

# Université Mohamed Boudiaf - M'sila

FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Numéro de série : .....

Numéro d'inscription : .....

## Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de

## DOCTORAT EN SCIENCES

**Filière** : Sciences biologiques

**Spécialité** : Biotechnologie végétale

THEME

### CARACTERISATION, TOXICITE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE *TEUCRIUM POLIUM*

Présenté Par : CHABANE Sarra

Soutenue le : 13/02/2021

Devant le jury composé de:

<u>Nom &amp; Prénom</u>	<u>Grade</u>	<u>Etablissement</u>	<u>Qualité</u>
BENDERRADJI Laid	Pr	Université de M'sila	Président
BOUDJELAL Amel	MCA	Université de M'sila	Encadreur
KHETTAL Bachra	Pr	Université de Béjaia	Examineur
BENMEKHBI Lotfi	MCA	Université de Constantine	Examineur
KHENCHOUCHE Abdelhalim	MCA	Université de Sétif	Examineur
GHADBANE Mouloud	MCA	Université de M'sila	Examineur

Année Universitaire: 2020/2021

## *Dédicaces*

*A l'aide de mon dieu ALLAH j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:*

*Aux êtres les plus chers à mon cœur, qui se sont sacrifiées pour  
que je grandisse avec un savoir-faire et qui m'ont appris à ne  
jamais baissé les bras, et qui ont fait de moi ce que je suis  
aujourd'hui, sans lesquels je n'y serais jamais parvenue et qui je ne*

*remercierais jamais assez ;*

*Mes très chers parents.*

*A mes frères et ma sœur*

*A Mes belles sœurs*

*Tous mes amis et collègues*

*A tous ceux qui n'ont pas été cité amicalement*

*Sarra*

## Remerciement

J'exprime ma profonde gratitude à madame Pr BOUDELAL Amel, Professeur au Département Microbiologie et Biochimie de la Faculté des Sciences à l'Université de M'sila, qui m'a inspiré ce thème et qui m'a fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Ses conseils pertinents, sa compétence scientifique et sa compréhension m'ont permis de mener à terme ce travail.

Je tiens à présenter mes sincères remerciements aux membres de Jury Prof. BENDERRADJI Laid ; Université de M'sila, Prof KHETTAL Bachra ; Université de Béjaia, Dr BENMEKHBI Lotfi ; Université de Constantine, Dr KHENCHOUCHE Abdelhalim ; Université de Sétif et Dr GHADBANE Mouloud ; Université de M'sila d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés au professeur OLIVIER Potterat de l'université de Bale / Suisse, et au professeur RUBERTO Giuseppe de l'institut Chimie Biomoléculaires de Catania (ICB catania / Italie), pour leur soutien et pour le temps qu'ils ont pu consacrer dans l'identification phytochimique des différents extraits qui ont fait l'objet d'une partie de ce travail de thèse.

Mes sincères remerciements vont au chef de laboratoire du département de Biologie, Université de M'Sila monsieur SEGHIRI Kamel pour leur aide et conseil tout le long de ce travail

Je remercie tous mes enseignants qui ont contribué et influencé ma forte personnalité ; Dr Benkhaled, Dr Belabesse,... tous mes amis, mes collègues de travail et tous ceux et celles qui ont apporté aide et soutien, de près ou de loin tout au long de mes études.

Finalement, un grand merci du fond du cœur, plein d'amour et de tendresse aux membres de ma famille, mes parents « la lumière de ma vie », mes frères « *KHADIR, AMINE, mes jumeaux RAIDE et RAFIK* », ma sœur « *Sondous* » et mes belles sœurs.

