'extrait méthanolique, la catéchine était le flavonoïde de plus par rapport aux autres extraits. L'abondance de ces composés déterminée par la surface de leurs pics fait apparaitre que la naringénine et la quercétine sont les flavonoïdes les plus prépondérants dans les trois extraits. Dans l'extrait méthanolique, la catéchine est l'unique flavonoïde avec une concentration de 7182.02 µg/g. Par ailleurs, l'acide chlorogénique est le deuxième composé phénolique le plus abondant dans l'extrait aqueux avec une concentration de 1737.97 µg/g. Ces résultats à travers leurs aspects quantitatif et qualitatif, démontrent que *Teucrium polium* est une bonne source de polyphénols doués de diverses activités biologiques et particulièrement antioxydantes liées à la présence de flavonoïdes tels que la naringénine, la quercétine et la catéchine.

Tableau 3: Composés phénoliques des extraits de *T. polium* déterminés par HPLC

Extrait	Méthanolique	Ethanolique	Aqueux
Composé	Concentration (µg/g)		
Acide Chlorogénique	0.00	0.00	1737.97
Catéchine	7182.02	0.00	0.00
Caféine	455.23	455.54	409.06
Pyrocatechol	0.00	0.00	435.18
Acide Ellagique	2531.44	2286.94	946.91
Acide Coumarique	975.46	958.28	458.43
Vanilline	325.05	693.48	328.58
Naringénine	12286.67	7351.81	13650.05
Propyl Gallate	423.72	404.18	891.48
4'.7 Dihydroxyisoflavone	0.00	0.00	275.68
Quercétine	3225.49	2498.23	1457.64
Acide Cinnamique	148.65	443.54	56.24

Le contenu polyphénolique des plantes médicinales varié en fonction de différentes propriétés telles que leur solubilité dans les solvants d'extraction comme il a été reporté dans des études précédentes (Milošević-Djordjević et al., 2018; Stefkov et al., 2011, 2012).

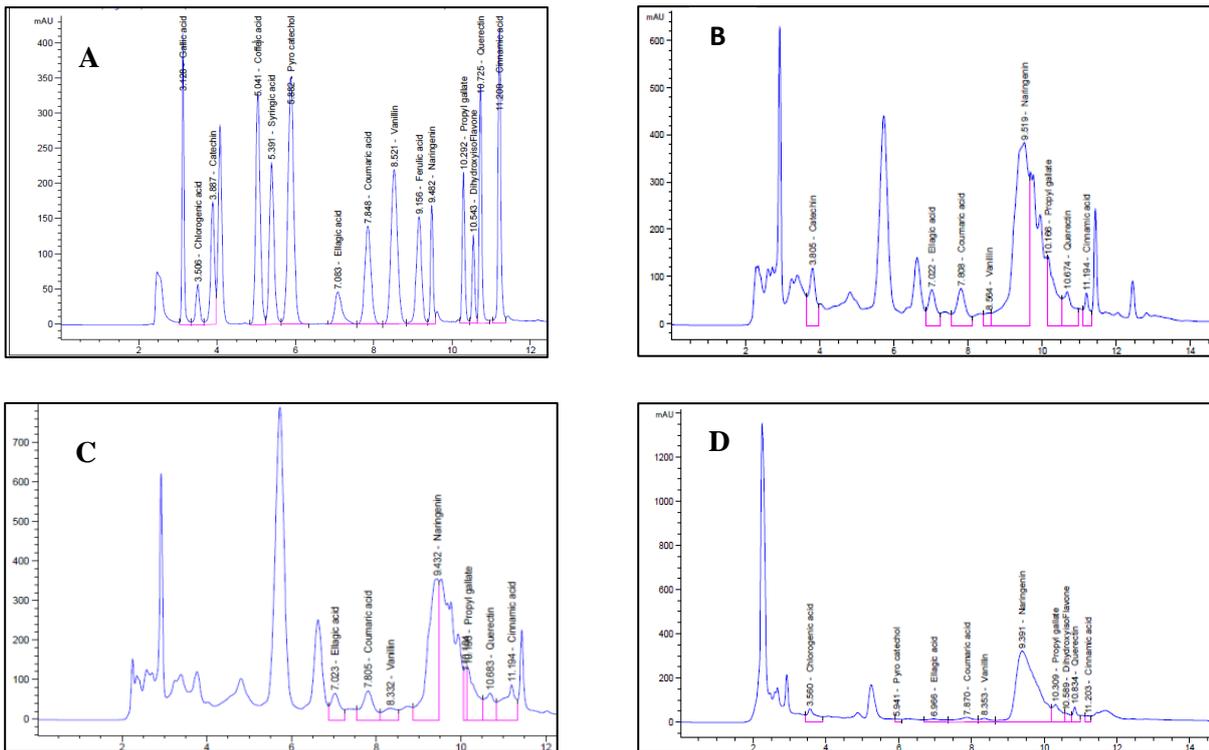


Figure 9: Chromatogrammes HPLC des polyphénols standards (A), des polyphénols totaux des extraits méthanolique (B), éthanolique (C) et aqueux (D) de *T. polium*.

3.3 Évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

3.3.1 Piégeage du radical DPPH

L'efficacité antiradicalaire des trois extraits de *T. polium* a été évaluée en utilisant la méthode de piégeage des radicaux DPPH. Les résultats obtenus montrent que l'activité augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. La meilleure activité a été observée pour l'extrait méthanolique avec une $IC_{50} = 8,27 \pm 1,92 \mu\text{g/ml}$ qui est inférieure au BHT ($12,08 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$) et légèrement supérieure au BHA ($6,14 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$). L'activité antioxydantes des extraits éthanolique et aqueux était moindre avec de IC_{50} de $21,92 \pm 2,28$ et de $61,84 \pm 3,52 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces résultats démontrent clairement que les extraits hydro-alcooliques des feuilles de *T. polium* possèdent une activité antioxydante appréciable probablement attribuée à leur haute teneur en polyphénols totaux. En effet, il a été établi que la propriété de piégeage des radicaux des extraits des plantes dépend principalement de leur teneur en composants phénoliques (Ulewicz-Magulska et Wesolowski, 2019).

La capacité antioxydante des composants phénoliques est modulée par le don d'atomes d'hydrogène. La structure moléculaire, principalement la position et le nombre des groupes hydroxyles, et la nature de leurs substitués sur les cycles aromatiques confèrent aux composés phénoliques la capacité d'inactiver les radicaux libres (Minatel et al., 2017). Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Chaouche et al. (2018) qui ont rapporté que *T. polium* possède une activité antiradicalaire significative avec le test au DPPH avec un potentiel antioxydant moindre avec des IC_{50} de $20,1 \pm 1,7$ et $40,6 \pm 4,0$ $\mu\text{g/ml}$ pour les extraits méthanolique et aqueux respectivement.

3.3.2 Test de l'ABTS

La méthode de l'ABTS est basée sur l'inhibition du radical ABTS, qui est formé pendant la réaction, par une molécule ayant une activité antioxydante. Dans cette étude, l'activité antioxydante a été déterminée en suivant la décoloration du cation bleu-vert du radical ABTS en présence des extraits de *Teucrium polium*. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme antioxydants de référence.

A partir de la représentation graphique ci-dessous (Figure 10), on remarque que l'extrait aqueux est le plus actif avec une valeur d' IC_{50} de l'ordre de $20,50 \pm 0,76$ $\mu\text{g/ml}$ suivi par les extraits méthanolique et éthanolique avec des valeurs d' IC_{50} de $27,11 \pm 0,98$ $\mu\text{g/ml}$ et de $30,58 \pm 1,72$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Cette activité est inférieure à celles de la BHA et la BHT dont les IC_{50} évaluées étaient de $3,12 \pm 0,14$ et de $3,89 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Contrairement aux résultats de test au DPPH, l'extrait aqueux a montré l'activité antioxydante la plus élevée par rapport aux deux autres extraits, et cela peut être dû à la présence de l'acide chlorogénique dans l'extrait aqueux qui est absent dans les extraits hydro-alcooliques. En effet, l'activité antioxydante des isomères de l'acide chlorogénique vis-à-vis l'ABTS est élevée dans une étude rapportée par Xu et al. (2012) avec des IC_{50} entre 67.3 et 91.5 $\mu\text{g/ml}$ qui a été plus élevée que celle de Trolox avec une IC_{50} de 131.1 $\mu\text{g/ml}$.

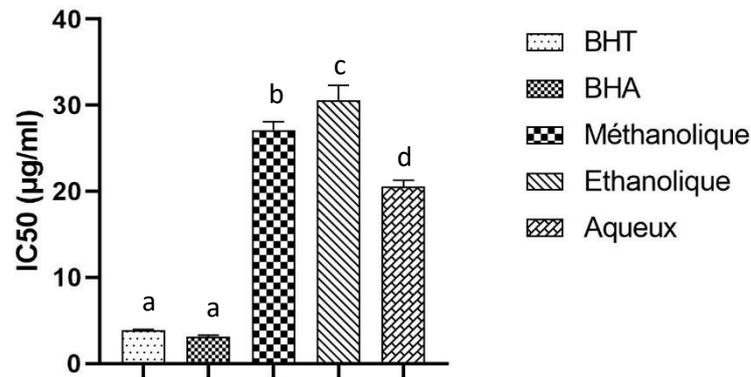


Figure 10: l'IC₅₀ des extraits et standards obtenus par le test ABTS. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

3.3.3 Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur est lié à l'efficacité antioxydante et sert d'indicateur acceptable de la capacité antioxydante (Sayed Ahmad et al., 2018). L'activité réductrice des extraits est basée sur la réduction du complexe hexacyanoferrate de potassium (K_3FeCN_6) de la forme ferrique à la forme ferreuse (Meir et al., 1995). Cette méthode est bien connue comme étant sensible pour le dosage semi-quantitatif des concentrations diluées de polyphénols qui participent à la réaction d'oxydoréduction (Morabbi Najafabad et Jamei, 2014). Dans cette étude, le pouvoir réducteur des extraits de *T. polium* est directement proportionnel à la concentration de l'extrait (Figure 11).

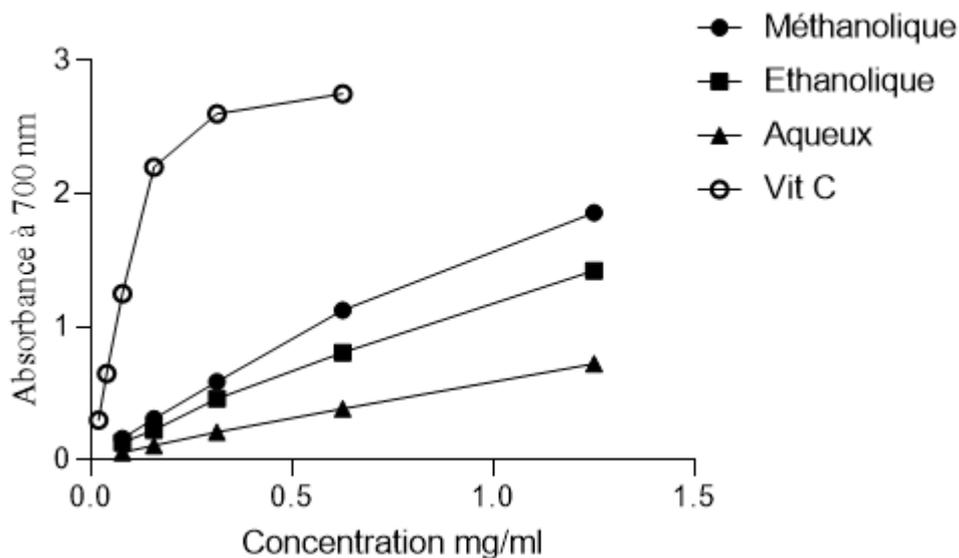


Figure 11: Pouvoir réducteur des extraits de *T. polium*.

Des résultats obtenus, il ressort que l'extrait méthanolique a présenté un pouvoir réducteur élevé avec une $A_{0,5}$ de $268 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ et qui est bien corrélé avec la concentration

croissante. A l'opposé, les extraits éthanoliques et aqueux ont montré une activité modérée avec des $A_{0,5}$ de $398 \pm 0,7$ et de $896 \pm 0,34$ $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Cette différence de pouvoir réducteur est bien corrélée avec la teneur en polyphénols totaux de chaque extrait qui est à l'origine de ce pouvoir. A la lumière de ces résultats, les polyphénols des feuilles de *T. polium* sont de bons donneurs d'électrons à l'origine de la terminaison des réactions radicalaires en chaîne qui convertissent les radicaux libres en espèces plus stables et non réactives.

Dans une étude menée par El atki et al. (2019), sur une espèce sauvage de *Teucrium*, une bonne corrélation a été établie entre leur contenu phénolique et le pouvoir réducteur. En effet, les IC_{50} de pouvoir réducteur obtenu était de $210 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait méthanolique et de $340 \pm 0,6$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique presque comparables.

3.3.4 Test de Cuprac

La méthode CUPRAC est basée sur la réduction du Cu (II), qui est utilisé comme oxydant, en Cu(I) par les composés antioxydants hydrophiles et lipophiles présents dans les extraits. Le BHA, et le BHT ont été utilisés comme solutions standards. Selon les résultats obtenus, l'extrait méthanolique a montré la capacité antioxydante la plus élevée avec une $A_{0.50}$ de $49,39 \pm 2,79$ $\mu\text{g/ml}$ par rapport aux extraits éthanolique et aqueux qui ont donné des $A_{0.50}$ de $76,36 \pm 4,05$ et de $232,22 \pm 6,98$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Ces activités sont largement inférieures par rapport à celles de la BHA et la BHT (Figure 12).

La propriété réductrice indique que les composés antioxydants sont des donneurs d'électrons qui peuvent réduire les intermédiaires chélateurs oxydés du processus de peroxydation lipidique (Jin et al., 2012). Il est bien connu que les extraits préparés avec divers solvants qui possèdent différentes polarités diffèrent entre eux en termes d'activités biologiques au regard de leur composés phénoliques, métabolites secondaires des plantes qui présentent des propriétés chélatrices selon leur structure chimique. De nombreuses études ont montré que l'existence et aussi la position des groupes hydroxyle sont liées à leur capacité antioxydante. Selon Toplan et al., (2022), le profil de l'HPLC à travers l'identité de ses différents flavonoïdes confère à ces extraits leurs propriétés chélatrices-antioxydantes.

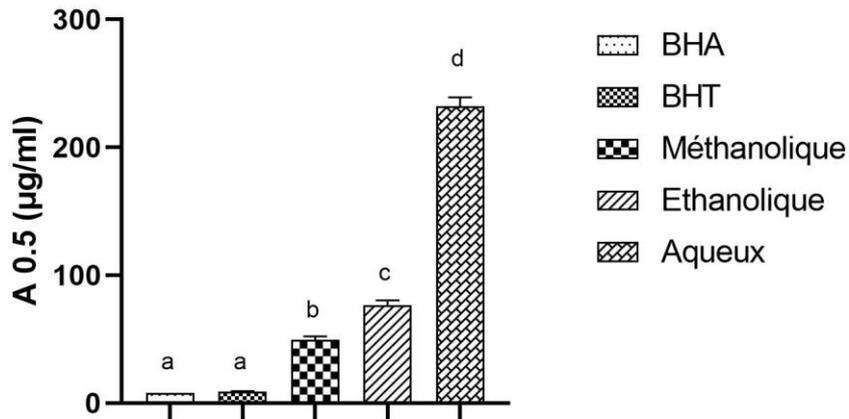


Figure 12: Valeurs des $A_{0.5}$ des extraits et des standards obtenues avec le test CUPRAC. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

3.4 Activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses du sein MCF-7

Le test MTT a été appliqué pour estimer l'activité antitumorale en utilisant des cellules cancéreuses du sein MCF-7 exposées à différentes concentrations des extraits de *Teucrium polium* par rapport au contrôle positif, la Doxorubicine pendant 72 heures. Comme présenté dans la figure 13, les extraits testés ont inhibé la prolifération des cellules MCF-7 de manière dose-dépendante. La plus forte activité antiproliférative a été observée avec l'extrait méthanolique qui a montré une forte inhibition de la croissance des cellules cancéreuses du sein avec une IC_{50} de $14,20 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$. Cependant, les extraits éthanoliques et aqueux ont montré une cytotoxicité modérée avec des IC_{50} de $24,38 \pm 2,1$ et $45,68 \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$, respectivement (tableau 4).

Tableau 4: Activité cytotoxique de différents extraits de *T. polium* contre des cellules de cancer du sein MCF-7

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml) *
Methanolique	14.20 ± 1.3
Ethanolique	24.38 ± 2.1
Aqueux	45.68 ± 3.2
Dox (standard)	4.17 ± 0.2

* IC₅₀ (µg/ml) : 1-10 (très fort), 11-20 (fort), 21-50 (modéré), 51-100 (faible) et plus de 100 (non cytotoxique).

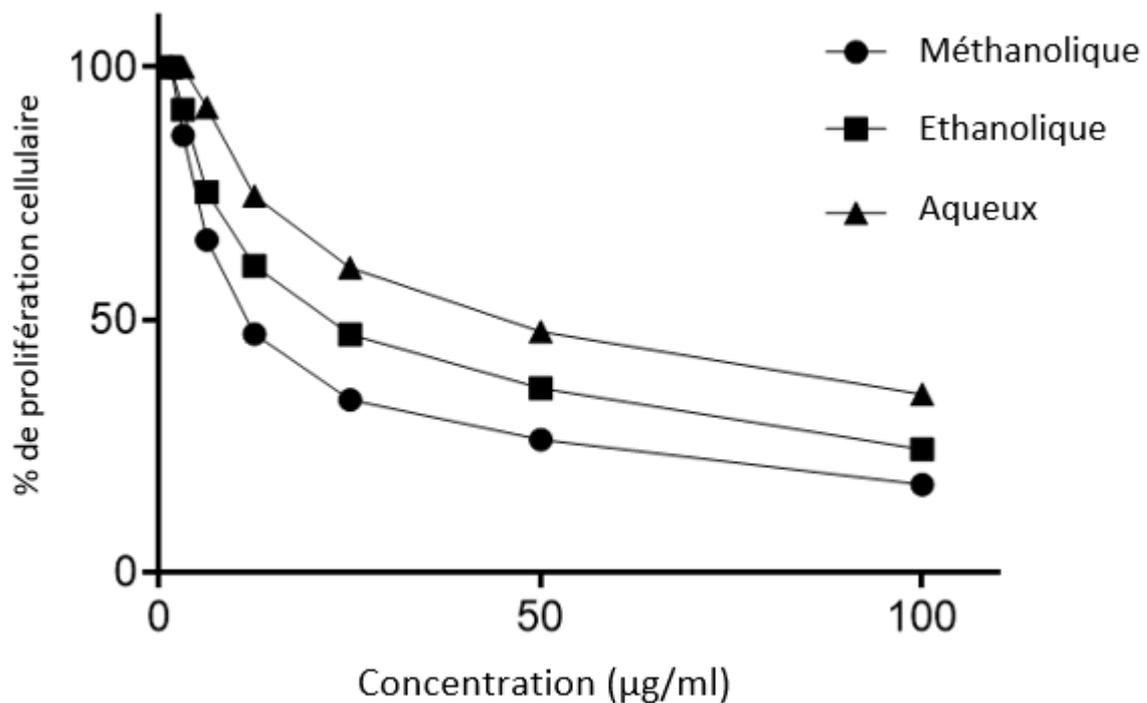


Figure 13: Effet cytotoxique de différentes concentrations des extraits de *Teucrium polium* contre la lignée cellulaire MCF-7

Les effets bénéfiques des composés phénoliques dans la chimioprévention du cancer sont souvent corrélés à leur pouvoir antioxydant, y compris les capacités réductrices et les propriétés de piégeage des ROS (Galatiet O'Brien, 2004). Cependant, l'activité pro-oxydante de ces composés naturels, plutôt que leur action antioxydante, peut être un mécanisme important pour leurs propriétés anticancéreuses et d'induction de l'apoptose, car les ERO peuvent servir de médiateur à la fragmentation apoptotique de l'ADN (Khan et al., 2012). Il a été rapporté que les polyphénols participent, par leur pouvoir antioxydant, à l'étape d'initiation de la carcinogenèse contre les ROS et les agents cancérogènes qui oxydent l'ADN et à la régulation du cycle

cellulaire, à l'induction de l'apoptose et à l'inhibition de l'angiogenèse (Liu, 2004; Sharma et al., 2018).

Comme mentionné précédemment dans l'étude HPLC, les extraits de *T. polium* sont riches en polyphénols tels que la naringénine, la quercétine et l'acide ellagique, qui peuvent être responsables de l'action anticancéreuse de ces extraits. Différents mécanismes par lesquels les polyphénols agissent contre les cellules cancéreuses du sein ont été mis en évidence comme l'induction de l'apoptose; l'augmentation de la connexine 43, l'inhibition de l'acide gras synthase et la réduction de l'expression des cyclines D3, E et A (Chasampalioti et al. 2018; Romagnolo et al. 2017; Phung et al. 2020). En effet, la naringénine, une flavanone majeure présente dans les extraits de *T. polium*, est impliquée dans l'effet inhibiteur sur la prolifération des cellules MCF-7 à travers l'altération de l'absorption du glucose (Harmone et Patel, 2004).

De plus, il a également été rapporté que ce flavonoïde induit une inhibition de la croissance de 50 % des cellules MCF-7 à 19,46 μM après 48 heures (Latif et al., 2019). L'action antiproliférative de la quercétine a été aussi étudiée sur la croissance des cellules du cancer du sein humain *in vivo* et *in vitro*. En effet, Hashemzaei et al. (2017) ont montré que l'administration de la quercétine à des souris porteuses de tumeurs MCF-7 diminuait significativement le volume de la tumeur en interférant avec le cycle cellulaire en provoquant un arrêt du cycle cellulaire en G2/M ou à la transition G1/S. On outre, la combinaison de ce flavonoïde avec l'acide ellagique a montré une action synergique capable de réduire la prolifération et la viabilité et d'induire l'apoptose dans les cellules leucémiques MOLT-4 (Srivastava et al., 2016).

Les résultats de notre étude confirment que *T. polium* a une forte activité cytotoxique *in vitro* contre les cellules cancéreuses du sein humain. Cette activité est probablement due aux flavonoïdes (naringénine et quercétine) qui sont présents en quantités significatives et agissent en synergie comme agents chimiopréventifs.

3.5 Effet protecteur de l'extrait méthanolique contre la toxicité induite par l'aflatoxine B₁

3.5.1 Poids corporel

L'effet de l'AFB₁ et de l'extrait de feuilles de *T. polium* sur le poids corporel des rats est décrit dans la figure 14. Le gain de poids corporel du groupe témoin pendant 15 jours est le plus élevé ($140,8 \pm 6,37$ g). Les rats traités avec l'AFB₁ ont montré une perte significative ($p < 0,05$) du poids corporel ($116,64 \pm 4,69$ g), alors qu'aucun effet significatif n'a été observé chez les animaux traités avec l'extrait méthanolique de *T. polium*. D'autre part, le traitement avec 50 et

100 mg/kg de l'extrait de *T. polium* a amélioré de manière significative le poids corporel chez les rats prétraités avec l'AFB₁ par rapport à ceux traités avec l'AFB₁ seule.

Les résultats indiquent que l'ingestion de l'AFB₁ a entraîné une diminution significative de la prise alimentaire et par conséquent, le gain de poids corporel a également été réduit. La diminution du poids corporel chez les animaux traités avec l'aflatoxine B₁ peut être due à ses effets sur l'équilibre entre les circuits orexigènes et anorexigènes qui contrôlent la boucle homéostatique de régulation du poids corporel, conduisant à la cachexie (Rastogi et al., 2001a). A cet égard, Abdel-Wahhab et al. (2006, 2010) ont montré que les rats traités avec l'AFB₁ ont présenté une diminution significative du taux de leptine. Une faible concentration de leptine est généralement associée à des niveaux élevés de cortisol et d'IL-6 qui agissent ensemble pour influencer la prise alimentaire, provoquant ainsi une perte de poids chez les patients atteints de cancer du pancréas (Barber et al., 2004). Cette corrélation peut expliquer la diminution du poids corporel observée chez les rats traités avec l'AFB₁. Puisque la leptine et son récepteur sont les acteurs clés de la régulation de l'équilibre énergétique et du contrôle du poids corporel (Yuan et al., 2004).

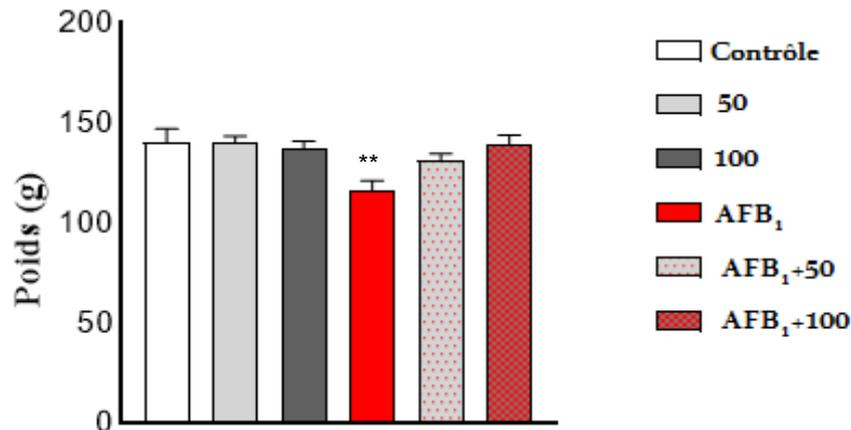


Figure 14: Effet de l'aflatoxine B₁ et de l'extrait de TP sur le poids corporel. Les comparaisons sont effectuées par rapport au contrôle. **: $p \leq 0.01$

3.5.2 Evaluation paramètres biochimiques

3.5.2.1 Marqueurs sériques du foie

Les effets de l'administration de 50 et 100 mg/kg de l'extrait méthanolique de *T. polium* sur l'hépatotoxicité induite par l'AFB₁ chez les rats sont montrés dans la figure 15. Des activités anormales des enzymes hépatiques chez les rats traités ont été observées et confirment ainsi les dommages cellulaires causés par le traitement à l'AFB₁. En effet, le groupe expérimental traité

à l'aflatoxine B₁ a présenté une concentration sanguine statistiquement plus élevée de l'ALT, l'AST et l'ALP par rapport aux valeurs du groupe témoin. Chez les rats prétraités avec l'AFB₁, l'extrait méthanolique de feuilles de *T. polium* (50 et 100 mg/kg) est capable de rétablir les valeurs de ces enzymes marqueurs presque à leurs niveaux normaux (Figure 15).

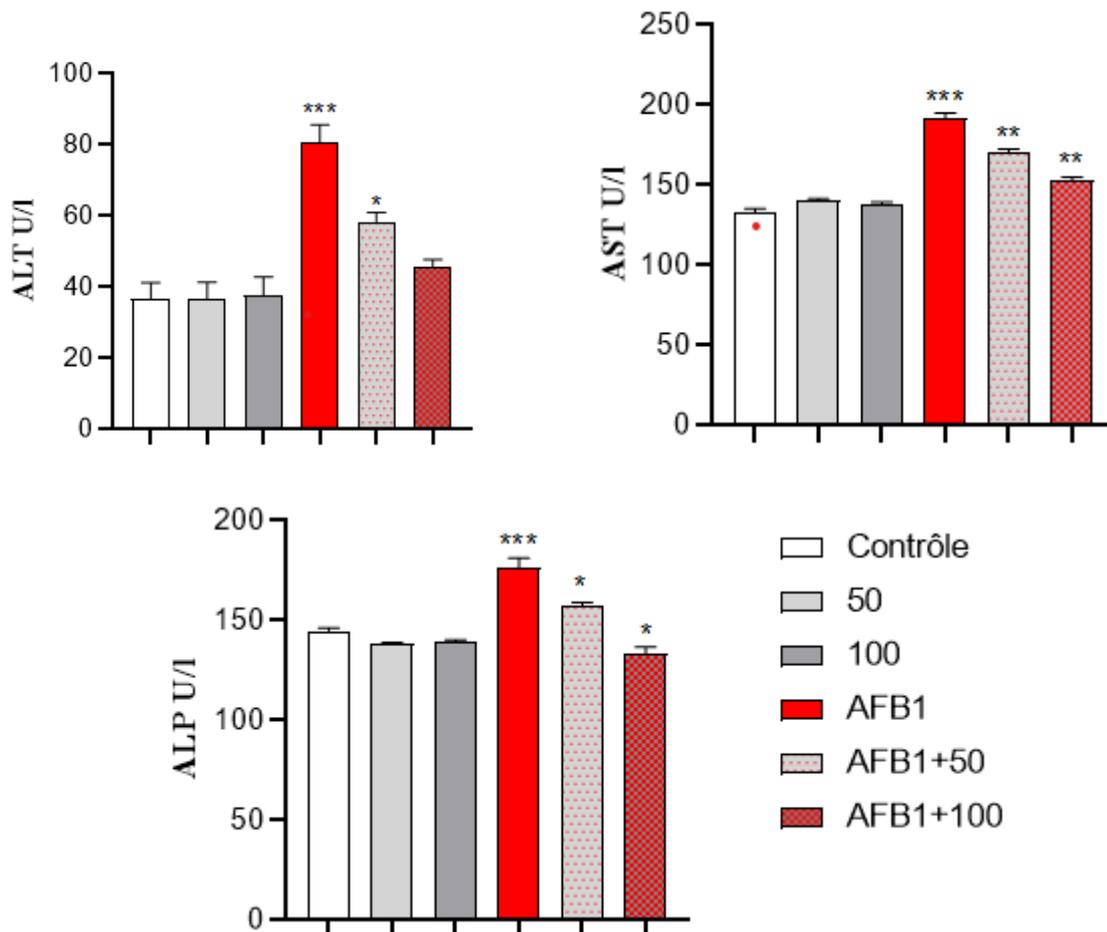


Figure 15: Effet de l'extrait méthanolique de TP sur les paramètres hépatiques des rats traités par l'aflatoxine B₁. Les comparaisons sont effectuées par rapport au témoin. *: P ≤ 0,05, **: P ≤ 0.01, *** : P ≤ 0.001

L'aflatoxine B₁ a été largement utilisée dans les modèles animaux pour induire des lésions hépatiques afin d'étudier les maladies de foie (Lee et al., 2007 ; Rudnicki et al., 2007 ; Desai et al., 2012). La mesure du taux sérique de ces enzymes qui s'échappent des cellules hépatiques lésées pour passer dans la circulation générale, est largement utilisée pour déterminer l'étendue des lésions hépatiques (Ramaiah, 2007). Le foie est la principale cible de la toxicité de l'AFB₁ et l'exposition chronique à de faibles doses d'aflatoxines dans les aliments provoque un carcinome hépatocellulaire (Rushing et Selim, 2019).

Dans la présente étude, l'effet hépatoprotecteur de l'extrait de feuilles de *T. polium* est bien établi dans des lésions hépatiques expérimentales causées par l'aflatoxine B₁ chez les rats.

L'intoxication à l'AFB₁ a significativement augmenté les niveaux sériques de l'ALT, l'AST et l'ALP chez les rats traités par rapport au groupe contrôle. Plusieurs études antérieures ont montré une augmentation de ces enzymes marqueurs suite à une exposition à l'AFB₁ (Eftekhari et al., 2018; Rotimi et al., 2016). La libération de ces enzymes hépatiques dans le plasma est considérée comme un signe biochimique évident de lésion hépatique ainsi qu'une défaillance de la capacité fonctionnelle de la membrane cellulaire dans le foie (Sharmila Banu et al., 2009). La co-administration de l'extrait méthanolique de feuilles de *T. polium* (50 et 100 mg/kg/j) avec l'AFB₁ a significativement empêché l'apparition de ces lésions en diminuant la fuite de ces biomarqueurs enzymatiques dans le plasma. Ainsi, l'administration de l'extrait de *T. polium* a amélioré de manière significative l'intégrité physiologique des hépatocytes des rats traités, entraînant la restauration des niveaux normaux de ces marqueurs.

L'efficacité des composés naturels dans la diminution des taux des enzymes hépatiques sériques chez les rats exposés à l'AFB₁ a été rapportée dans plusieurs études. En effet, la quercétine, la chlorophylline, le lupéol et la silymarine ont été capables d'améliorer l'intégrité physiologique des hépatocytes de rats traités à l'AFB₁ en normalisant le niveau de ces enzymes dans le sérum. L'action préventive de ces composés a été attribuée à leurs propriétés antioxydantes (Choi et al., 2010; Costa et al., 2007; Kumar et al., 2012). D'autre part, Al-Kubaisy et al. (2013), ont rapporté que les extraits de *T. polium* exercent un effet protecteur significatif contre les lésions hépatiques ainsi que le stress oxydatif induit par le CCl₄, entraînant une amélioration des paramètres biochimiques sériques tels que l'ALT, l'AST, les protéines totales et l'albumine. Cette étude indique que l'activité hépatoprotectrice des extraits de *T. polium* est probablement dû à ses propriétés antioxydantes en piégeant les radicaux libres associés au CCl₄.

3.5.2.2 Marqueurs sériques des reins

Les effets de l'extrait méthanolique de feuilles de *T. polium* sur la fonction rénale chez les rats traités par l'AFB₁ sont mentionnés au niveau de la figure 16. Le traitement par AFB₁ a provoqué une augmentation significative des taux de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique sériques, alors que le traitement oral par l'extrait méthanolique de *T. polium* seul a montré des valeurs comparables à celles du groupe contrôle. Lorsque l'extrait de feuilles de *T. polium* a été co-administré avec l'AFB₁, il a été constaté que les deux doses (50 mg/kg et 100 mg/kg) ont significativement diminué les niveaux de créatinine, de l'urée et de l'acide urique par rapport aux rats traités avec l'AFB₁ seul. Il est à noter que l'amélioration des niveaux de marqueurs

rénaux par l'extrait de *T. polium* était plus efficace chez les groupes traités avec la dose de 100mg/kg qui a rétabli les niveaux de ces paramètres vers les valeurs normales.

Ces changements ont été associés à une diminution significative des concentrations de protéines totales et de l'albumine dans le sérum des rats traités à l'AFB₁ par rapport au groupe témoin. Cette diminution causée par l'AFB₁ a été totalement restaurée chez les rats qui ont subi un traitement combiné (AFB₁ + extrait à 50 mg/kg ou à 100 mg/kg). Chez ces groupes, l'extrait de *T. polium* a diminué les niveaux sériques de ces paramètres vers leurs niveaux normaux du contrôle (Figure 16).