# SOMMAIRE

<b>Résumé</b>	
<b>Abréviation</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I. Synthèse bibliographique</b>	<b>3</b>
I.1. Généralités sur l'espèce d'étudiée	3
I.1.1. Famille des Lamiacées	3
I.1.2. Le genre <i>Teucrium</i>	4
I.1.3. Distribution géographique de la plante	4
I.1.4. Description botanique de <i>Teucrium polium</i> L.	4
I.1.5. Systématique de la plante	5
I.1.6. Noms vernaculaires de la plante	6
I.1.7. Composition chimique de la plante	6
I.1.8. Les utilisations traditionnelles et scientifiques de la plante	6
I.1.9. Toxicité de la plante	6
I.2. Métabolites secondaires	7
I.2.1. Grands groupes de métabolites secondaires	7
I.2.1.1. Composés phénoliques	8
I.2.1.2. Composés phénoliques	9
I.2.1.3. Terpènes	10
I.3. Le Stress oxydant	10
I.3.1. Les Radicaux libres	10
I.3.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène	11
I.3.1.2. Origine des radicaux libres	12
I.3.2. Les Antioxydants	12
I.3.2.1. Les Antioxydants endogènes	13
I.3.2.2. Les Antioxydants exogènes	13
I.4. La Cicatrisation	16
I.4.1. La Peau	16
I.4.1.1. Structure de la peau	17
I.4.2. Définition de la plaie	18
I.4.2.1. Classification des plaies	18
I.4.3. Cicatrisation des plaies	19
I.4.3.1. Les phases de la cicatrisation	19
I.4.3.2. Facteurs influençant la cicatrisation	23
I.4.3.3. Traitement local des plaies	23

<b>II. Matériel et Méthodes</b>	<b>24</b>
II.1. Présentation de la zone d'étude	24
II.1.1. Localisation géographique	24
II.2. Matériel végétal	25
II.3. Animaux	25
II.4. Préparation des extraits	26
II.5. Analyses phytochimique des extraits	28
II.5.1. Dosage des polyphénols totaux	28
II.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux	28
II.5.3. Analyse de l'EM par HPLC-UV-MS-ELSD	28
II.5.4. Analyse de l'HE par GC-FID-MS	30
II.6. Evaluation toxicologique et biologiques ( <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> ) des extraits de <i>T. polium</i> L.	31
II.6.1. Etude toxicologique	31
II.6.1.1. Test de toxicité orale aiguë	31
II.6.1.2. Constitution des groupes et traitements des animaux	31
II.6.1.3. Observations des animaux	31
II.6.1.4. Examen histologique et dosages biochimiques sériques	32
II.6.2. Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	36
II.6.2.1. Capacité Antioxydante Totale (TAC)	36
II.6.2.2. Test de piégeage de radical libre DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle)	36
II.6.2.3. Test de Blanchiment du $\beta$ -carotène	38
II.6.2.4. Pouvoir réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	38
II.6.3. Evaluation de l'activité cicatrisante	39
II.6.3.1. Préparation de l'onguent	39
II.6.3.2. Test de l'irritation cutanée	39
II.6.3.3. Potentiel cicatrisant de <i>Teucrium polium</i> L.	40
II.6.3.4. Induction des plaies d'excision, traitement et suivi de la cicatrisation	41
II.6.3.5. Les coupes histologiques des organes	42
II.7. Analyses statistiques	43
<b>III. Résultats et discussion</b>	<b>44</b>
III.1. Analyses phytochimique des extraits	44
III.1.1. Rendement de l'extraction	44
III.1.2. Dosage des polyphénols totaux	45
III.1.3. Dosage des flavonoïdes	46
III.1.4. Analyse de l'EM par HPLC-UV-MS	47
III.1.5. Analyse de l'HE par GC-FID-MS	52
III.2. Evaluation toxicologique et biologiques ( <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> ) des extraits de <i>T. polium</i> L.	55
III.2.1. Etude toxicologique	55
III.2.1.1. Test de toxicité orale aiguë	55
III.2.1.1.1. Observations des animaux	55
III.2.1.1.2. Evolution pondérale	56

III.2.1.1.3. Masse relative des organes	56
III.2.1.1.4. Paramètres biochimiques sériques après sacrifice	57
III.2.1.1.4.1. Marqueurs de la fonction hépatique	57
III.2.1.1.4.2. Marqueurs de la fonction rénale	58
III.2.1.1.5. Examen histopathologique	58
III.2.2. Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante	60
III.2.2.1. Capacité Antioxydante Totale (TAC)	60
III.2.2.2. Effet piègeur de radical DPPH.	61
III.2.2.3. Test de blanchissement du $\beta$ -carotène	62
III.2.2.4. Pouvoir réducteur (FRAP)	63
III.2.3. Evaluation de l'activité cicatrisante	64
III.2.3.1. Irritation cutanée aiguë	64
III.2.3.2. Evolution du poids corporel	64
III.2.3.3. Evolution du processus cicatriciel des plaies	65
III.2.3.4. Coupes histologiques	69
<b>Conclusion et perspective</b>	<b>73</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