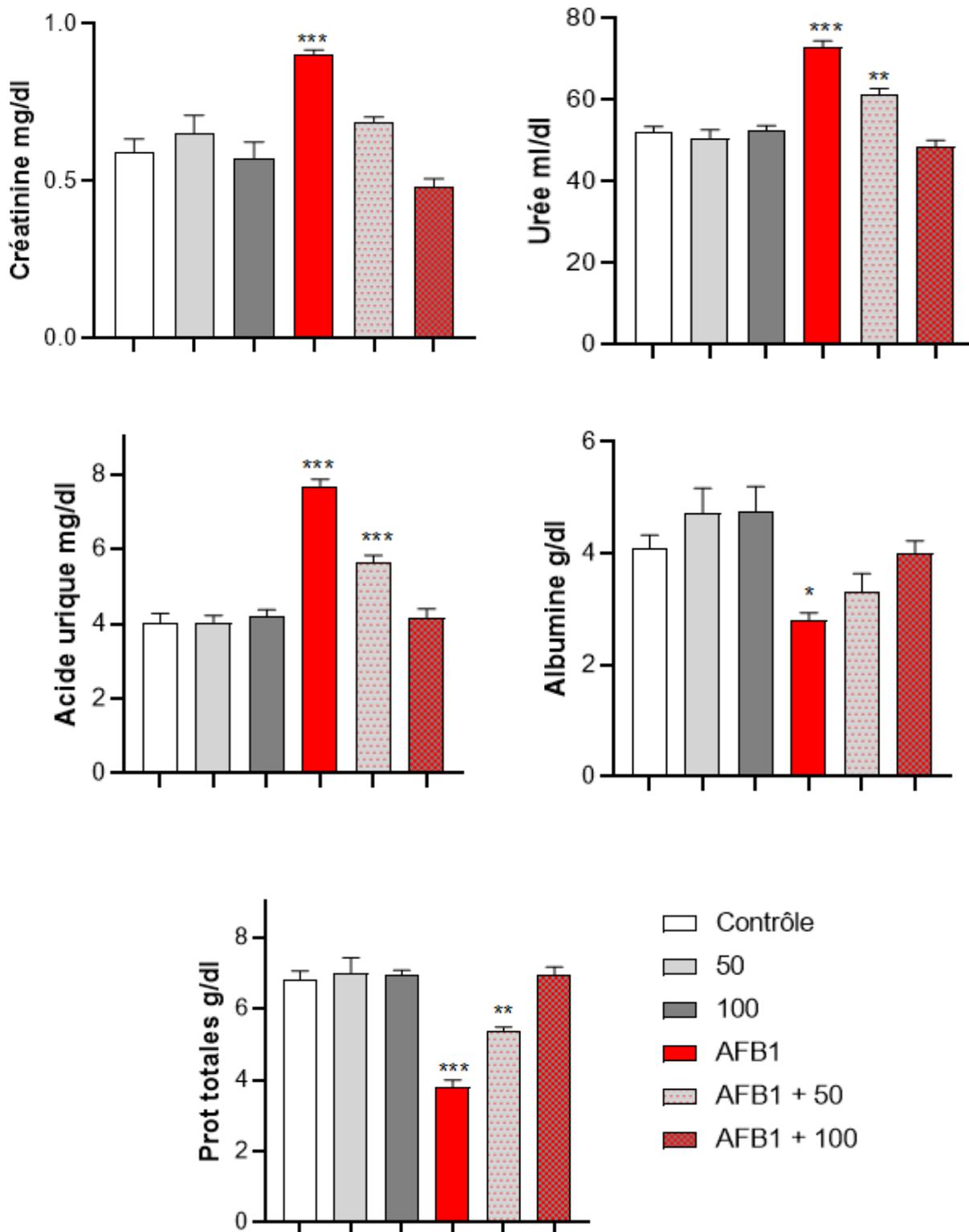


Figure 16: Effet protectif de l'extrait méthanolique de *T. polium* sur la fonction rénale chez les rats traités par l'aflatoxine B1. Les comparaisons sont effectuées par rapport au témoin. **: $P \leq 0.01$, *** : $P \leq 0.001$

L'évaluation des taux de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine sont utilisés cliniquement pour surveiller la fonction rénale (Gowda et al., 2010). Il est connu que l'AFB₁ provoque des lésions rénales en raison de son accumulation dans le rein et conduit à une insuffisance rénale (Grosman et al., 1983). Le trouble de l'excrétion rénale entraîne des taux élevés de créatinine et d'acide urique sériques en plus d'une augmentation du catabolisme protéique (Karabacak et al., 2015). Il a été rapporté que le stress oxydatif favorise la formation d'une variété de médiateurs vasoactifs qui affectent directement la fonction rénale en provoquant une vasoconstriction ou en diminuant le taux de filtration glomérulaire (Garcia-Cohen et al., 2000). En outre, l'augmentation du taux de l'urée et la réduction de la teneur des protéines totales et de l'albumine indique un catabolisme protéique élevé et/ou un dysfonctionnement rénal (Abdel-Wahhabet Aly, 2005).

CCI

L'exposition à l'AFB₁ augmente la présence des ROS, ce qui entraîne la détérioration du système de défense antioxydant et des dommages oxydatifs dans les reins (Naaz et al. 2014). La toxicité de l'aflatoxine altère les caractéristiques morphologiques et physiologiques des reins par des modifications structurelles des tissus rénaux et des tubules et ainsi par l'augmentation des niveaux de biomarqueurs sériques, notamment l'urée et la créatinine (Valdivia et al., 2001). *Teucrium polium* est connue pour ses effets protecteurs des reins contre des toxines chimiques telles que la CCl₄. En effet, il a été rapporté que le prétraitement par gavage de 200 mg/kg de *T. polium*, pendant 7 jours, améliore de manière significative la clairance de la créatinine et de l'urée en réduisant leurs taux sériques chez les rats traités par ₄ (Rahmouni et al., 2019). L'extrait méthanolique de *T. polium* a également montré sa capacité à protéger les reins contre les dommages oxydatifs et les changements biochimiques induits par le cyclophosphamide. L'administration orale de cet extrait a considérablement réduit l'élévation des cytokines anti-inflammatoires sériques, les paramètres de la fonction rénale, ainsi que les changements dans les tissus rénaux induit par le cyclophosphamide (Mansoury, 2020).

3.5.2.3 Le Profil lipidique

Les effets de l'extrait méthanolique des feuilles de *T. polium* sur le profil lipidique chez les rats traités avec l'AFB₁ sont présentés dans la figure 17. Les rats ayant reçu l'AFB₁ ont présenté des taux significativement plus élevés de cholestérol, de triglycérides et de LDL, tandis que le HDL plasmatique a diminué d'une manière significative après l'injection d'AFB₁ par rapport au groupe contrôle. Cependant, les rats ayant reçu uniquement l'extrait de *T. polium* à 50 mg/kg et 100 mg/kg les taux de ces paramètres n'ont pas été modifiés par rapport au groupe de rats témoins. En revanche, la co-administration de ces deux doses avec l'AFB₁ a réduit les niveaux de ces marqueurs lipidiques d'une manière significative par rapport aux rats traités seulement par l'AFB₁ en ramenant leurs valeurs à des taux normaux.

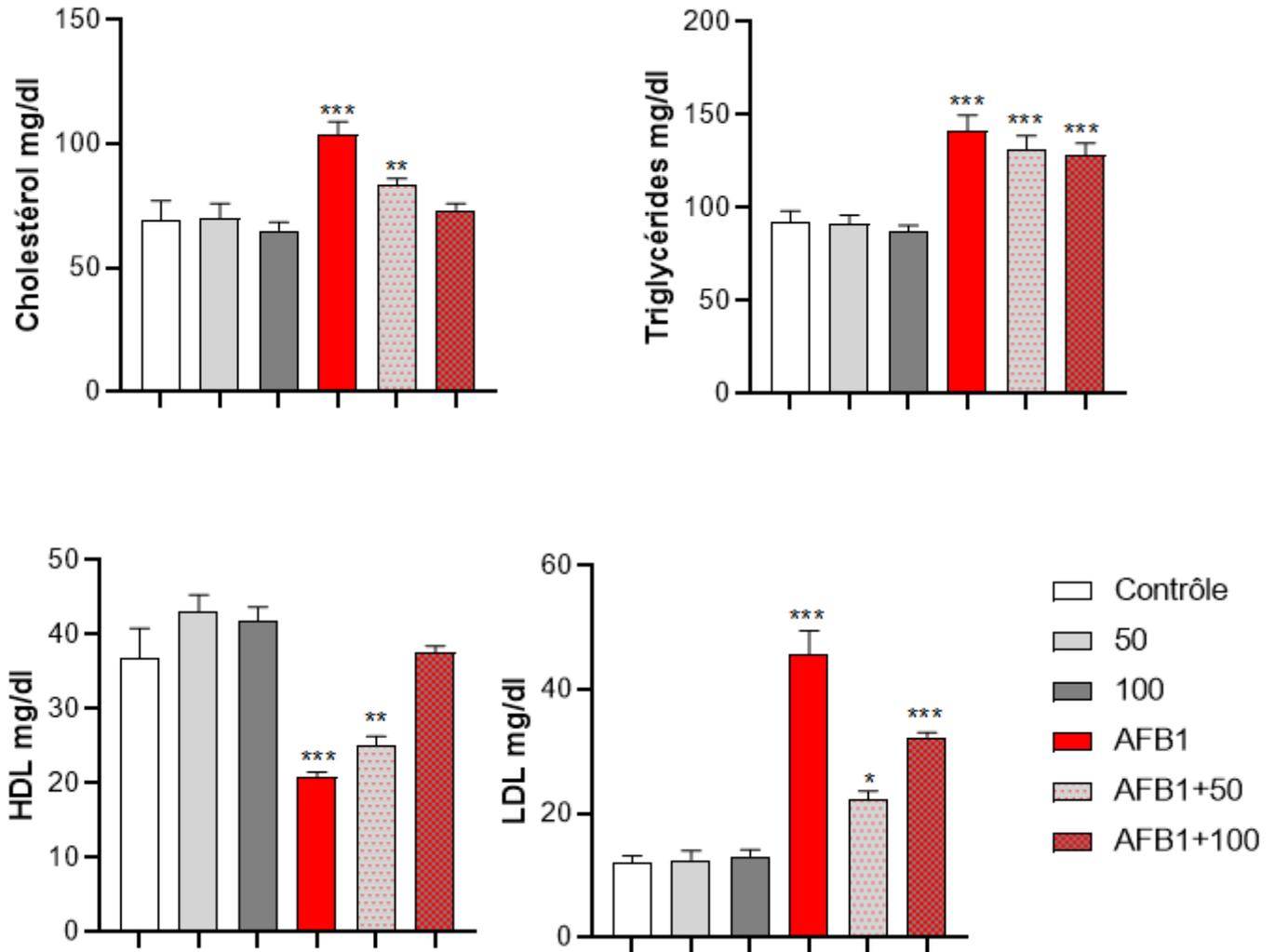


Figure 17: Effet de l'aflatoxine et de l'extrait de *T. polium* sur le profile lipique chez les rats traités par l'aflatoxine B₁. Les comparaisons sont effectuées par rapport au témoin. *: P ≤ 0,05, **: P ≤ 0.01, *** : P ≤ 0.001

L'augmentation significative des taux de cholestérol et des triglycérides plasmatiques induite par l'AFB₁ observée dans cette étude est en accord avec celle obtenue par El-Nekeety et al., (2011). Les auteurs ont attribué l'élévation des niveaux de cholestérol et des triglycérides à une obstruction biliaire et à une lésion hépatique aiguë. Le faible taux de cholestérol chez les animaux traités avec l'extrait de *T. polium* seul ou en combinaison avec l'aflatoxine suggère que cet extrait peut avoir des propriétés anti-athérosclérotiques et peut avoir un effet protecteur contre le développement de maladies coronariennes (Morcos, 1997).

Dans une autre étude menée par Rasekh et ses collaborateurs (2011), des rats hyperlipidémiques ont été traité avec l'extrait aqueux des parties aériennes de *T. polium* (100 et 150 mg/kg). L'extrait a induit une réduction significative et dose-dépendante du cholestérol

et des triglycérides par rapport au contrôle. Cette action hypolipémiante a été attribuée aux flavonoïdes et aux terpénoïdes de cette plante.

3.5.2.4 Paramètres de stress oxydatif de foie et des reins

Les niveaux des biomarqueurs de stress oxydatif évalués dans le foie et les reins chez les rats ayant reçu différents traitements reportés au niveau des tableaux 5 et 6 montrent que le traitement par l'AFB₁ entraîne des dommages cellulaires au regard de l'altération de différents marqueurs de stress. Le traitement de ces rats par l'extrait de *T. polium* a eu un positif sur les fonctions hépatiques et rénales. En effet, le niveau de MDA dans ces tissus a été significativement augmenté chez les rats traités par l'AFB₁ par rapport aux rats du groupe contrôle. L'administration de l'extrait de *T. polium* seul a diminué significativement le niveau de MDA à la dose de 100 mg/kg. La combinaison de l'extrait méthanolique avec l'injection de l'AFB₁, a amélioré d'une manière appréciable le niveau de ce marqueur en rétablissant sa valeur à la normale.

Par ailleurs, une diminution significative des activités TAC, de GPx et de CAT a été observée dans le foie et les reins suite à l'administration de l'AFB₁. Cependant, une légère augmentation des activités de ces paramètres a été observée chez les animaux traités avec 50 et 100 mg/kg de l'extrait méthanolique de *T. polium* seul. En outre, le co-traitement des rats avec l'extrait à la dose de 100 mg/kg et l'AFB₁ a permis de réajuster leurs valeurs à leurs limites normales.

Tableau 5: Paramètres de stress oxydatif dans le foie

	Contrôle	50	100	AFB ₁	AFB ₁ + 50	AFB ₁ + 100
MDA	44,52 ± 1,15 ^a	43,4 ± 0,77 ^a	40,80 ± 1,86 ^a	83,86 ± 0,59 ^b	64,17 ± 0,42 ^c	50,06 ± 0,91 ^d
TAC	27,23 ± 1,08 ^a	28,99 ± 0,55 ^a	31,53 ± 0,6 ^b	14,28 ± 0,02 ^c	19,13 ± 0,26 ^d	25,47 ± 0,51 ^a
GPx	213,88 ± 1,08 ^a	219,38 ± 0,41 ^a	224 ± 0,45 ^b	147,39 ± 3,06 ^c	193,21 ± 1,61 ^d	210,84 ± 1,29 ^a
CAT	11,13 ± 0,09 ^a	11,33 ± 0,16 ^a	12,24 ± 0,1 ^b	5,60 ± 0,12 ^c	9,5225 ± 0,19 ^d	11,86 ± 0,32 ^a

Tableau 6: Paramètres de stress oxydatif dans les reins

	Contrôle	50	100	AFB ₁	AFB ₁ + 50	AFB ₁ + 100
MDA	40,46 ± 1,16 ^a	39,33 ± 0,63 ^a	35,34 ± 0,84 ^b	63,76 ± 1,75 ^c	54,7 ± 2,01 ^d	41,45 ± 0,44 ^a
TAC	21,92 ± 0,41 ^a	22,99 ± 0,38 ^a	23,51 ± 0,31 ^b	12,63 ± 0,42 ^c	17,59 ± 0,47 ^d	23,53 ± 0,26 ^a
GPx	212,91 ± 1,48 ^a	213,8 ± 0,71 ^a	217,4 ± 0,95 ^a	110,4 ± 1,12 ^b	193,1 ± 2,35 ^c	204,1 ± 2,08 ^d
CAT	11,57 ± 0,3 ^a	11,44 ± 0,38 ^a	12,26 ± 0,13 ^a	5,735 ± 0,21 ^b	8,83 ± 0,14 ^c	12,41 ± 0,33 ^a

De ces résultats, il ressort que l'administration de l'aflatoxine est à l'origine de l'altération significative du statut antioxydant hépatique et rénal à travers l'induction du stress oxydatif dans le foie et les reins des rats (El-Sayed Mostafa et al., 2021; Eraslan et al., 2017; Li

et al., 2021). En effet il a été observé qu'il y avait une augmentation du taux de MDA et une diminution des activités antioxydantes enzymatiques de GSH-Px et de catalase après l'administration de l'AFB₁. Données qui confirment sans aucun doute les résultats de nos travaux.

L'induction de la peroxydation lipidique (LPO) par l'AFB₁ est considérée comme l'une des principales manifestations des dommages oxydatifs causés par les espèces réactives de l'oxygène et elle a été associée à des dommages aux membranes cellulaires et à l'inactivation d'enzymes entraînant ainsi des dommages à l'ADN (Ameen Abdulmajeed, 2011). Le MDA est un produit de dégradation majeur des acides gras insaturés membranaires qui est considéré comme un marqueur important de la peroxydation lipidique (Tsikas, 2017). Pour cela, nous avons estimé le niveau de MDA chez les rats expérimentaux afin d'évaluer le degré de peroxydation lipidique. Dans notre étude, l'augmentation significative des niveaux de MDA observés dans le foie et les reins des rats intoxiqués par l'AFB₁ semble être causée par les niveaux accrus de ROS résultant des conditions de stress chez les rats traités. D'autre part, il est bien connu que la catalase et le GSH-Px jouent un rôle fondamental dans la protection contre l'effet délétère des ROS sur les acides gras polyinsaturés et les protéines structurelles de la membrane plasmique (Vipin et al., 2017). La baisse significative des activités de ces enzymes peut être liée soit à l'effet inhibiteur de l'AFB₁ sur ces enzymes, soit à leur consommation lors de la dégradation des niveaux élevés de H₂O₂ produits à l'intérieur des cellules au cours du catabolisme de l'AFB₁. La consommation des stocks de glutathion du foie et l'affaiblissement de la synthèse du glutathion induit par l'AFB₁ peuvent également être une raison susceptible d'entraîner la diminution de l'activité de GSH-Px (Eraslan et al., 2005)

Les rats intoxiqués par l'AFB₁ et ayant reçu l'extrait méthanolique de *T. polium* (50 et 100 mg/kg) ont montré une diminution significative du niveau de MDA et une amélioration de l'activité de la catalase et du GSH-Px. La diminution du MDA chez ces rats indique que cet extrait atténue la peroxydation lipidique grâce à son puissant effet antioxydant, qui est important pour éliminer les ROS et les intermédiaires réactifs formés lors du métabolisme de l'AFB₁ via le système cytochrome. De nombreuses études antérieures ont montré que *T. polium* présentait une forte activité antioxydante qui peut être attribuée à leur contenu en composés polyphénoliques (De Marino et al., 2012; Stankovic et al., 2012; Sharififar et al., 2009). Ainsi, il apparaît que l'extrait de *T. polium* est à l'origine de cet effet protecteur en réduisant la toxicité de l'AFB₁ sur le foie et les reins par la diminution du stress oxydatif et par l'amélioration des systèmes de défense antioxydants.

3.5.2.5 Dosage des marqueurs tumoraux

Le traitement par l'AFB₁ a provoqué une augmentation significative des taux du facteur de nécrose tumorale TNF- α , de l'alpha-fœtoprotéine (AFP) et de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) (Figure18). Le traitement des rats par l'extrait au doses de 50 et 100 mg/kg n'a pas entraîné une modification significative des niveaux des TNF- α et de CEA à l'exception de l'AFP qui a diminué de manière significative chez les rats traités avec à la dose de 100 mg/kg. De plus, la co-administration de l'extrait (50 et 100 mg/kg) avec l'AFB₁ a provoqué une réduction significative des niveaux de ces paramètres en comparaison avec les niveaux élevés chez les rats intoxiqués.

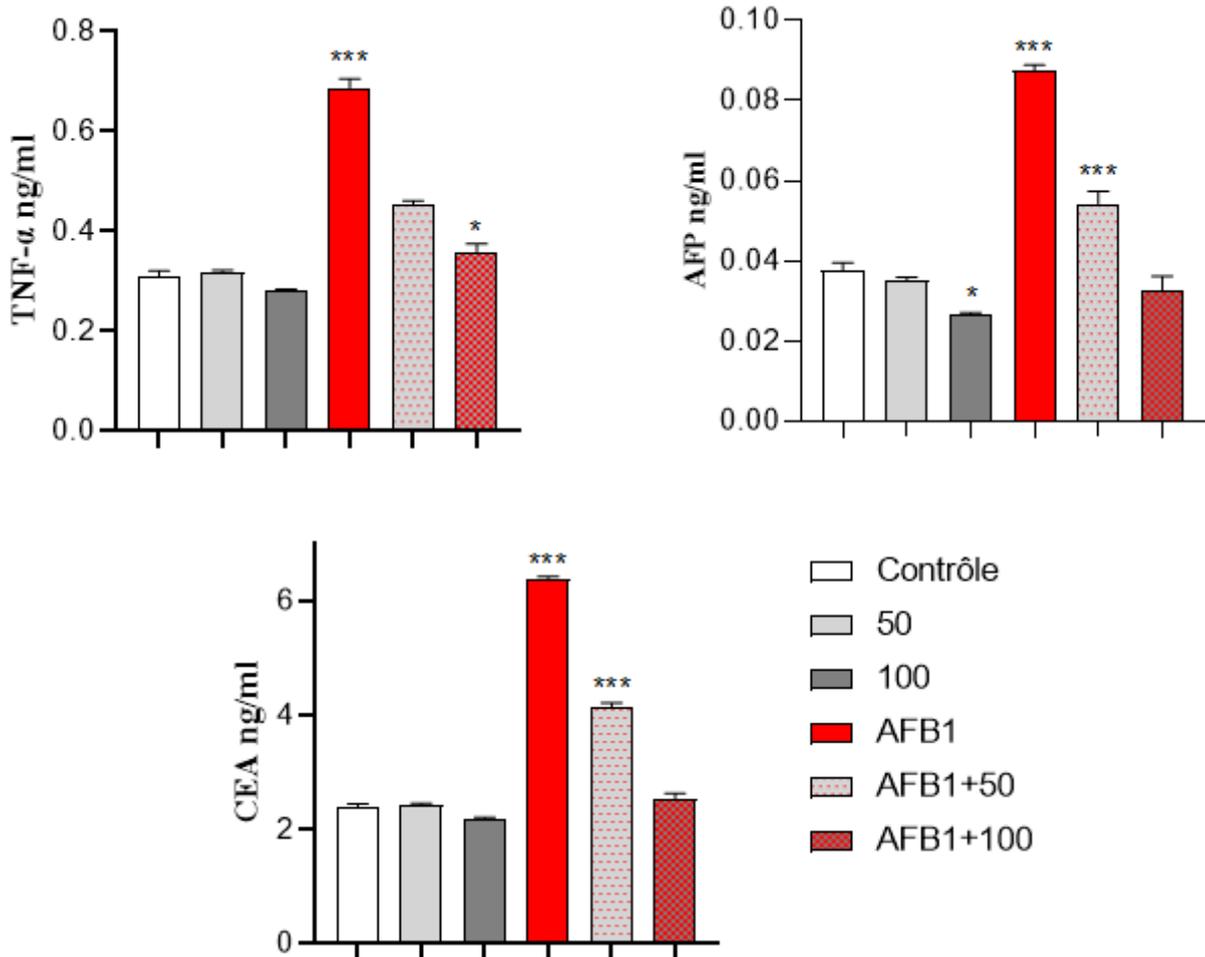


Figure 18: Effet de l'aflatoxine et de l'extrait de *T. polium* sur les taux des marqueurs tumoraux chez les rats traités par l'aflatoxine B₁. Les comparaisons sont effectuées par rapport au témoin. *** : P ≤ 0.001

Au regard des résultats obtenus, l'intoxication aiguë des rats par l'aflatoxine B₁ a induit une augmentation significative des niveaux sériques de TNF-α, de l'AFP et de CEA, résultats en conformité avec ceux obtenus par Abdel-Wahhab et al. (2010), qui ont établi la même allure des valeurs. Il a été suggéré que les mécanismes de toxicité et de cancérogénicité de l'AFB₁ sont principalement dus à la formation du métabolite intermédiaire AFB₁-exo-8,9 époxyde (AFBO). Ce composé très actif est capable de réagir avec différentes macromolécules cellulaires telles que les protéines, les acides nucléiques et les phospholipides, entraînant ainsi des perturbations métaboliques et génétiques (Benkerroum, 2020). En plus de la formation d'AFBO, d'autres rapports ont suggéré un autre mécanisme de toxicité de l'AFB₁ *via* l'induction du stress oxydatif qui conduit à une génotoxicité, une immunotoxicité et une toxicité de l'ADN génomique (Marin et Taranu, 2012).

L'AFP et la CEA sont considérés comme des biomarqueurs spécifiques du cancer du foie et ils sont synthétisés principalement au stade fœtal et leur production est pratiquement nulle chez l'adulte normal. Cependant, lorsque certaines cellules adultes sont transformées en cellules cancéreuses, la synthèse de l'AFP et du CEA reprend de nouveau (Abdel-Wahhab et al. 2006).

Le taux d'AFP est le biomarqueur sérologique le plus utilisé pour la détection précoce du carcinome hépatocellulaire (CHC) (Li et al. 2019). La mesure de l'AFP sérique peut donc être utile comme marqueur sensible pour la détection précoce du carcinome hépatocellulaire récurrent, avant même que les symptômes cliniques ne soient évidents (Malati, 2007). La CEA est aussi utile dans l'évaluation préopératoire des patients présentant des métastases colorectales hépatiques pour évaluer le pronostic, et est complémentaire à l'historique et aux examens physiques dans le diagnostic des métastases hépatiques (Campos-da-Paz et al., 2018).

Le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF-alpha) est une cytokine multifonctionnelle associée à la fois aux processus de mort cellulaire et à la prolifération cellulaire (Montfort et al., 2019). La dérégulation de l'expression du TNF dans le microenvironnement tumoral semble favoriser l'invasion, la migration et les métastases des tissus cellulaires tumoraux (Salvatore et al., 2016). Il a été suggéré que le TNF- α contribue à la progression de plusieurs types de cancer, y compris le cancer du foie (Jing et al., 2018).

Cette étude a bien établi que le traitement des rats l'extrait d'une manière concomitante avec l'aflatoxine a induit diminution significative des marqueurs tumoraux mis en évidence. Cette activité anticancéreuse de l'extrait de *T. polium* peut être liée à l'inhibition possible de l'augmentation du taux de TNF- α et donc à la prévention des processus pathologiques tels que l'inflammation chronique état causale de la malignité cellulaire liée probablement à cette cytokine (Movahedi et al., 2014).

3.5.2.6 Génotoxicité

a) Test de micronoyaux

L'intoxication des rats par l'AFB₁ a induit une augmentation du pourcentage de polychromatiques micro-nucléés (MNPCEs) (0,91% contre 0,26% pour le groupe témoin) dans les cellules de la moelle osseuse (Figure 19). Le traitement de ces rats par l'extrait aux doses de 50 et 100 mg/kg n'a pas engendré de manière significative l'augmentation de pourcentage de MNPCEs qui sont légèrement inférieur à celui du contrôle de l'ordre de 0,23% et 0,25% respectivement. Le co-traitement des rats au mêmes doses avec l'AFB₁ a permis de diminuer d'une manière significative le pourcentage de MNPCEs à 0,39% et 0,28%, respectivement par

rapport au groupe traité à l'AFB₁ seul. A noter qu'aucun effet prononcé n'a été évalué sur le ratio (PCE/ (PCE+NCE)) de cytotoxicité dans tous les groupes expérimentaux.

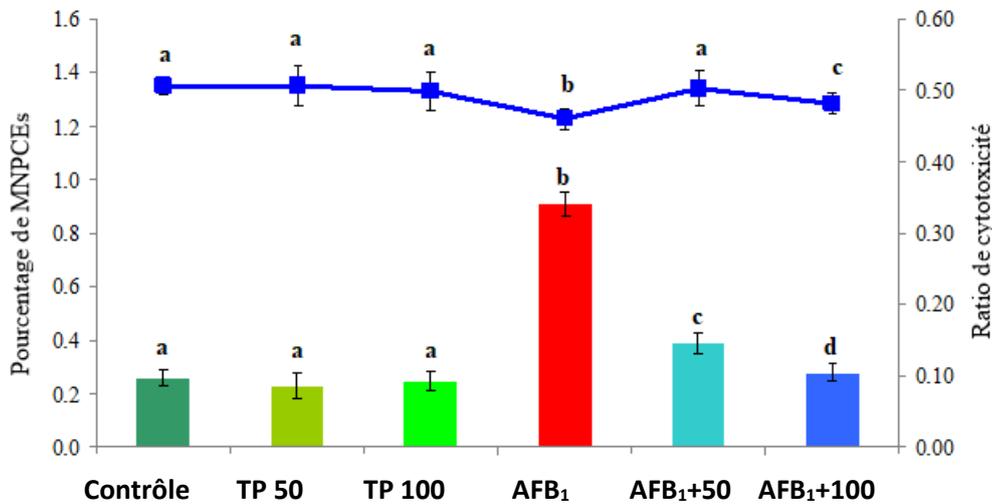


Figure 19: Effet de l'extrait de *T. Polium* et de l'AFB₁ sur l'apparition de MNPCes dans les cellules de moelle osseuse de rat. Les données sont exprimées en pourcentage moyen+E.S. Dans chaque série, les données avec des lettres différentes ont une signification statistique ($p < 0,05$).

b) Test des comètes

L'intoxication des rats par AFB₁ a entraîné une augmentation significative des valeurs de moment de la queue (TM), de l'Olive Tail Moment (OTM) et du pourcentage d'ADN de la queue (16,30 % contre 8,97 % dans le groupe témoin) (tableau 7 et figure 20). Le traitement des rats avec l'extrait de *T. polium* avec 50 et 100 mg/kg n'a montré aucun effet évident sur le pourcentage d'ADN de la queue (8,26 % et 8,77 %, respectivement), de TM et de l'OTM par rapport au groupe témoin. Le traitement combiné par ces deux doses avec l'AFB₁ a permis de réduire d'une manière significative le pourcentage d'ADN de la queue de 12,34 % et 10,68 % par rapport au groupe traité par l'AFB₁ seul.

Tableau 7: Effet de l'extrait de *T. polium* sur la formation de la queue de comète dans les cellules de la moelle osseuse de rats traités à l'aflatoxine B₁

Groupes	% ADN de la queue	TM	OTM
	Moy % ± SE	Moy % ± SE	Moy % ± SE
Contrôle Négatif	8.97 ± 0.13 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.96 ± 0.04 ^a
<i>T. polium</i> (50)	8.26 ± 0.33 ^a	0.23 ± 0.03 ^a	0.99 ± 0.06 ^a
<i>T. polium</i> (100)	8.77 ± 0.26 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.04 ^a
AFB ₁ (80 µg/kg)	16.30 ± 0.47 ^d	0.69 ± 0.03 ^d	1.55 ± 0.04 ^c
AFB ₁ + <i>T. polium</i> (50)	12.34 ± 0.34 ^c	0.58 ± 0.04 ^c	1.33 ± 0.03 ^b
AFB ₁ + <i>T. polium</i> (100)	10.68 ± 0.25 ^b	0.42 ± 0.04 ^b	1.22 ± 0.04 ^b

La somme de 1000 cellules (200 cellules/rat) a été analysée à l'aide du logiciel automatique comet score™. Dans chaque colonne, les données avec des lettres différentes ont une signification statistique (P ≤ 0,05).

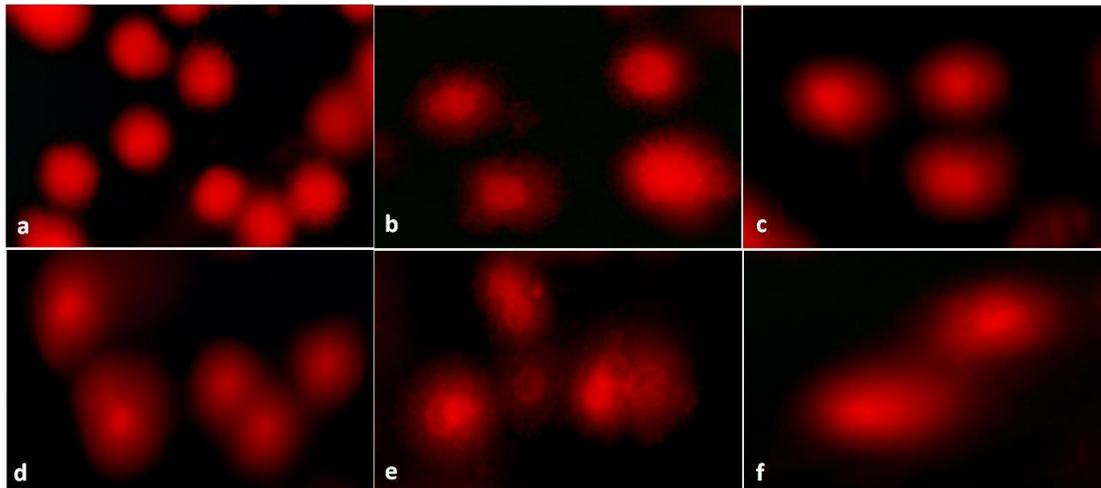


Figure 20: Photomicrographies de fluorescence de cellules de moelle osseuse de rat traitées par l'extrait de *T. polium* et l'AFB₁. (a) des cellules intactes ; (b-f) différents modèles de formation de queue de comète (pouvoir d'agrandissement original, 400×)

Les tests de micronoyaux (MN) et de comètes sont des tests génétiques très sensibles qui sont utilisés dans l'évaluation de la sécurité préclinique et pour l'évaluation des agents dangereux ayant un risque génétique pour les êtres humains. Les MN résultent de cassures chromosomiques ou de pertes chromosomiques dans les érythroblastes au cours de la division mitotique. Ces MN peuvent être visualisés dans le cytoplasme comme des corps extranucléaires allant de 1/5 à 1/20 du diamètre de l'érythrocyte polychromatique (PCE). Le test des comètes peut être visualisé par la migration accrue des produits de l'ADN cassés sous forme d'une queue de comète (Araldi et al., 2015). Dans cette étude, l'administration orale de l'AFB₁ a entraîné une

génétoxicité qui se traduit par l'augmentation des niveaux de MNPCE et la formation des queues de comète dans la moelle osseuse des rats. Ces résultats concordent avec les études *in vivo* et *in vitro* dans lesquelles l'AFB₁ induit des aberrations chromosomiques, des micronoyaux et des échanges de chromatides sœurs (Abdel-Wahhab et al., 2020b). En effet, comme mentionné ci-dessus, l'AFB₁ exerce sa génotoxicité à travers la liaison covalente entre l'intermédiaire réactif (AFB₁-8,9-oxyde, AFBO) et la molécule d'ADN au niveau de l'atome N₇ d'un résidu de guanine. Cette liaison entraîne la formation de lésions de l'ADN comme suit : (1) adduit trans-8, 9-dihydro-8-(N⁷-guanyl)-9-hydroxy-AFB₁ (AFB₁-N⁷-gua) très instable ; (2) site apurinique (AP) résultant de la dépurination de la charge positive dans l'anneau imidazole de l'adduit AFB₁-N⁷-gua ; et (3) les adduits AFB₁ formami-dopyrimidine (AFB₁-FAPY) résultant de l'ouverture de l'anneau imidazole de l'adduit AFB₁-N⁷-gua, dans des conditions légèrement alcalines.

Toutes ces lésions sont les principaux précurseurs de l'effet génotoxique de l'AFB₁ et sont éliminées par la voie de réparation par excision des nucléotides (Benkerroum, 2020 ; McCullough et Lloyd, 2019). De manière surprenante, l'administration orale de l'AFB₁ n'a pas modifié le taux de prolifération des érythroblastes, confirmant l'absence de sa cytotoxicité dans les cellules de la moelle osseuse des rats. De même, le traitement à l'AFB₁ (0,25 -1 mg/kg) n'a pas modifié le rapport PCE/NCE dans les cellules de la moelle osseuse (Escobar et al., 2019). Il semble donc que la cytotoxicité de l'AFB₁ soit basée sur la dose, la période d'exposition, la voie de traitement, l'organe cible et le degré de génotoxicité (McCullough et Lloyd, 2019).

Dans notre étude, l'administration orale répétée de deux semaines de deux doses d'extrait de *T. polium* a montré une génotoxicité négative dans le test de MN et le test des comètes sur des cellules de moelle osseuse de rat. Notre étude montre que *T. polium* a efficacement atténué les niveaux élevés de MNPCE et les paramètres de la queue de comète induits par l'AFB₁ dans les cellules de la moelle osseuse du rat. Ces résultats sont en accord avec des rapports précédents qui indiquent que les espèces de *Teucrium* (*T. polium*, *T. scordium*, *T. chamaedrys*, et *T. montanum*) possèdent une activité antimutagène, basée sur le micronoyau et l'échange de chromatides sœurs dans les lymphocytes du sang périphérique humain contre des médicaments cytotoxiques (Yuksel et al., 2019). De même, l'extrait aqueux de cette plante à des doses de 200 et 250 mg/kg inhibe l'apparition d'aberrations chromosomiques et l'échange de chromatides sœurs induits par le tétrachlorure de carbone dans la moelle osseuse de rat (Rahmouni et al., 2018). Ces données ont confirmé que l'activité inhibitrice du *T. polium* est attribuée à l'activité antioxydante de ses composés polyphénoliques, monoterpéniques et sesquiterpéniques qui

piègent l'AFBO avant d'attaquer les macromolécules et d'induire un stress oxydatif et des dommages à l'ADN. D'après notre analyse HPLC, la caféine, l'acide ellagique, l'acide coumarique, la vanilline, la naringénine, le gallate de propyle, la quercétine et la cinnamique étaient les principaux constituants de l'extrait de *T. polium*. Ces composés préviennent indirectement le stress oxydatif par deux voies principales : (1) la suppression des enzymes de phase I CYP450 qui sont responsables de la bioactivation de l'AFB₁ en métabolites hautement réactifs (Peterson et al., 2006) ; (2) la stimulation des enzymes métaboliques de phase II responsables de la détoxification des mutagènes (Baali et al., 2016).

c) Effets sur l'ARNm des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans le foie

L'effet de l'AFB₁, de l'extrait de *T. polium* et de leur combinaison sur l'expression des gènes pro-inflammatoires en mesurant l'expression des gènes du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), de l'interleukine-1 bêta (IL-1 β), de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'interleukine-6 (IL6) dans les tissus hépatiques à l'aide de la RT-PCR est illustré dans les figures (21-24). Les résultats ont montré une augmentation significative du niveau d'ARNm de l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL6 et le TNF- α dans le groupe traité par l'AFB₁ par rapport au groupe témoin ($p < 0,05$). L'administration de l'extrait de *T. polium* seul avec les deux doses a entraîné une augmentation non significative des niveaux de tous les gènes pro-inflammatoires testés par rapport au groupe témoin. De façon intéressante, le co-traitement par l'AFB₁ et l'extrait de *T. polium* aux deux doses a montré un effet inverse sur l'augmentation induite par l'AFB₁ en provoquant une diminution significative des niveaux d'expression des gènes testés : IL-1 β , IL-2, IL6 et TNF- α par rapport au groupe traité par l'AFB₁.