## Résumé

*Teucrium polium* L. appartenant à la famille des Lamiaceae est largement utilisé dans la médecine traditionnelle algérienne comme antidiabétique, antihypertenseur et cicatrisante. Le but de cette étude est d'évaluer la composition chimique, la toxicité orale aiguë, les propriétés antioxydantes et cicatrisantes des extraits de *Teucrium polium* L. La composition de l'extrait méthanolique a été étudiée par analyse HPLC-UV-MS-ELSD, et un profil complet des composés phénoliques a été établi, avec 14 flavonoïdes identifiés comme les principaux constituants polyphénoliques. La composition de l'huile essentielle a été obtenue par une combinaison d'analyses GC-FID et GC-MS et les principaux composants identifiés sont : le  $\alpha,\beta$ -pinène, le germacrène, le myrcène, le limonène, le bicyclogermacrène, le trans- $\beta$ -guaiène, le spathunelol et le  $\beta$ -bourbonène. La toxicité cutanée et orale aiguë a été évaluée sur des modèles animaux et aucun signe de toxicité n'a été détecté (observations, paramètres biochimiques et examens histologiques), ces résultats indiquant l'innocuité de la plante. L'extrait méthanolique de *Teucrium polium* L. a montré une bonne activité antioxydante (TAC > DPPH >  $\beta$ -carotène > FRAP) que l'huile essentielle. Toutes les onguents (OEM, OHE, OPP) ont montré un effet significatif sur la contraction de la plaie par rapport au groupe non traité et au groupe traité avec de la vaseline. La présente étude fournit une justification scientifique de l'utilisation traditionnelle de *Teucrium polium* L. dans le traitement des plaies.

**Mots clés :** *Teucrium polium* L., Extrait méthanolique, Huile essentielle, Composition chimique, Toxicité, Activité antioxydante, Activité cicatrisante

## Abstract

*Teucrium polium* L. belonging to the *Lamiaceae* family is widely used in Algerian folk medicine as antidiabetic, antihypertensive, and to treat wounds. The aim of this study was to evaluate chemical composition, acute oral toxicity, antioxidant and wound healing properties of *Teucrium polium* extracts. The composition of the methanolic extract was investigated by HPLC-PDA-MS analysis, and a comprehensive profile of phenolic compounds was established, with 14 flavonoids and phenylethanoid glycosides identified as the main polyphenolic constituents. The composition of the essential oil was obtained by a combination of GC-FID and GC-MS analyses and the main components were  $\alpha,\beta$ -pinene, germacrene, myrcene, limonene, bicyclogermacrene, *trans*- $\beta$ -guaiene, spathunelol and  $\beta$ -bourbonene. Acute dermal and oral toxicity was assessed in animal models and no signs toxicity were detected (observations, biochemical parameters and histological examinations) which indicate the safety of the plant. *Teucrium polium* methanolic extract displayed a good antioxidant activity (TAC > DPPH >  $\beta$ -carotène > FRAP) better than the essential oil. All ointments (OME, OEO, OPP) showed significant effect on the wound contraction when compared to the control and the group treated with petroleum jelly. The present study provides a scientific rationale for the traditional use of *Teucrium polium* L. in the treatment of wounds.

**Key words:** *Teucrium polium* L., Methanolic extract, Essential oil, Chemical composition Toxicity, Antioxidant activity, Wound healing potential.