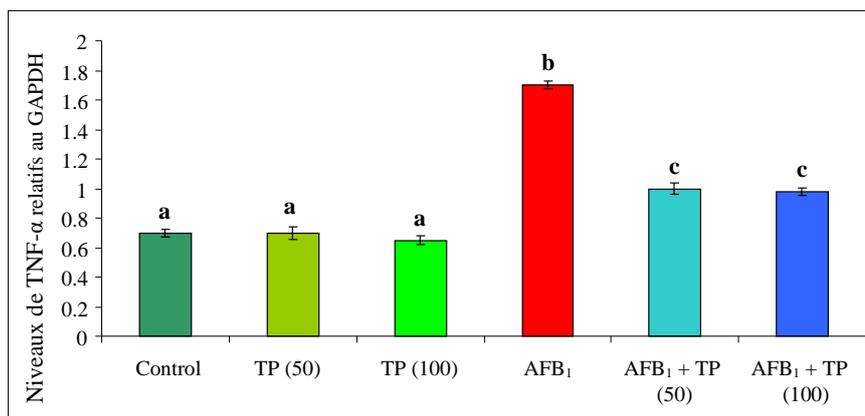


Figure 21: Effet de l'AFB₁, de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène TNF- α dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM de dix échantillons. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

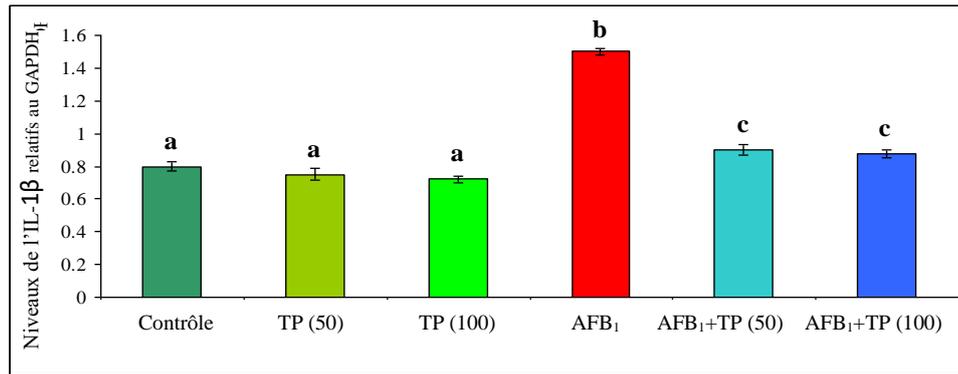


Figure 22: L'effet de l'AFB₁, de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène IL-1β dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM de dix échantillons. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

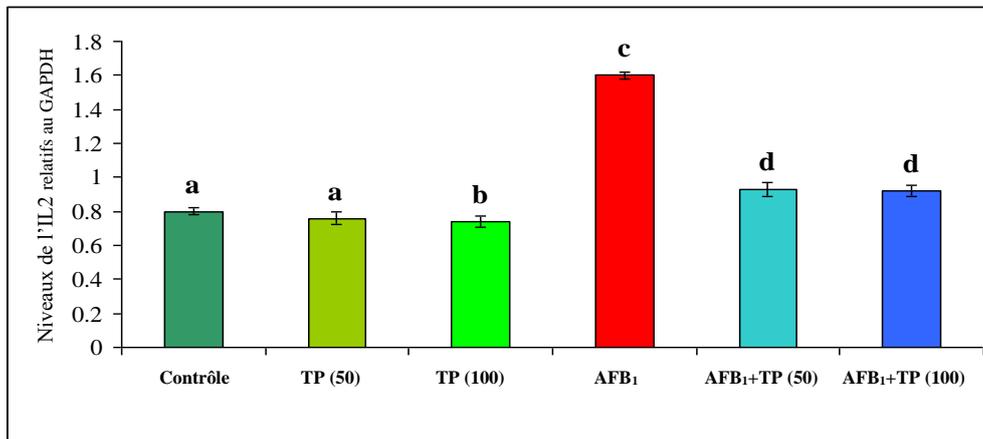


Figure 23: Effet de l'AFB₁, de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène IL-2 dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM de dix échantillons. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

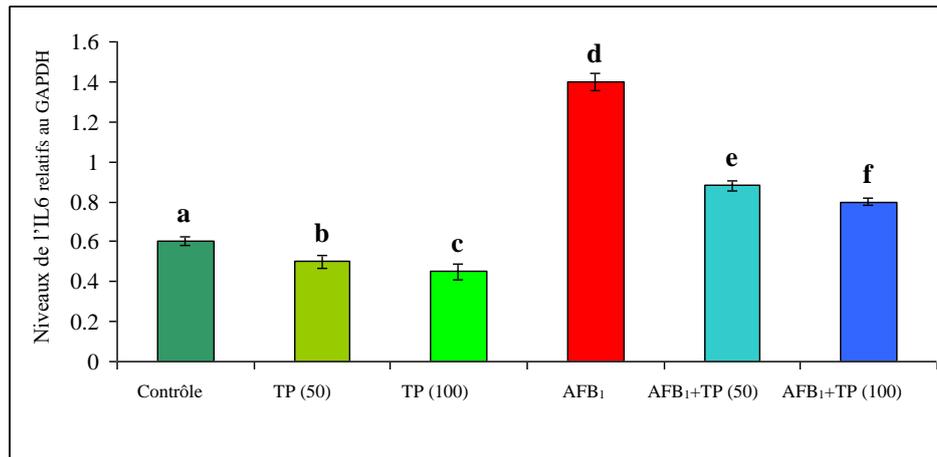


Figure 24 : Effet de l'AFB₁, de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène IL-6 dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne \pm SEM de dix échantillons. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$.

d) Effet sur l'expression du facteur (Nrf2) et de l'oxyde nitrique inductible dans le foie

Afin de déterminer les effets de l'extrait de *T. polium* sur l'expression du facteur de transcription : nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) et de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) chez les rats exposés à l'AFB₁, une analyse PCR semi-quantitative a été réalisée dans la présente étude. Les résultats ont révélé que le traitement par AFB₁ a induit une régulation négative de l'expression de Nrf2 accompagnée d'une régulation positive de celle de l'iNOS ($p < 0,05$, Figures 25 et 26), par rapport au témoin. Le traitement avec l'extrait seul de *T. polium* (50 mg/kg) a diminué de manière significative l'expression de l'ARNm de Nrf2 et a augmenté l'expression de l'ARNm de l'iNOS. Cependant, la dose élevée de *T. polium* (100 mg/kg) n'a pas affecté l'expression de ces deux gènes. D'autre part, le co-traitement avec l'AFB₁ et l'extrait a induit une amélioration significative de l'expression de l'ARNm des gènes testés (Figures 25 et 26).

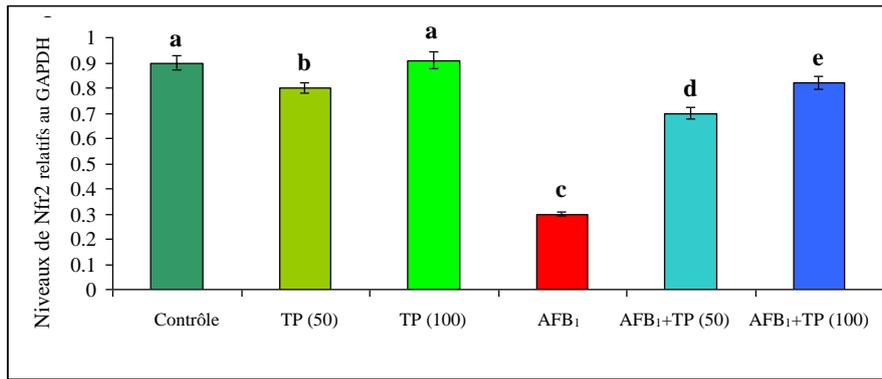


Figure 25: Effet de l'AFB₁, de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène Nrf2 dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM de dix échantillons. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

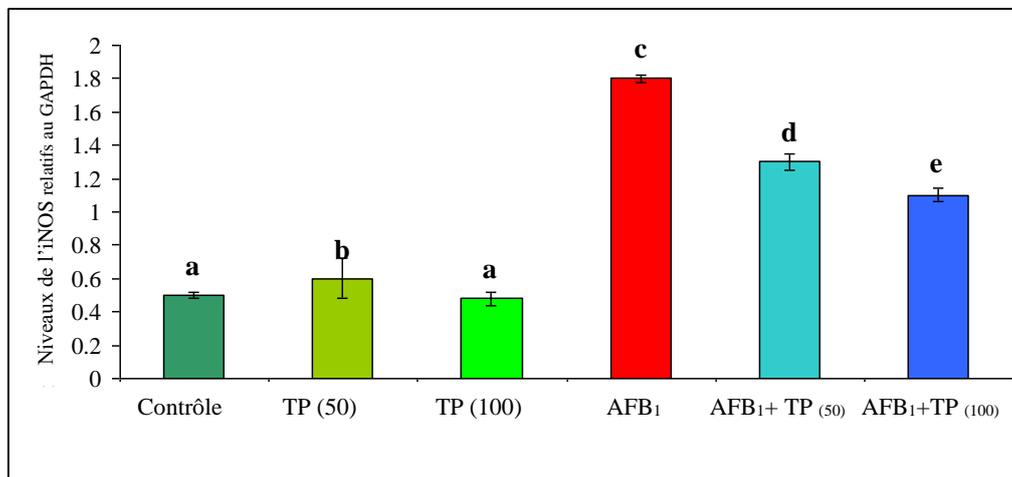


Figure 26: Effet de l'AFB₁, de l'extrait et de leur combinaison sur les niveaux d'expression du gène iNOS dans le foie de rat. Les résultats sont présentés par la moyenne ± SEM de dix échantillons. Les moyennes portant des lettres différentes sont significativement différentes à $P \leq 0,05$

Les résultats obtenus ont clairement indiqué que l'AFB₁ a perturbé l'expression de l'ARNm des cytokines qui sont des médiateurs cruciaux de la fonction immunitaire et de la réponse inflammatoire. Les cellules T et B ainsi que les macrophages sont les principales cibles de plusieurs mycotoxines, dont l'AFB₁, qui peuvent être immunosuppressives ou immunostimulantes (Reddy et al., 2018). Il a été rapporté que les mycotoxines peuvent augmenter (Choi et al., 2013 ; Lessard et al., 2015) ou réduire les niveaux d'ARNm des cytokines inflammatoires (Choi et al., 2013 ; Ghareeb et al., 2013). Dans notre étude, l'administration d'AFB₁ a augmenté l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL6 et de TNF- α . Ces données sont cohérentes avec des résultats précédemment rapportés qui ont suggéré que

l'AFB₁ augmente l'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires (Qian et al., 2014). En outre, une étude antérieure a indiqué que l'effet de l'AFB₁ sur ces cytokines inflammatoires dépend de la durée d'exposition, de la dose, de l'espèce animale, de la sensibilité des tissus ainsi que des autres conditions expérimentales (Hou et al., 2022). Par conséquent, l'augmentation de l'expression de l'ARNm des cytokines pro-inflammatoires signalée ici peut être attribuée à la suppression des cytokines pro-inflammatoires induite par l'AFB₁. Dans le même contexte, on a constaté que l'AFB₁ augmente l'expression de l'ARNm de NF- κ B, I κ B- α , TNF- α , IL-6 et IL-1 β , ce qui entraîne une réponse inflammatoire remarquable dans le tissu hépatique (Guo et al., 2022). En outre, Long et al. (2018) ont déclaré que l'administration de l'AFB₁ (100 μ g/kg) augmente significativement l'expression protéique de TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans le tissu de la rate des souris, ce qui confirme la toxicité immunitaire de l'AFB₁ (Pelyhe et al., 2018). Ces auteurs ont confirmé que l'AFB₁ active la voie de signalisation NF- κ B entraînant ainsi une réponse inflammatoire. En outre, le TNF- α est reconnu comme la cytokine pro-inflammatoire la plus importante qui contribue à l'activation de NF- κ B, induisant l'expression de l'IL-6, l'IL-1 β et l'iNOS, ainsi que d'autres médiateurs inflammatoires (Rajendran et al., 2018).

Par conséquent, les résultats actuels indiquent que l'AFB₁ a favorisé l'expression de l'ARNm des facteurs inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α) et des médiateurs inflammatoires (iNOS), de manière similaire aux résultats rapportés précédemment (Gao et al., 2021). D'autre part, l'AFB₁ a provoqué une baisse de l'expression de l'ARNm de Nrf2, qui fonctionne comme un récepteur activé par les xénobiotiques (XAR) pour la régulation de la réponse adaptative aux oxydants et aux électrophiles (Ma et He, 2012). Ces résultats concordent avec des études précédentes qui indiquent que l'Nrf2 joue un rôle critique dans la régulation du stress oxydatif et confirment que la réponse antioxydante dépendante de Nrf2 est un facteur contribuant à l'activité hépato-protectrice (Guo et al., 2018). En plus, l'Nrf2 joue un rôle direct dans l'augmentation de la résistance à l'apoptose grâce à son rôle dans l'induction de l'expression de Bcl-2 (Niture et Jaiswal, 2012). L'administration conjointe de l'AFB₁ et de l'extrait de *T. polium* régule l'expression de l'ARNm des gènes testés, ce qui suggère que cet effet protecteur est contrôlé par un mécanisme dépendant de Nrf2, de même que la diminution de l'expression de l'ARNm de l'iNOS, qui peut être considérée comme un autre mécanisme du rôle protecteur de l'extrait de *T. polium*.

3.5.3 Analyse histologique

L'examen histologique de la section hépatique des rats témoins a montré une structure histologique normale, des hépatocytes distincts réguliers avec des espaces sinusoidaux disposés radialement autour de la veine centrale (Fig. 27). La section du foie des rats traités avec l'extrait de *T. polium* aux doses de 50 et 100 mg/kg a montré une structure histologique normale des hépatocytes et des sinusoides sanguins (Fig. 28 et 29). L'examen des coupes de foie des rats traités avec l'AFB₁ a montré une dégénérescence des hépatocytes, une vacuolisation du cytoplasme, une nécrose éosinophile, une veine centrale congestionnée et une fibrose autour de la zone portale (Fig. 30). Cependant, l'examen des sections du foie des rats traités avec la combinaison AFB₁-extrait aux deux doses a montré la restauration de l'architecture normale du foie, de la veine centrale, des hépatocytes, de la zone portale et des sinusoides (Fig 31a, b).

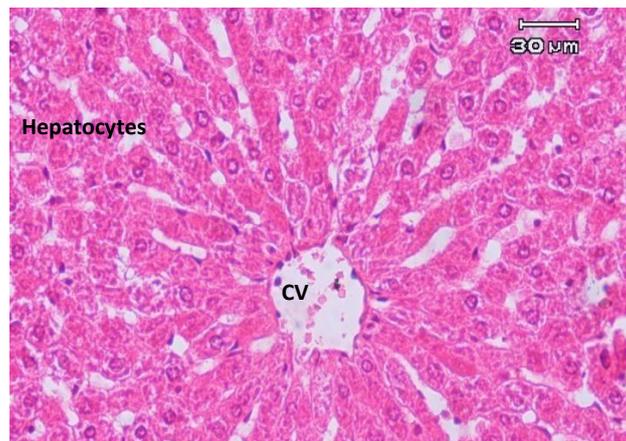


Figure 27: Photomicrographie d'une coupe du foie des rats témoins montrant une structure histologique normale, des hépatocytes réguliers et distincts avec des espaces sinusoidaux disposés radialement autour de la veine centrale.

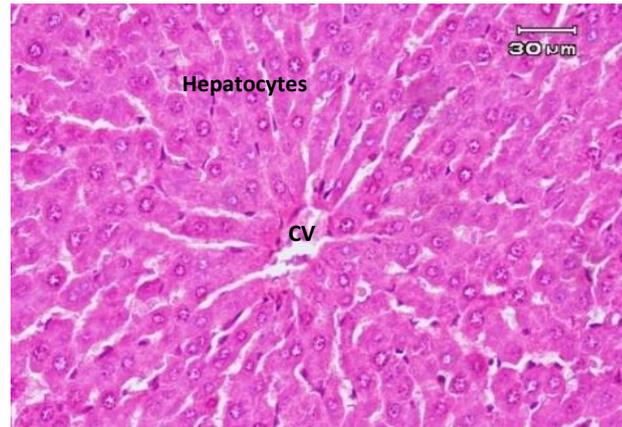


Figure 28: Photomicrographie d'une section du foie des rats traités avec 50 mg/kg de l'extrait de *T. Polium* montrant une structure histologique normale des hépatocytes et des sinusoides sanguins.

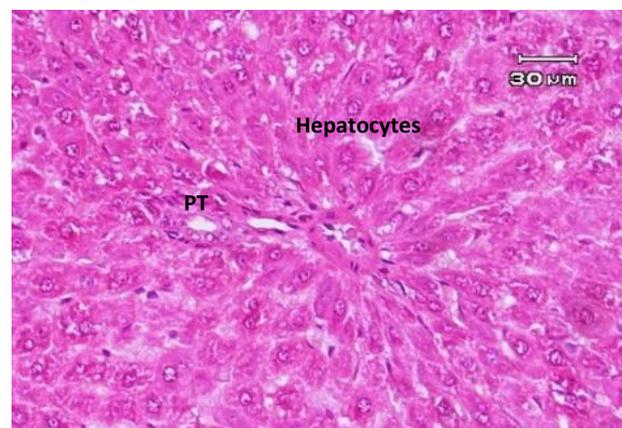


Figure 29: Photomicrographie du foie des rats traités avec 100 mg/kg de l'extrait montrant des hépatocytes normaux autour de la zone portale (PT).