## ملخص

تنتمي *Teucrium polium* L. إلى عائلة Lamiaceae على نطاق واسع في الطب الجزائري التقليدي كمضاد لمرض السكر وضغط الدم ولعلاج الجروح. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التركيب الكيميائي، والسمية الحادة، ومضادات الأكسدة والخصائص العلاجية لمستخلصات *Teucrium polium* L. تمت دراسة تركيب المستخلص الميثانولي عن طريق تحليل HPLC-UV-MS ، وتم إنشاء ملف تعريف كامل للمركبات الفينولية ، مع 14 مركبات من الفلافونويد وجليكوسيدات فينيل إيثانويد التي تم تحديدها على أنها المكونات الرئيسية للبوليفينول. تم الحصول على تركيبة الزيت العطري من خلال تحليلات GC-FID و GC-MS والمكونات الرئيسية هي  $\alpha,\beta$ -pinene و germacrene و myrcene و limonene و bicyclogermacrene و  $\beta$ -guaiene و trans-  $\beta$ -guaiene و spathunelol و  $\beta$ -bourbonene. تم تقييم السمية الحادة والجلدية في نماذج حيوانية ولم يتم الكشف عن أي علامات سمية (الملاحظات ، المعايير البيوكيميائية والفحوصات النسيجية) مما يدل على سلامة النبات. أظهر المستخلص الميثانولي من *Teucrium polium* L. نشاطاً جيداً مضاداً للأكسدة (FRAP >  $\beta$ -carotene > DPPH > TAC) أفضل من الزيت العطري. أظهرت جميع المراهم (OEM , OHE , OPP ) تأثيراً معنوياً على تقلص الجرح مقارنةً بالمجموعة التي عولجت بالفازلين. تقدم الدراسة الحالية تبريراً علمياً للاستخدام التقليدي لـ *Teucrium polium* L. في علاج الجروح

**الكلمات المفتاحية:** *Teucrium polium* L. ، خلاصة ميثانولية ، زيت عطري ، تركيب كيميائي ، سمية ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط علاج الجروح.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>A :</b>	Absorbance
<b>BHT :</b>	Butyle hydroxytoluène
<b>CIC :</b>	Cicatryl-Bio
<b>DL<sub>50</sub> :</b>	Dose létale de 50% de population
<b>DMSO :</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DPPH :</b>	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle
<b>EAA :</b>	Equivalent acide ascorbique
<b>EAG:</b>	Equivalents d'acide gallique
<b>EM:</b>	Extrait Méthanolique
<b>EQ :</b>	Equivalent quercétine
<b>ES :</b>	Extrait sec
<b>EtOAc :</b>	acétate d'éthyl
<b>g:</b>	Gramme
<b>h:</b>	Heure
<b>HE</b>	Huile Essentielle
<b>HPLC :</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>J :</b>	Jours
<b>Kg :</b>	kilogramme
<b>min :</b>	Minute
<b>ml:</b>	Millilitre
<b>n-BuOH :</b>	n-butanol
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>NPUAP :</b>	National Pressure Ulcer Advisory Panel
<b>OCDE :</b>	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
<b>OEM :</b>	Onguent extrait méthanolique
<b>OHE :</b>	Onguent huile essentielle
<b>OPP :</b>	Onguent poudre de plante
<b>pc :</b>	Poids corporel
<b>TAC :</b>	Capacité antioxydante totale
<b>µl :</b>	Microlitre
<b>VAS :</b>	Vaseline

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01 :</b>	Aspect morphologique de <i>Teucrium polium</i> L.	<b>5</b>
<b>Figure 02 :</b>	Structure chimique de l'acide caféique (Boizot et Charpentier, 2006)	<b>8</b>
<b>Figure 03 :</b>	Structure de base d'un flavonoïde (Di Carlo <i>et al.</i> , 1999).	<b>9</b>
<b>Figure 04 :</b>	Unité de base du terpène (Lhuillier, 2007).	<b>10</b>
<b>Figure 05 :</b>	Formation des radicaux libres (Dacosta, 2003)	<b>11</b>
<b>Figure 06 :</b>	Espèces réactives de l'oxygène (Pincemail <i>et al.</i> , 2002)	<b>12</b>
<b>Figure 07 :</b>	Structure chimique de la vitamine C (Chauhan <i>et al.</i> , 2013).	<b>14</b>
<b>Figure 08 :</b>	Structure chimique de la vitamine E (Chauhan <i>et al.</i> , 2013).	<b>14</b>
<b>Figure 09 :</b>	Structure chimique du $\beta$ -carotène (Gardès-Albert <i>et al.</i> , 2003)	<b>15</b>
<b>Figure 10 :</b>	Structure de la peau (Zaidi, 2010)	<b>16</b>
<b>Figure 11 :</b>	Classification des plaies en fonction de leur profondeur (Colige, 2012).	<b>18</b>
<b>Figure 12 :</b>	Phase vasculaire et hémostatique (Monique, 2019)	<b>20</b>
<b>Figure 13 :</b>	Phase inflammatoire (Monique, 2019)	<b>21</b>
<b>Figure 14 :</b>	Phase de ré-épithélialisation (Monique, 2019)	<b>22</b>
<b>Figure 15 :</b>	Phase de maturation (Monique, 2019)	<b>22</b>
<b>Figure 16 :</b>	Localisation géographique de la wilaya de M'sila	<b>24</b>
<b>Figure 17 :</b>	<i>Teucrium polium</i> L.	<b>25</b>
<b>Figure 18 :</b>	Extraction, identification, toxicité et activités biologiques des extraits de <i>Teucrium polium</i> L.	<b>27</b>
<b>Figure 19 :</b>	Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive (Matkowski <i>et al.</i> , 2008)	<b>37</b>
<b>Figure 20 :</b>	Les différentes étapes de l'excision de la peau.	<b>41</b>
<b>Figure 21 :</b>	Traçage d'une plaie	<b>42</b>
<b>Figure 22 :</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	<b>45</b>
<b>Figure 23 :</b>	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	<b>46</b>
<b>Figure 24 :</b>	Chromatogrammes HPLC-UV-MS de l'extrait méthanolique de <i>Teucrium polium</i> L.	<b>48</b>
<b>Figure 25 :</b>	Structure des composés phénoliques identifiés dans l'EM de <i>Teucrium polium</i> L.	<b>51</b>
<b>Figure 26 :</b>	Coupes histologiques des différents organes (foie, rein et coeur) des souris traitées à différentes doses (GX10)	<b>59</b>

<b>Figure 27 :</b>	Test d'irritation cutanée chez le lapin.	<b>64</b>
<b>Figure 28 :</b>	Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision chez les différents groupes	<b>68</b>
<b>Figure 29 :</b>	Évaluation histologique de coupes de peau de plaie colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (G X 10 et 40) de divers groupes (CIC, OEM 10%, OHE 10%, OPP 10%, VAS et NT).	<b>71</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01 :</b>	Classification des plaies selon le stade (NPUAP 2014)	<b>19</b>
<b>Tableau 02 :</b>	Échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949) pour les souris et les rats (Frank <i>et al.</i> , 1992)	<b>31</b>
<b>Tableau 03 :</b>	Classement des réactions cutanées (érythème, escarre et oedème) (OCDE 404, 2002a).	<b>40</b>
<b>Tableau 04 :</b>	La composition chimique de l'EM de <i>T. polium</i> L.	<b>49</b>
<b>Tableau 05 :</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> L.	<b>53</b>
<b>Tableau 06 :</b>	Evaluation pondérale des souris traités et témoin	<b>56</b>
<b>Tableau 07 :</b>	Variation des valeurs de la masse relative des organes des souris	<b>57</b>
<b>Tableau 08 :</b>	Variation des paramètres biochimiques après sacrifice des souris	<b>57</b>
<b>Tableau 09 :</b>	Résultat du test TAC des extraits de <i>T. polium</i> L.	<b>60</b>
<b>Tableau 10 :</b>	Résultat de test DPPH des extraits de <i>T. polium</i> L.	<b>61</b>
<b>Tableau 11 :</b>	Résultat de test de blanchissement du $\beta$ -carotène des extraits de <i>T. polium</i> L.	<b>62</b>
<b>Tableau 12 :</b>	Résultat de test de pouvoir réducteur des extraits de <i>T. polium</i> L.	<b>63</b>
<b>Tableau 13 :</b>	Effet des différents onguents sur le poids corporel des lapins.	<b>65</b>
<b>Tableau 14 :</b>	Effet de différents traitements sur l'évolution du processus cicatriciel des plaies d'excision chez les lapins.	<b>65</b>
<b>Tableau 15 :</b>	Effet de différents traitements sur l'évolution du pourcentage de contraction des plaies d'excision chez les lapins.	<b>66</b>

# *Introduction*

## INTRODUCTION

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens ayant une remarquable richesse floristique liée à la diversité de ses écosystèmes. L'usage des remèdes à base de plantes fait partie intégrante de la culture d'une population (Sassoui *et al.*, 2020).