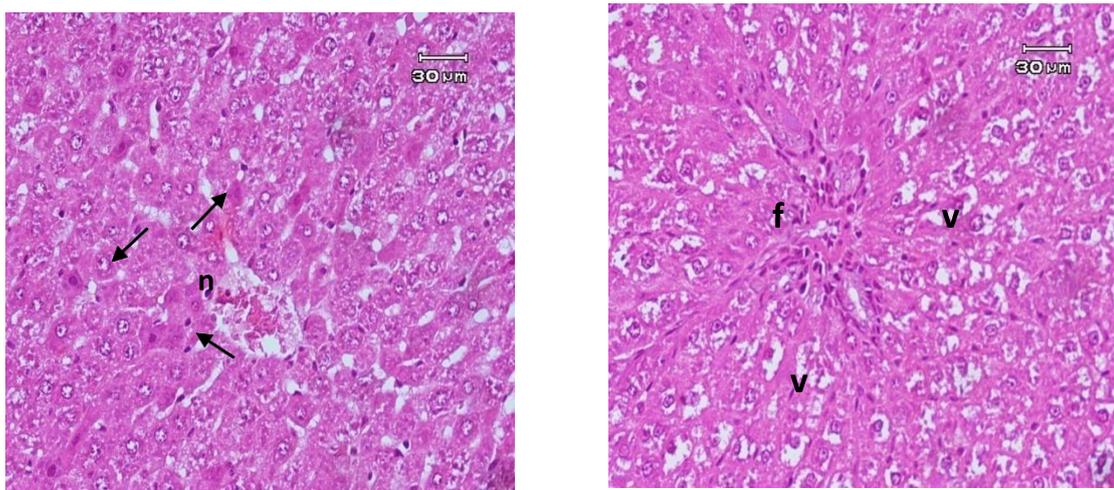


Figure 30: Photomicrographies de sections de foie de rats traités avec l'AFB₁

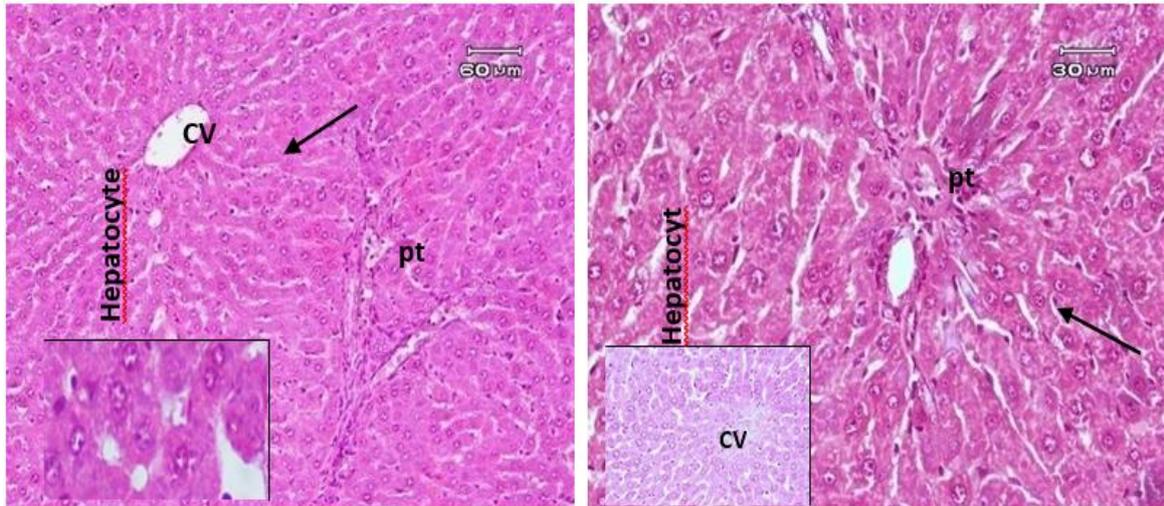


Figure 31: Photomicrographies de sections de foie de rats traités avec (a) AFB₁ plus l'extrait à 50 mg/kg et (b) AFB₁ plus l'extrait à 100 mg/kg.

Les altérations histologiques du tissu hépatique induites par l'AFB₁ confirment les résultats biochimiques précédemment obtenus qui ont induit une dégénérescence des hépatocytes, une vacuolisation du cytoplasme, une nécrose, une veine centrale congestionnée et une fibrose. Des résultats similaires ont été obtenus par des travaux antérieurs, qui ont montré que l'administration de l'AFB₁ induit une hyperplasie du canal biliaire et une fibrose autour de la zone portale (Abdel- Latif et al., 2017 ; Ali et al., 2021). Nos observations suggèrent que l'AFB₁ est extrêmement hépatotoxique et déclenche plusieurs altérations histologiques dans le tissu hépatique similaires à celles rapportées dans la littérature et confirment que le foie est le principal organe cible de la toxicité de l'AFB₁ (Abdel-Wahhab et al., 2015 ; Li et al., 2018 ; Fouad et al., 2019).

Des études antérieures ont démontré le rôle puissant des antioxydants provenant de différentes sources telles que les plantes pour diminuer le risque d'hépatotoxicité et de toxicité rénale causée par l'exposition aux aflatoxines (Eftekhari et al., 2018 ; Wang et al., 2019). Dans notre étude, l'administration de l'extrait de *T. polium* seul avec les deux doses n'a pas affecté de manière significative la structure histologique normale des hépatocytes, ce qui suggère l'innocuité de l'extrait et de ses composés phytochimiques comme il a été confirmé dans les études antérieures (Alreshidi et al., 2020 ; Noumi et al., 2020 ; Rahmouni et al., 2022). En outre, l'administration concomitante de l'extrait avec l'AFB₁ a amélioré la structure histologique du tissu hépatique chez les rats. Ces résultats confirment l'effet hépatoprotecteur de *T. polium* aux doses utilisées qui sont très loin de la DL₅₀ de la plante établie chez les rats et les souris avec

des valeurs de l'ordre de 8 et 16 g/kg de poids corporel, respectivement. (Rasekh et al., 2005 ; Meguellati et al., 2019).

Conclusion

Conclusion

Les travaux ayant fait l'objet de cette étude ont permis d'établir que les extraits de *T. polium* sont riches en composés polyphénoliques avec des profils qualitatifs très intéressants marqués par la présence de trois principaux flavonoïdes par ordre d'abondance décroissant, la naringénine, la quercétine et l'acide ellagique.

Dans un premier temps, nous avons établi *in vitro* diverses activités biologiques particulièrement l'activité antioxydante et cytotoxique. Des résultats obtenus au niveau de l'activité antioxydante, il ressort que ces extraits présentent une capacité de piégeage très appréciable sur deux types de radicaux (DPPH, de l'ABTS). Ce même effet est aussi obtenu avec les tests de chélation de métaux (CUPRAC) et le test de pouvoir. Au niveau de l'étude cytotoxique, il semble que les extraits testés ont inhibé la prolifération des cellules MCF-7 d'une manière dose-dépendante avec des IC_{50} appréciables pour les extraits méthanolique, éthanolique et aqueux.

Dans une seconde étape, les travaux ont été focalisés sur l'établissement de divers effets, *in vivo*, de l'extrait méthanolique sur le poids corporel, les bilans hépatique et rénal, le profile lipides, les marqueurs tumoraux et la génotoxicité des rats préalablement intoxiqués par l'aflatoxine B₁.

L'extrait de *T. polium* a amélioré de manière significative le poids corporel chez les rats prétraités avec l'AFB₁. De plus, cet extrait aux doses de 50 et de 100 mg/kg a montré des activités hépato et néphro-protectrices en rétablissant les valeurs des marqueurs sériques du foie (l'ALT, l'AST et l'ALP) et des reins (la créatinine, l'urée et l'acide urique). Ces marqueurs ont été restauré presque à leurs niveaux normaux. Concernant le profile lipidique, le traitement des rats par l'extrait a réduit d'une manière significative les niveaux du cholestérol, de TG et de LDL et il a amélioré le taux de l'HDL. Un effet positif de l'extrait sur le statut oxydatif a été également démontré après son administration chez les rats intoxiqués par l'AFB₁. En effet, les niveaux des biomarqueurs de stress oxydatif évalués dans le foie et les reins (MDA, TAC, GPx et CAT) ont été rétablis à leurs limites normales. En outre, une activité anticancéreuse de l'extrait de *T. Polium* a été bien établie en diminuant les taux des marqueurs tumoraux (AFP, CEA et TNF α) d'une manière significative chez les rats intoxiqués.

De plus, la génotoxicité induite par l'AFB₁ a été diminuée par l'extrait de *T. polium* d'une manière significative où le pourcentage de MNPCes à 0,28% et de l'ADN de la queue à 10,68 % sont réduits en utilisant les tests de micronoyau de des comètes respectivement. De même, les resultats obtenus montrent que cet extrait semble avoir un effet régulateur sur l'expression

de l'ARNm des gènes des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL6) dans les tissus hépatiques. A la lumière de ces résultats, obtenus il apparait que l'extrait de *T.polium* est très efficace pour prévenir les lésions induites par l'aflatoxine B₁ chez les rats en restaurant à la fois les niveaux des marqueurs biochimiques du foie et des reins ainsi que le statut oxydant/antioxydant qui est à l'origine du rétablissement de la morphologie histologique de ces organes.

Ces résultats sont d'une très grande importance et justifient l'usage médicinales de *Teucrium polium* comme source de substances bioactives douées de différentes activités pharmaco-biologiques antioxydante, antiinflammatoire, antiproliférative, hepato et néphroprotectrice et dépourvue de toute cytotoxicité. Toutefois ces résultats doivent être approfondie dans la perspective d'utiliser cette plante dans la phytothérapie.

Références bibliographiques

Abdel-Latif, M.S., Elmeleigy, K.M., Aly, T.A., Khattab, M.S., Mohamed, S.M., 2017. Pathological and biochemical evaluation of coumarin and chlorophyllin against aflatoxicosis in rat. *Exp. Toxicol. Pathol.* 69, 285–291.

Abdel-Wahhab, M. A., Ahmed, H., Hanaa, et Hagazi, M. M. (2006). Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts. *Journal of Applied Toxicology*, 26(3), 229-238. <https://doi.org/10.1002/jat.1127>

Abdel-Wahhab, M. A., et Aly, S. E. (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 25(3), 218-223. <https://doi.org/10.1002/jat.1057>

Abdel-Wahhab, M. A., El-Nekeety, A. A., Hathout, A. S., Salman, A. S., Abdel-Aziem, S. H., Hassan, N. S., et Abdel-Aziz, M. S. (2020). Secondary metabolites from *Bacillus* sp. MERN97 extract attenuates the oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity of aflatoxin B1 in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111399. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111399>

Abdel-Wahhab, M. A., Hassan, N. S., El-Kady, A. A., Khadrawy, Y. A., El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Sharaf, H. A., et Mannaa, F. A. (2010). Red ginseng extract protects against aflatoxin B1 and fumonisins-induced hepatic pre-cancerous lesions in rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(2), 733-742. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.006>

Adlercreutz, H., et Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29(2), 95-120. <https://doi.org/10.3109/07853899709113696>

Adom, K. K., et Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182-6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)

Ali, F.A.Z., Abdel-Maksoud, F.M., Abd Elaziz, H.O., Al-Brakati, A., Elmahallawy, E.K., 2021. Descriptive histopathological and ultrastructural study of hepatocellular alterations induced by aflatoxin B1 in rats. *Animals (Basel)* 11 (2), 509.

Allahtavakoli, M., Moradi, R., Shamsi, S., et Afsharmanesh, K. (s. d.). *Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Teucrium Polium on Castor Oil-Induced Diarrhea in Male Rat*.

Alreshidi, M., Noumi, E., Bouslama, L., Ceylan, O., Veetil, V.N., Adnan, M., Danciu, C., Elkahoui, S., Badraoui, R., Al-Motair, K.A., Patel, M., De Feo, V., Snoussi, M., 2020. Phytochemical screening, antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic, and anti-quorum-sensing properties of *Teucrium polium* L. aerial parts methanolic extract. *Plants* 9, 1418.

Ameen Abdulmajeed, N. (2011). Therapeutic ability of some plant extracts on aflatoxin B1 induced renal and cardiac damage. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.005>

Amini, R., Nosrati, N., Yazdanparast, R., et Molaei, M. (2009). *Teucrium polium* in prevention of steatohepatitis in rats. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 29(8), 1216-1221. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2009.02033.x>

Amini, R., et Yazdanparast, R. (2009). Suppression of hepatic TNF- α and TGF- β gene expressions in rats with induced nonalcoholic steatohepatitis. *Pharmacology online*, 3, 340-350.

- Amini, R., Yazdanparast, R., Aghazadeh, S., et Ghaffari, S. H. (2011). *Teucrium polium* reversed the MCD diet-induced liver injury in rats. *Human et Experimental Toxicology*, 30(9), 1303-1312. <https://doi.org/10.1177/0960327110388961>
- Aoyama, T., Yamano, S., Guzelian, P. S., Gelboin, H. V., et Gonzalez, F. J. (1990). Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4790-4793. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4790>
- Apak, R., Güçlü, K., Ozyürek, M., et Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine : CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Arabshahi, D, S., Vishalakshi Devi, D., et Urooj, A. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, 100(3), 1100-1105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.014>
- Araldi, R. P., de Melo, T. C., Mendes, T. B., de Sá Júnior, P. L., Nozima, B. H. N., Ito, E. T., ... & de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 72, 74-82.
- Autore, G., Capasso, F., De Fusco, R., Fasulo, M. P., Lembo, M., Mascolo, N., et Menghini, A. (1984). Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L.). *Pharmacological Research Communications*, 16(1), 21-29. [https://doi.org/10.1016/s0031-6989\(84\)80101-0](https://doi.org/10.1016/s0031-6989(84)80101-0)
- Baali, N., Belloum, Z., Baali, S., Chabi, B., Pessemesse, L., Fouret, G., Ameddah, S., Benayache, F., Benayache, S., Feillet-Coudray, C., Cabello, G., Wrutniak-Cabello, C., 2016. Protective activity of total polyphenols from *Genista quadriflora* Munby and *Teucrium polium* geyrii Maire in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Nutrients* 8, 193. <https://doi.org/10.3390/nu8040193>.
- Bagci, E., Yazgin, A., Hayta, S., et Cakilcioglu, U. (2010). Composition of the essential oil of *Teucrium chamaedrys* L.(Lamiaceae) from Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(23), 2588-2590.
- Bakheet, S. A., Alhuraishi, A. M., Al-Harbi, N. O., Al-Hosaini, K. A., Al-Sharary, S. D., Attia, M. M., Alhoshani, A. R., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M., Imam, F., Ahmad, S. F., et Attia, S. M. (2016). Alleviation of Aflatoxin B1-Induced Genomic Damage by Proanthocyanidins via Modulation of DNA Repair. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30(11), 559-566. <https://doi.org/10.1002/jbt.21823>
- Barber, M. D., McMillan, D. C., Wallace, A. M., Ross, J. A., Preston, T., & Fearon, K. C. H. (2004). The response of leptin, interleukin-6 and fat oxidation to feeding in weight-losing patients with pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, 90(6), 1129-1132.
- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., Angeli, J. P. F., Serpeloni, J. M., Rocha, B. A., Bastos, J. K., et Barbosa Jr, F. (2011). Evaluation of Antigenotoxic Effects of Plant Flavonoids Quercetin and Rutin on HepG2 Cells. *Phytotherapy Research*, 25(9), 1381-1388. <https://doi.org/10.1002/ptr.3436>
- Belmekki, N., Bendimerad, N., Bekhechi, C., et Fernandez, X. (s. d.). *Chemical analysis and antimicrobial activity of Teucrium polium L. essential oil from Western Algeria*.
- Benkerroum, N. (2020). Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins : Mechanisms of Action. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 423. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020423>
- Bennett, J. W., et Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>

- Bhattacharya, R. K., et Firozi, P. F. (1988). Effect of plant flavonoids on microsome catalyzed reactions of aflatoxin B1 leading to activation and DNA adduct formation. *Cancer Letters*, 39(1), 85-91. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90043-2)
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., et Ruberto, G. (2013). Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria) : An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 395-402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.082>
- Bruce, S. O. (2022). Secondary Metabolites from Natural Products. In *Secondary Metabolites—Trends and Reviews*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102222>
- Bucolo, G., et David, H. (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*, 19(5), 476-482.
- Buzanovskii, V. A. (2017). Determination of proteins in blood. Part 1 : Determination of total protein and albumin. *Review Journal of Chemistry*, 7(1), 79-124. <https://doi.org/10.1134/S2079978017010010>
- Campos-da-Paz, M., Dórea, J. G., Galdino, A. S., Lacava, Z. G. M., et de Fatima Menezes Almeida Santos, M. (2018). Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Hepatic Metastasis in Colorectal Cancer : Update on Biomarker for Clinical and Biotechnological Approaches. *Recent Patents on Biotechnology*, 12(4), 269-279. <https://doi.org/10.2174/1872208312666180731104244>
- Capasso, F., Cerri, R., Morrica, P., et Senatore, F. (1983). Chemical composition and anti-inflammatory activity of an alcoholic extract of *Teucrium polium* L. *Bollettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale*, 59(11), 1639-1643.
- Chandrasekara, A., et Shahidi, F. (2010). Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6706-6714. <https://doi.org/10.1021/jf100868b>
- Chasampalioti, M., Green, A. R., Ellis, I. O., Rakha, E. A., Jackson, A. M., Spendlove, I., et Ramage, J. M. (2018). Connexin 43 is an independent predictor of patient outcome in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-018-5063-9>
- Choi, B.K., Jeong, S.H., Cho, J.H., Shin, H.S., Son, S.W., Yeo, Y.K., Kang, H.G., 2013. Effects of oral deoxynivalenol exposure on immune-related parameters in lymphoid organs and serum of mice vaccinated with porcine parvovirus vaccine. *Mycotoxin Res.* 29, 185–192
- Choi, K. C., Chung, W. T., Kwon, J. K., Yu, J. Y., Jang, Y. S., Park, S. M., Lee, S. Y., et Lee, J. C. (2010). Inhibitory effects of quercetin on aflatoxin B1-induced hepatic damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2747-2753. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.001>
- Christodoulakis, N. S., Kogia, D., Mavroeidi, D., et Fasseas, C. (2010). Anatomical and histochemical investigation of the leaf of *Teucrium polium*, a pharmaceutical sub-shrub of the Greek phrygic formations. *Journal of Biological Research*, 14, 199-209.
- Chung, Y. C., Chen, S. J., Hsu, C. K., Chang, C. T., & Chou, S. T. (2005). Studies on the antioxidative activity of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther. *Food Chemistry*, 91(3), 419-424.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., et Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110(3), 659-669. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.060>
- Costa, S., Utan, A., Speroni, E., Cervellati, R., Piva, G., Prandini, A., et Guerra, M. C. (2007). Carnosic acid from rosemary extracts : A potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study. *Journal of Applied Toxicology*, 27(2), 152-159. <https://doi.org/10.1002/jat.1186>

- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E., et Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy Research: PTR*, 17(2), 194-195. <https://doi.org/10.1002/ptr.1261>
- Cubas-Gaona, L. L., de Francisco, P., Martín-González, A., et Gutiérrez, J. C. (2020). Tetrahymena Glutathione Peroxidase Family: A Comparative Analysis of These Antioxidant Enzymes and Differential Gene Expression to Metals and Oxidizing Agents. *Microorganisms*, 8(7), 1008. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071008>
- Culioli, G., Mathe, C., Archier, P., et Vieillescazes, C. (2003). A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry*, 62(4), 537-541. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00538-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00538-1)
- Das, J., Ramani, R., et Suraju, M. O. (2016). Polyphenol Compounds and PKC Signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1860(10), 2107-2121. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.022>
- De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., Evangelista, G., et Iorizzi, M. (2012). Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.054>
- Desai SN, Patel DK, Devkar RV, Patel PV, Ramachandran A. 2012. Hepatoprotective potential of polyphenol rich extract of *Murraya koenigii* L.: an in vivo study. *Food Chem Toxicol*. 50:310–314.
- Dewick, P. 2009. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach, Third Edition, West Sussex: John Wiley et Sons Ltd.
- Dhyani, P., Quispe, C., Sharma, E., Bahukhandi, A., Sati, P., Attri, D. C., Szopa, A., Sharifi-Rad, J., Docea, A. O., Mardare, I., Calina, D., et Cho, W. C. (2022). Anticancer potential of alkaloids : A key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer Cell International*, 22(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02624-9>
- Diab, K. A., Fahmy, M. A., Hassan, Z. M., Hassan, E. M., Salama, A. B., et Omara, E. A. (2018). Genotoxicity of carbon tetrachloride and the protective role of essential oil of *Salvia officinalis* L. in mice using chromosomal aberration, micronuclei formation, and comet assay. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(2), 1621-1636. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0601-2>
- Djabou, N., Muselli, A., Allali, H., Dib, M. E. A., Tabti, B., Varesi, L., et Costa, J. (2012). Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 83, 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.019>
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., et Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Djordjevic, O., Jakovljevic, M., Markovic, A., Stankovic, M., Ciric, A., Marinkovic, D., et Grujicic, D. (2018). Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turkish Journal of Biology*, 42(2), 152-162. <https://doi.org/10.3906/biy-1707-36>
- Do, J. H., et Choi, D.-K. (2007). Aflatoxins : Detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(6), 585-593. <https://doi.org/10.1007/BF02931073>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., et Ju, Y.-H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>

- Doumas, B. T., Watson, W. A., et Biggs, H. G. (1971). Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 31(1), 87-96. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(71\)90365-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(71)90365-2)
- Du, Y., Guo, H., et Lou, H. (2007). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1695-1701. <https://doi.org/10.1021/jf063071b>
- Dubrovina, A. S., et Kiselev, K. V. (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta*, 246(4), 597-623. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2730-8>
- Eftekhari, A., Ahmadian, E., Panahi-Azar, V., Hosseini, H., Tabibiazar, M., et Maleki Dizaj, S. (2018). Hepatoprotective and free radical scavenging actions of quercetin nanoparticles on aflatoxin B1-induced liver damage: In vitro/in vivo studies. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(2), 411-420. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1315427>
- El Atki, Y., Aouam, I., Taroq, A., Lyoussi, B., Taleb, M., et Abdellaoui, A. (2019). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of extracts from *Teucrium polium* growing wild in Morocco. *Materials Today: Proceedings*, 13, 777-783.
- El-Agamy, D. S. (2010). Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Archives of Toxicology*, 84(5), 389-396. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0511-2>
- El-Nekeety, A. A., Mohamed, S. R., Hathout, A. S., Hassan, N. S., Aly, S. E., et Abdel-Wahhab, M. A. (2011). Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 57(7-8), 984-991. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.021>
- El-Sayed Mostafa, H., Ahmed Allithy, A. N., Abdellatif, N. A., Anani, M., Fareed, S. A., El-Shafei, D. A., et Alaa El-Din, E. A. (2021). Amelioration of pulmonary aflatoxicosis by green tea extract: An in vivo study. *Toxicon*, 189, 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.11.009>
- Eraslan, G., Akdoğan, M., Yarsan, E., Şahindokuyucu, F., Eşsiz, D., & Altıntaş, L. (2005). The effects of aflatoxins on oxidative stress in broiler chickens. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29(3), 701-707.
- Eraslan, G., Sarıca, Z. S., Bayram, L. Ç., Tekeli, M. Y., Kanbur, M., et Karabacak, M. (2017). The effects of diosmin on aflatoxin-induced liver and kidney damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36), 27931-27941. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0232-7>
- Escobar, F.M., Magnoli, A., Sabini, M.C., Cariddi, L.N., Bagnis, G., Soltermann, A., Cavaglieri, L., 2019. *Minthostachys verticillata* essential oils as potential phyto-genic additives and chemoprotective strategy on aflatoxin B1 toxicity. *J. Appl. Anim. Res.* 47, 217–222
- Fabiny, D. L., et Ertingshausen, G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical Chemistry*, 17(8), 696-700.
- Faehnrich, B., Franz, C., Nemaz, P., et Kaul, H.-P. (2021). Medicinal plants and their secondary metabolites – State of the art and trends in breeding, analytics and use in feed supplementation– with special focus on German chamomile. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 94, 61-74. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2021.094.008>
- Fan, T., Xie, Y., et Ma, W. (2021). Research progress on the protection and detoxification of phytochemicals against aflatoxin B1-Induced liver toxicity. *Toxicon*, 195, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.03.007>

- Fawcett, J. K., et Scott, J. E. (1960). A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology*, 13(2), 156-159. <https://doi.org/10.1136/jcp.13.2.156>
- Fouad, A.M., Ruan, D., El-Senousey, H.K., Chen, W., Jiang, S., Zheng, C., 2019. *Harmful effects and control strategies of aflatoxin B1 produced by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus strains on poultry*. *Toxins* 11 (3), 176–193.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., et Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499-502.
- Galati, G., et O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics : Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology et Medicine*, 37(3), 287-303. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>
- Galle, P. R., Foerster, F., Kudo, M., Chan, S. L., Llovet, J. M., Qin, S., Schelman, W. R., Chintharlapalli, S., Abada, P. B., Sherman, M., et Zhu, A. X. (2019). Biology and significance of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Liver International*, 39(12), 2214-2229. <https://doi.org/10.1111/liv.14223>
- Gao, X., Xu, J., Jiang, L., Liu, W., Hong, H., Qian, Y., Li, S., Huang, W., Zhao, H., Yang, Z., Liu, Q., Wei, Z., 2021. Morin alleviates aflatoxin B1-induced liver and kidney injury by inhibiting heterophil extracellular traps release, oxidative stress and inflammatory responses in chicks. *Poultry Sci.* 100 (12), 101513 <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101513>.
- Ghareeb, K., Awad, W.A., Soodoi, C., Sasgary, S., Strasser, A., B'ohm, J., 2013. Effects of feed contaminant deoxynivalenol on plasma cytokines and mRNA expression of immune genes in the intestine of broiler chickens. *PLoS One* 8, e71492.
- García-Aguilar, A., Palomino, O., Benito, M., et Guillén, C. (2021). Dietary Polyphenols in Metabolic and Neurodegenerative Diseases : Molecular Targets in Autophagy and Biological Effects. *Antioxidants*, 10(2), 142. <https://doi.org/10.3390/antiox10020142>
- Garcia-Cohen, E. C., Marin, J., Diez-Picazo, L. D., Baena, A. B., Salaces, M., et Rodriguez-Martinez, M. A. (2000). Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats : Role of cyclooxygenase-2 isoform. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(1), 75-81.
- Gharaibeh, M., Elayan, H., et Salhab, A. (1989). Anorexic effect of *Teucrium polium* in rats. *International Journal of Crude Drug Research*, 27, 201-210.
- Ghori, S. S., Ahmed, M. I., Mohammed, A., et Khateeb, M. S. (2016). *Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of formulation containing camphor, menthol and thymol*. 8, 271-274.
- Ginouves, M., Carme, B., Couppie, P., et Prevot, G. (2014). Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(6), 2131-2138. <https://doi.org/10.1128/JCM.00201-14>
- Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A. K., et Vernekar, S. N. (2010). Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Sciences*, 2(4), 4.
- Grosman, M. E., Elías, M. M., Comin, E. J., et Rodriguez Garay, E. A. (1983). Alterations in renal function induced by aflatoxin B1 in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 69(3), 319-325. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(83\)90255-7](https://doi.org/10.1016/0041-008x(83)90255-7)
- Guo, J. J., Hsieh, H. Y., et Hu, C. H. (2009). Chain-Breaking Activity of Carotenes in Lipid Peroxidation : A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(47), 15699-15708. <https://doi.org/10.1021/jp907822h>

- Harborne, J. B., et Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00235-1)
- Harmon, A. W., et Patel, Y. M. (2004). Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 85, 103-110.
- Hou, L., Qiu, H., Li, A., Dong, J., Zhu, L., Liu, G., Chen, F., 2022. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, antioxidant status, immune response, and pro-inflammatory cytokine mRNA expression in ISA chicks. *Front. Vet. Sci.* 9, 993039.
- Huang, X. J., Choi, Y. K., Im, H. S., Yarimaga, O., Yoon, E., et Kim, H.-S. (2006). Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 6(7), 756-782.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., et Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants : Past history and future perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>
- Jin, L., Zhang, Y., Yan, L., Guo, Y., et Niu, L. (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Bulb Extracts of Six Liliaceae Species Native to China. *Molecules*, 17(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules17089361>
- Jing, Y., Sun, K., Liu, W., Sheng, D., Zhao, S., Gao, L., et Wei, L. (2018). Tumor necrosis factor- α promotes hepatocellular carcinogenesis through the activation of hepatic progenitor cells. *Cancer Letters*, 434, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.07.001>
- Karabacak, M., Eraslan, G., Kanbur, M., et Sarıca, Z. S. (2015). Effects of Tarantula cubensis D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. *Homeopathy*, 104(3), 205-210. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2015.02.005>
- Kawashty, S. A., Gamal El-Din, E. M., et Saleh, N. A. M. (1999). The flavonoid chemosystematics of two Teucrium species from Southern Sinai, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(6), 657-660. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00109-9)
- Khan, H. Y., Zubair, H., Ullah, M. F., Ahmad, A., et Hadi, S. M. (2012). A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. *Current Drug Targets*, 13(14), 1738-1749. <https://doi.org/10.2174/138945012804545560>
- Khazaei, M., Nematollahi-Mahani, S. N., Mokhtari, T., et Sheikhbahaei, F. (2017). Review on *Teucrium polium* biological activities and medical characteristics against different pathologic situations. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 4 (1). <https://www.jocms.org/index.php/jcms/article/view/323>
- Kim, E. H., Shim, B., Kang, S., Jeong, G., Lee, J., Yu, Y.-B., et Chun, M. (2009). Anti-inflammatory effects of Scutellaria baicalensis extract via suppression of immune modulators and MAP kinase signaling molecules. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(2), 320-331. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.08.027>
- Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., et Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.032>
- Kittakoop, P., Mahidol, C., et Ruchirawat, S. (2014). Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(2), 239-252. <https://doi.org/10.2174/1568026613666131216105049>
- Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S., et Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 54(5), 356-361. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.5.356>

- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Behare, P. V., Singh, B., et Aggarwal, P. K. (2012). Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B₁-induced liver carcinogenesis in rats. *The British Journal of Nutrition*, 107(7), 1006-1016. <https://doi.org/10.1017/S0007114511003953>
- Kumar, S., et Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids : An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, e162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Labbé, D., Vassault, A., Cherruau, B., Baltassat, P., Bonète, R., Carroger, G., Costantini, A., Guérin, S., Houot, O., Lacour, B., Nicolas, A., Thioulouse, E., et Trépo, D. (1996). [Method selected for the determination of creatinine in plasma or serum. Choice of optimal conditions of measurement]. *Annales De Biologie Clinique*, 54(8-9), 285-298.
- Latif, A. D., Gonda, T., Vágvölgyi, M., Kúsz, N., Kulmány, Á., Ocsovszki, I., Zomborszki, Z. P., Zupkó, I., et Hunyadi, A. (2019). Synthesis and In Vitro Antitumor Activity of Naringenin Oxime and Oxime Ether Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2184. <https://doi.org/10.3390/ijms20092184>
- Lee KJ, Choi JH, Jeong HG. 2007. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. (Fct). 45:2118–2125.
- Lehmann H. 2013. *Le médicament à base de plantes en Europe: statut, enregistrement, contrôles*. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Université de Strasbourg, Strasbourg, 342 p.
- Leite, P. M., Camargos, L. M., et Castilho, R. O. (2021). Recent progress in phytotherapy : A Brazilian perspective. *European Journal of Integrative Medicine*, 41, 101270. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101270>
- Lessard, M., Savard, C., Deschene, K., Lauzon, K., Pinilla, V.A., Gagnon, C.A., Lapointe, J., Guay, F., Chorfi, Y., 2015. Impact of deoxynivalenol (DON) contaminated feed on intestinal integrity and immune response in swine. *Food Chem. Toxicol.* 80, 7–16.
- Li, H., Xing, L., Zhang, M., Wang, J., Zheng, N., 2018. *The toxic effects of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 on kidney through regulating L-proline and downstream apoptosis*. *BioMed Res. Int.* 2018
- Li, J., Qiyu, S., Wang, T., Jin, B., et Li, N. (2019). Improving the Detection of Hepatocellular Carcinoma Using Serum AFP Expression in Combination with GPC3 and Micro-RNA MiR-122 Expression. *Open Life Sciences*, 14, 53-61. <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0007>
- Li, J. W.-H., et Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products : End of an era or an endless frontier? *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), 161-165. <https://doi.org/10.1126/science.1168243>
- Li, L. H., Dutkiewicz, E. P., Huang, Y. C., Zhou, H.-B., et Hsu, C. C. (2019). Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(2), 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.09.001>
- Li, X., Lv, Z., Chen, J., Nepovimova, E., Long, M., Wu, W., et Kuca, K. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* B10 can alleviate liver apoptosis and oxidative stress induced by aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 151, 112124. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112124>
- Liaudanskas, M., Viškelis, P., Raudonis, R., Kviklys, D., Uselis, N., et Janulis, V. (2014). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of *Malus domestica* Leaves. *The Scientific World Journal*, 2014, e306217. <https://doi.org/10.1155/2014/306217>
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention : Mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134(12 Suppl), 3479S-3485S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.12.3479S>

- Livak, K. J., et Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Cogan, U., Said, O., Saleh, K. A., et Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.060>
- Long, D., Deng, Y., Huang, X.Y., Yao, J.G., Su, Q.Y., Wu, X.M., Wang, J., Xu, Q.Q., Zhu, X. Y., Wang, C., Huang, B.C., Xia, Q., 2018. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma related to aflatoxins: an update. *Liver Res. Clin. Manag.* 1, 113–136.
- Lopes-Virella, M. F., Stone, P., Ellis, S., et Colwell, J. A. (1977). Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clinical Chemistry*, 23(5), 882-884.
- Ma, Q., He, X., 2012. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. *Pharmacol. Rev.* 64, 1055–1081.
- Mabou, F. D., et Yossa, I. B. N. (2021). TERPENES: Structural classification and biological activities. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci. e-ISSN*, 16, 2319-7676.
- Malati, T. (2007). Tumour markers : An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22(2), 17-31. <https://doi.org/10.1007/BF02913308>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., et Jiménez, L. (2004). Polyphenols : Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mansoury, M. (2020). *Renoprotective influence of Teucrium polium leaf extract on Rats Intoxicated by Cyclophosphamide*. *Medical Science*, 24(101), 249-258.
- Mansuri, M. L., Parihar, P., Solanki, I., et Parihar, M. S. (2014). Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes et Nutrition*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.1007/s12263-014-0400-z>
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., et Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1 : Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins*, 10(6), 214. <https://doi.org/10.3390/toxins10060214>
- Marin, D. E., et Taranu, I. (2012). Overview on aflatoxins and oxidative stress. *Toxin Reviews*, 31(3-4), 32-43. <https://doi.org/10.3109/15569543.2012.730092>
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., et Sanchis, V. (2013). Mycotoxins : Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 60, 218-237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- McCullough, A.K., Lloyd, R.S., 2019. Mechanisms underlying aflatoxin-associated mutagenesis - implications in carcinogenesis. *DNA Repair* 77, 76–86.
- Meguellati, H., Ouafi, S., Saad, S., et Djemouai, N. (2019). Evaluation of acute, subacute oral toxicity and wound healing activity of mother plant and callus of *Teucrium polium* L. subsp. *Geyrii* Maire from Algeria. *South African Journal of Botany*, 127, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.023>
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., et Philosoph-Hadas, S. (1995). Determination and Involvement of Aqueous Reducing Compounds in Oxidative Defense Systems of Various Senescing Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1813-1819. <https://doi.org/10.1021/jf00055a012>

- Mérillon, J. M., Fauconneau, B., Teguo, P. W., Barrier, L., Vercauteren, J., et Huguet, F. (1997). Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clinical Chemistry*, 43(6 Pt 1), 1092-1093.
- Milan S. Stankovic, Neda Niciforovic, Vladimir Mihailovic, Marina Topuzovic, et Slavica Solujic. (2012). Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different plant parts of *Teucrium polium* L. subsp. *Polium*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(2), 117-122. <https://doi.org/10.5586/asbp.2012.010>
- Milošević-Djordjević, O., Radović Jakovljević, M., Marković, A., Stanković, M., Ćirić, A., Marinković, D., et Grujičić, D. (2018). Polyphenolic contents of *Teucrium polium* L. and *Teucrium scordium* L. associated with their protective effects against MMC-induced chromosomal damage in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Turkish Journal of Biology = Turk Biyoloji Dergisi*, 42(2), 152-162. <https://doi.org/10.3906/biy-1707-36>
- Moein, S., et Moein, M. (2010). Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 517-521.
- Montfort, A., Colacios, C., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Meyer, N., et Ségui, B. (2019). The TNF Paradox in Cancer Progression and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10, 1818. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01818>
- Morabbi Najafabad, A., et Jamei, R. (2014). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of methanolic and ethanolic extracts of plum (*Prunus domestica* L.) in both fresh and dried samples. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(5), 343-353.
- Morcos, N. C. (1997). Modulation of lipid profile by fish oil and garlic combination. *Journal of the National Medical Association*, 89(10), 673-678.
- Movahedi, A., Basir, R., Rahmat, A., Charaffedine, M., et Othman, F. (2014). Remarkable Anticancer Activity of *Teucrium polium* on Hepatocellular Carcinogenic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2014, 726724. <https://doi.org/10.1155/2014/726724>
- Muhammad, I., Wang, X., Li, S., Li, R., et Zhang, X. (2018). Curcumin confers hepatoprotection against AFB1-induced toxicity via activating autophagy and ameliorating inflammation involving Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 1775-1785. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4323-4>
- Naaz, F., Abdin, M. Z., et Javed, S. (2014). Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B1-induced nephrotoxicity in mice. *Mycotoxin Research*, 30(1), 25-32. <https://doi.org/10.1007/s12550-013-0185-8>
- Napoli, E., Siracusa, L., et Ruberto, G. (2020). New Tricks for Old Guys : Recent Developments in the Chemistry, Biochemistry, Applications and Exploitation of Selected Species from the Lamiaceae Family. *Chemistry et Biodiversity*, 17(3), e1900677. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900677>
- Neal, G. E., et Green, J. A. (1983). The requirement for glutathione S-transferase in the conjugation of activated aflatoxin B1 during aflatoxin hepatocarcinogenesis in the rat. *Chemico-Biological Interactions*, 45(2), 259-275. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(83\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0009-2797(83)90073-X)
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., et Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710.
- Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2012. Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.* 287, 9873–9886. Noumi, E., Snoussi, M., Anouar, E.H., Alreshidi, M., Veettil, V.N., Elkahoui, S., Adnan, M., Patel, M., Kadri, A., Aouadi, K., De Feo, V., Badraoui, R.,

2020. HR-LCMS-based metabolite profiling, antioxidant, and anticancer properties of *Teucrium polium* L. methanolic extract: computational and *in vitro* study. *Antioxidants* 9, 1089.