La région du Hodna est particulièrement connue par l'utilisation des plantes médicinales, et plusieurs études antérieures ont fourni d'importantes informations quant à la place de la phytothérapie dans la médecine traditionnelle de la région, en particulier la Wilaya de M'Sila (Boudjelal *et al.*, 2013 ; Rebbas et Bounar, 2014 ; Bounar *et al.*, 2017 ; Miara *et al.*, 2019).

Ces plantes médicinales soignent, parfois très rapidement, non seulement la fatigue, l'insomnie, les maux de tête, la grippe, la toux et les rhumatismes, mais aussi de très nombreuses maladies chroniques parmi lesquelles on cite le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer et les troubles cardiovasculaires (Baali *et al.*, 2019). Ces pathologies incluent un stress oxydant, local ou général, dans leur pathogenèse. La protection du stress oxydant par les antioxydants, surtout d'origine naturelle, peut limiter l'endommagement des biomolécules (ADN, protéines, lipides et sucres) (Binti Jusril *et al.*, 2016).

La valorisation du pouvoir des plantes dans la médecine représente une véritable passerelle du savoir empirique aux médicaments du futur, et dans le but de vérifier la véracité de l'utilisation des plantes par la population locale, plusieurs activités biologiques et pharmacologiques ont été étudiées aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces activités ont été structurellement corrélées à la présence de molécules bioactives dans les extraits testés (Boudjelal *et al.*, 2012 ; 2015 ; Cheriet *et al.*, 2016 ; Réggami *et al.*, 2019 ; Benkhaled *et al.*, 2020).

Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, la validation scientifique des utilisations des plantes par la population locale et la contribution à la normalisation des remèdes traditionnels, on s'est orienté vers la valorisation de *Teucrium polium* L. Cette plante largement utilisée en médecine traditionnelle, peut être une nouvelle source de métabolites secondaires bioactifs, et permettra de répondre aux demandes en matière d'alternatives thérapeutiques. Rappelons qu'en Algérie cette plante n'a pas fait l'objet d'une étude phytochimique détaillée ou pharmacologique surtout l'évaluation de son potentiel cicatrisant. Dans ce contexte, on s'est fixé l'objectif principale de valider scientifiquement l'usage traditionnel de *Teucrium polium* L.

Cette thèse est structurée en 4 parties :

La 1<sup>ère</sup> est consacrée à une revue bibliographique nécessaire pour comprendre, discuter et interpréter les résultats obtenus.

La 2<sup>ème</sup> partie englobe les travaux personnels avec les méthodes appliquées, leurs principes, matériels, produits chimiques et réactifs utilisés. Notre travail expérimental s'articule autour de 4 volets principaux :

- ✓ Une extraction qui permet l'obtention de deux extraits (extrait méthanolique et huile essentielle).
- ✓ Une analyse phytochimique des extraits afin de permettre une identification quantitative et qualitative des molécules bioactifs présents et ayant un intérêt pharmacologique. Ces derniers ont été identifiés, caractérisés par HPLC/MS et GC/MS.
- ✓ Une étude de la toxicité aiguë par voie orale ainsi que la toxicité cutanée ont été réalisées afin de garantir l'innocuité des extraits.
- ✓ Enfin, une évaluation de l'activité antioxydante des extraits et du potentiel cicatrisant des onguents à base d'extraits.

La dernière partie présente l'ensemble des résultats obtenus avec les interprétations nécessaires.

Ce travail de thèse est achevé par une conclusion générale qui récapitule les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives de sa continuité.

*Synthèse*  
*Bibliographique*

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1. Généralités sur l'espèce d'étude

#### I.1.1. Famille des Lamiaceae

La famille des Lamiaceae, Labiaceae ou Labiées, est composée de plantes odorantes et herbacées à tige quadrangulaire pouvant devenir des arbrisseaux ; leurs feuilles sont opposées par 2, leurs fleurs bisexuées, irrégulières, à calice tubuleux ou en cloche persistant, à corolle à tube très développé et leur fruit sec se séparant en 4 articles contenant chacun 1 graine (Hilan *et al.*, 2006). C'est l'une des familles les plus utilisées en tant que plantes aromatiques et médicinales (Naghbi *et al.*, 2005) et comportant de nombreuses plantes exploitées en parfumerie, aromathérapie et industrie pharmaceutique (Akin *et al.*, 2010).