Ohkawa, H., Ohishi, N., et Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Ouyang, H., Hou, K., Peng, W., Liu, Z., et Deng, H. (2018). Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of total polyphenols from onion. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7), 1509-1513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.005>

Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., et Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role : Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.

Paglia, D. E., et Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158-169.

Pandey, K. B., et Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>

Panovska, T. K., Kulevanova, S., Gjorgoski, I., Bogdanova, M., et Petrushevska, G. (2007). Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 57(2), 241-248. <https://doi.org/10.2478/v10007-007-0020-x>

Parsaee, H., et Shafiee-Nick, R. (2006). Anti-Spasmodic and Anti-Nociceptive Effects of *Teucrium polium* Aqueous Extract. *Iran. Biomed. J.* 10(3), 145-149.

Pelyhe, C., Kóvesi, B., Zándoki, E., Kovács, B., Erdélyi, M., Kulcsár, S., Mées, M., Balogh, K., 2018. Multi-trichothecene mycotoxin exposure activates glutathione-redox system in broiler chicken. *Toxicon* 153, 53–57.

Perron, N. R., et Brumaghim, J. L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>

Peterson, S., Lampe, J.W., Bammler, T.K., Gross-Steinmeyer, K., Eaton, D.L., 2006. Apiaceous vegetable constituents inhibit human cytochrome P-450 1A2 (hCYP1A2) activity and hCYP1A2-mediated mutagenicity of aflatoxin B1. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1474–1484.

Phung, H. M., Lee, H., Lee, S., Jang, D., Kim, C.-E., Kang, K. S., Seo, C.-S., et Choi, Y.-K. (2020). Analysis and Anticancer Effects of Active Compounds from *Spatholobi Caulis* in Human Breast Cancer Cells. *Processes*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/pr8091193>

Qian, G., Tang, L., Guo, X., Wang, F., Massey, M.E., Su, J., Guo, T.L., Williams, J.H., Phillips, T.D., Wang, J.S., 2014. Aflatoxin B1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male F344 rats. *J. Appl. Toxicol.* 34, 241–249.

Rahmouni, F., Badraoui, R., Amri, N., Elleuch, A., El-Feki, A., Rebai, T., et Saoudi, M. (2019). Hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats induced by carbon tetrachloride and the protective effects of *Teucrium polium* and vitamin C. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(5), 313-321. <https://doi.org/10.1080/15376516.2018.1519864>

Rahmouni, F., Badraoui, R., Ben-Nasr, H., Bardakci, F., Elkahoui, S., Siddiqui, A.J., Saeed, M., Snoussi, M., Saoudi, M., Rebai, T., 2022. Pharmacokinetics and therapeutic potential of *Teucrium polium* against liver damage associated hepatotoxicity and oxidative injury in rats: computational, biochemical and histological studies. *Life* 12 (7), 1092.

- Rahmouni, F., Hamdaoui, L., et Rebai, T. (2017). In vivo anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Teucrium polium* against carrageenan-induced inflammation in experimental models. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 123(5), 313-321. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1333517>
- Rahmouni, F., Saoudi, M., Amri, N., El-Feki, A., Rebai, T., Badraoui, R., 2018. Protective effect of *Teucrium polium* on carbon tetrachloride induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Arch. Physiol. Biochem.* 124, 1–9.
- Rahmouni, F., Saoudi, M., et Rebai, T. (2021). Therapeutics studies and biological properties of *Teucrium polium* (Lamiaceae). *BioFactors*, 47(6), 952-963. <https://doi.org/10.1002/biof.1782>
- Rajendran, P., Chen, Y.F., Chen, Y.F., Chung, L.C., Tamilselvi, S., Shen, C.Y., Day, C.H., Chen, R.J., Viswanadha, V.P., Kuo, W.W., Huang, C.Y., 2018. The multifaceted link between inflammation and human diseases. *J. Cell. Physiol.* 233, 6458–6471.
- Rajabalian, S. (2008). Methanolic extract of *Teucrium polium* L. potentiates the cytotoxic and apoptotic effects of anticancer drugs of vincristine, vinblastine and doxorubicin against a panel of cancerous cell lines. *Experimental Oncology*, 30(2), 133-138.
- Ramaiah, S. K. (2007). A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology*, 45(9), 1551-1557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.007>
- Rasekh, H. R., Khoshnood-Mansourkhani, M. J., et Kamalinejad, M. (2001). Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia*, 72(8), 937-939. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(01\)00348-3](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(01)00348-3)
- Rasekh, H.R., Yazdanpanah, H., Hosseinzadeh, L., Bazmohammadi, N., Kamalnejhad, M., 2005. Acute and subchronic toxicity of *Teucrium polium* total extract in rats. *Innov. J. Pharm. Res.* 4, 245–249.
- Rastogi, R., Srivastava, A. K., et Rastogi, A. K. (2001a). Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B1-treated male wistar rats : Preventive effect of picroliv. *Pharmacology et Toxicology*, 88(2), 53-58. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.088002053.x>
- Rastogi, R., Srivastava, A. K., et Rastogi, A. K. (2001b). Long term effect of aflatoxin B(1) on lipid peroxidation in rat liver and kidney : Effect of picroliv and silymarin. *Phytotherapy Research: PTR*, 15(4), 307-310. <https://doi.org/10.1002/ptr.722>
- Rates, S. M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(5), 603-613. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00154-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00154-9)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reitman, S., et Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28(1), 56-63. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>
- Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Rimpler, H., et Kamel, A. (1986). Iridoids and flavonoids of *Teucrium polium* herb. *Planta Medica*, 2, 87-88.
- Robinet, P., Wang, Z., Hazen, S. L., et Smith, J. D. (2010). A simple and sensitive enzymatic method for cholesterol quantification in macrophages and foam cells. *Journal of Lipid Research*, 51(11), 3364-3369. <https://doi.org/10.1194/jlr.D007336>
- Rotimi, O. A., Rotimi, S. O., Oluwafemi, F., Ademuyiwa, O., et Balogun, E. A. (2016). Coexistence of Aflatoxicosis with Protein Malnutrition Worsens Hepatic Oxidative Damage in Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 30(6), 269-276. <https://doi.org/10.1002/jbt.21787>

- Rushing, B. R., et Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1 : A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Rudnicki M, Silveira M, Pereira T, Oliveira M, Reginatto F, Dal-Pizzol F, Moreira J. 2007. Protective effects of Passiflora alata extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol*. 45:656–661.
- Rustom, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed : Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57-67. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00096-9)
- S, B., et Ip, O. (2005). The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1-2). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.010>
- Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., et Lee, Y. S. (2005). An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*, 22(6), 696-716. <https://doi.org/10.1039/b514045p>
- Salvatore, V., Teti, G., Focaroli, S., Mazzotti, M. C., Mazzotti, A., et Falconi, M. (2016). The tumor microenvironment promotes cancer progression and cell migration. *Oncotarget*, 8(6), 9608-9616. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14155>
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., et Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270::AID-JSFA945>3.0.CO;2-9)
- Satoh, K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 90(1), 37-43. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(78\)90081-5](https://doi.org/10.1016/0009-8981(78)90081-5)
- Sayed Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Cerny, M., Kanaan, H., Chokr, A., et Merah, O. (2018). Fennel oil and by-products seed characterization and their potential applications. *Industrial Crops and Products*, 111, 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.008>
- Sepasi Tehrani, H., et Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>
- Sevindik, E., Abacı, Z. T., Yamaner, C., et Ayvaz, M. (2016). Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Teucrium polium* and *Achillea millefolium* grown under North Anatolian ecological conditions. *Biotechnology et Biotechnological Equipment*, 30(2), 375-380. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1131626>
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., et Mirtajaldini, M. (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112(4), 885-888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.064>
- Sharifi-Rad, M., Pohl, P., Epifano, F., Zengin, G., Jaradat, N., et Messaoudi, M. (2022). *Teucrium polium* (L.): Phytochemical Screening and Biological Activities at Different Phenological Stages. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(5), 1561. <https://doi.org/10.3390/molecules27051561>
- Sharma, A., Kaur, M., Katnoria, J. K., et Nagpal, A. K. (2018). Polyphenols in Food : Cancer Prevention and Apoptosis Induction. *Current Medicinal Chemistry*, 25(36), 4740-4757. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171006144208>
- Sharmila Banu, G., Kumar, G., et Murugesan, A. G. (2009). Ethanolic leaves extract of *Trianthema portulacastrum* L. ameliorates aflatoxin B(1) induced hepatic damage in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 24(3), 250-256. <https://doi.org/10.1007/s12291-009-0047-5>

- Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., et Mahmood, Z. (2017). Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(4), 360-363. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2016.11.006>
- Silva, J. P., Gomes, A. C., et Coutinho, O. P. (2008). Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology*, 601(1), 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.046>
- Srivastava, S., Somasagara, R. R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S. K., Srivastava, M., Choudhary, B., et Raghavan, S. C. (2016). Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Scientific Reports*, 6, 24049. <https://doi.org/10.1038/srep24049>
- Stankovic, M. S., Curcic, M. G., Zizic, J. B., Topuzovic, M. D., Solujic, S. R., et Markovic, S. D. (2011). Teucrium Plant Species as Natural Sources of Novel Anticancer Compounds : Antiproliferative, Proapoptotic and Antioxidant Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4190-4205. <https://doi.org/10.3390/ijms12074190>
- Stefkov, G., Karapandzova, M., Stefova, M., Bankova, V., et Kulevanova, S. (2012). HPLC and UV-spectrophotometry analysis of flavonoids in spray-dried and freeze-dried extracts of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 58, 39-44. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2012.58.005>
- Stefkov, G., Kulevanova, S., Miova, B., Dinevska-Kjovkarovska, S., Mølgaard, P., Jäger, A. K., et Josefsen, K. (2011). Effects of *Teucrium polium* spp. Capitatum flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Pharmaceutical Biology*, 49(9), 885-892. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.552187>
- Suboh, S. M., Bilto, Y. Y., et Aburjai, T. A. (2004). Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(4), 280-284. <https://doi.org/10.1002/ptr.1380>
- Swallah, M. S., Sun, H., Affoh, R., Fu, H., et Yu, H. (2020). Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. *International Journal of Food Science*, 2020, e9081686. <https://doi.org/10.1155/2020/9081686>
- Swenson, D. H., Lin, J. K., Miller, E. C., et Miller, J. A. (1977). Aflatoxin B1-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B1 and B2 to rat liver DNA and ribosomal RNA in vivo. *Cancer Research*, 37(1), 172-181.
- Swenson, D. H., Miller, E. C., et Miller, J. A. (1974). Aflatoxin B1-2,3-oxide : Evidence for its formation in rat liver in vivo and by human liver microsomes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 60(3), 1036-1043. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(74\)90417-3](https://doi.org/10.1016/0006-291x(74)90417-3)
- Tariq, M., Ageel, A. M., al-Yahya, M. A., Mossa, J. S., et al-Said, M. S. (1989). Anti-inflammatory activity of *Teucrium polium*. *International Journal of Tissue Reactions*, 11(4), 185-188.
- Tatar, M., Qujeq, D., Feizi, F., Parsian, H., Sohan Faraji, A., Halalkhor, S., Abassi, R., Abedian, Z., Pourbagher, R., Aghajanpour Mir, S. M., Mir, H., et Seyfizadeh, N. (2012). Effects of *Teucrium Polium* Aerial Parts extract on oral glucose tolerance tests and pancreas histopathology in Streptozocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 1(1), 44-49.
- Toplan, G., Göger, F., Taşkin, T., Genç, G., Cıvaş, A., İşcan, G., Kürkçüoğlu, M., Mat, A., et Başer, K. (2022). Phytochemical composition and pharmacological activities of *Teucrium polium* L. collected from eastern Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 46(1), 269-282. <https://doi.org/10.3906/kim-2107-13>

Trail, F., Mahanti, N., et Linz, J. (1995). Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology (Reading, England)*, 141 (Pt 4), 755-765. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-4-755>

Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples : Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>

Ueng, Y.-F., Shimada, T., Yamazaki, H., et Guengerich, F. P. (2002, mai 1). *Oxidation of Aflatoxin B1 by Bacterial Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/tx00044a006>

Ulewicz-Magulska, B., et Wesolowski, M. (2019). Total Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Herbs Used for Medical and Culinary Purposes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 61-67. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0699-5>

Valdivia, A. G., Martínez, A., Damián, F. J., Quezada, T., Ortíz, R., Martínez, C., Llamas, J., Rodríguez, M. L., Yamamoto, L., Jaramillo, F., Loarca-Piña, M. G., et Reyes, J. L. (2001). Efficacy of N-Acetylcysteine to Reduce the Effects of Aflatoxin B₁ Intoxication in Broiler Chickens¹. *Poultry Science*, 80(6), 727-734. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.727>

Verma, S., et Singh, S. (2008). Current and future status of herbal medicines. *Veterinary World*, 2(2), 347. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2008.347-350>

Verykokidou-Vitsaropoulou, E., et Vajias, C. (1986). Methylated Flavones from *Teucrium polium*. *Planta Medica*, 5, 401-402. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969198>

Vipin, A. V., Rao, R., Kurrey, N. K., KA, A. A., & Venkateswaran, G. (2017). Protective effects of phenolics rich extract of ginger against Aflatoxin B₁-induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 91, 415-424. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.107>

Wang, J. S., Shen, X., He, X., Zhu, Y. R., Zhang, B. C., Wang, J. B., Qian, G. S., Kuang, S. Y., Zarba, A., Egner, P. A., Jacobson, L. P., Muñoz, A., Helzlsouer, K. J., Groopman, J. D., et Kensler, T. W. (1999). Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B₁ by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(4), 347-354.

Wang, W., Zhang, Z., Liu, X., Cao, X., Wang, L., Ding, Y., et Zhou, X. (2022). An Improved GC-MS Method for Malondialdehyde (MDA) Detection : Avoiding the Effects of Nitrite in Foods. *Foods*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods11091176>

Wang, X.H., Li, W., Wang, X.H., Han, M.Y., Muhammad, I., Zhang, X.Y., Sun, X.Q., Cui, X. X., 2019. Water soluble substances of wheat: a potential preventer of aflatoxin B₁- induced liver damage in broilers. *Poultry Sci.* 98 (1), 136–149.

Wild, C. P., et Turner, P. C. (2002). The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*, 17(6), 471-481. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.6.471>

Wild, C. P., Yin, F., Turner, P. C., Chemin, I., Chapot, B., Mendy, M., Whittle, H., Kirk, G. D., et Hall, A. J. (2000). Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in the Gambia. *International Journal of Cancer*, 86(1), 1-7. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000401\)86:1<1::aid-ijc1>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000401)86:1<1::aid-ijc1>3.0.co;2-i)

Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2(3), 251-286. <https://doi.org/10.3390/medicines2030251>

Wu, N., Zu, Y., Fu, Y., Kong, Y., Zhao, J., Li, X., Li, J., Wink, M., et Efferth, T. (2010, mars 5). *Antioxidant Activities and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of Extracts and Main Polyphenolic*

Compounds Obtained from Geranium sibiricum L. (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf904593n>

Xu, J. G., Hu, Q. P., et Liu, Y. (2012). Antioxidant and DNA-Protective Activities of Chlorogenic Acid Isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11625-11630. <https://doi.org/10.1021/jf303771s>

Yadava, N.; Yadava, R.; Goyalb, A. (2014). Chemistry of terpenoids. *Int. J. Pharm. Sci. Rev.*, 27, 272–278.

Yuan, S.-S. F., Tsai, K.-B., Chung, Y.-F., Chan, T.-F., Yeh, Y.-T., Tsai, L.-Y., et Su, J.-H. (2004). Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 92(3), 769-775. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.11.043>

Yuksel, S., Sezer, S.K., Kurtoglu, E.L., Bag, H.G., 2019. Protective effect of extracts of *Teucrium polium* and *Rumex crispus* against cyclophosphamide-induced genotoxic damage in human lymphocytes. *Ecol. genet.* 17 (2), 93–100.

Zhang, W., Zhao, Z., Chang, L., Cao, Y., Wang, S., Kang, C., Wang, H., Zhou, L., Huang, L., et Guo, L. (2021). *Atractylodis Rhizoma*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, toxicology and quality control. *Journal of Ethnopharmacology*, 266, 113415. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113415>.