La famille des Lamiaceae, comprend environ 7000 espèces, réparties dans plus de 250 genres dans le monde (Napoli *et al.*, 2020) dont 28 genres et 146 espèces en Algérie (Quezel et Santa, 1962). La plus grande diversité est rencontrée dans le bassin méditerranéen, l'Asie centrale suivi le continent Américain, les Iles du pacifique, l'Afrique équatoriale et la Chine (Babar *et al.*, 2015).

Du point de vue chimique, cette famille a fait l'objet d'intenses investigations dans le but d'isoler différents types de composés. Parmi les genres qui sont en cause, on cite : *Ajuga*, *Rhabdosia*, *Teucrium*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonurus*, *Ballota*, *Coleus*, *Thymus* et *Phlomis*. Ces études ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les stérols, flavonoïdes, iridoïdes, sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes, largement utilisés pour leurs vertus thérapeutiques (Kabouche *et al.*, 2005).

L'espèce *Teucrium polium* L. a été choisie en se basant sur ses propriétés remarquables en phytothérapie traditionnelle et selon sa richesse en métabolites secondaires, particulièrement en huiles essentielles et polyphénols.

### **I.1.2. Le genre *Teucrium***

*Teucrium* est le genre majeur des lamiaceae ; dénommé génériquement germandrées. Il est largement utilisé en médecine traditionnelle depuis plus de 2000 ans (Darapbour, 2010). Il réparti en 340 espèces dont 20 représentées en Algérie (Kabouche *et al.*, 2007). Sur le plan taxonomique, les espèces du genre *Teucrium* sont identifiables grâce à la forme du calice et inflorescence (Grubestic *et al.*, 2007). En Algérie, plusieurs sous espèces de *Teucrium polium* L. ont été identifiées parmi lesquelles on cite : *Aureiforme*, *luteum*, *flavovirens*, *helichrysoïdes*, *thymoides*, *aurasianum*, *cylindricum*, *capitatum*, *polium*, *chevalieri*, *gyreii* (Ozenda, 1983).

### **I.1.3. Distribution géographique de la plante**

*Teucrium polium* L. est une espèce euro-méditerranéenne. Rencontrée dans les forêts, broussailles et des plaines des montagnes sur substrats calcaires et siliceux. (Quezel et Santa, 1963). La germandrée est très commune en Algérie et vu son polymorphisme elle occupe différents subdivisions biogéographiques à savoir : le sous-secteur de l'Atlas saharien oranais et algérois, des hauts-plateaux constantinois, algérois et oranais (Quezel et Santa, 1963).

### **I.1.4. Description botanique de *Teucrium polium* L.**

L'aspect de la plante est très variable, généralement sous forme de touffe dense. C'est un arbrisseau vivace plus ou moins feutré à poils blancs, ligneux avec une odeur poivrée au frottement, et ayant comme caractéristiques morphologiques (Quezel et Santa, 1962, Ozenda 1983, Thoppil *et al.*, 2001) :

- ✓ De nombreuses tiges de 10 à 30 cm portant des petites feuilles opposées sessiles, linéaires, cunéiformes, entières à la base et avec des dents arrondies, vertes au-dessus et blanchâtres au-dessous, tournant fortement sur les marges
- ✓ Des fleurs formant des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées. Le calice brièvement tomenteux, vert grisâtre à des dents courtes triangulaires, la partie supérieure obtuse
- ✓ Une corolle blanche à lèvre supérieure tronquée et à lobes supérieurs pubescents
- ✓ des étamines tordues en spirale après l'anthère, insérées sur le tube de la corolle
- ✓ Inflorescences en capituliformes jusqu'à 1 cm, denses au sommet des tiges, avec de petites bractées florales mais ressemblant à des feuilles
- ✓ Le fruit est constitué de 4 parties brunes et orné en réseau à sa surface



**Figure 01 : Aspect morphologique de *Teucrium polium* L.**

### **I.1.5. Systématique de la plante**

*Teucrium polium* L. est classé comme suit (Quezel et Santa,1963) :

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Teucrium</i>
Espèce	<i>Teucrium polium</i> L.

### **I.1.6. Noms vernaculaires de la plante**

La synonymie de l'espèce diffère en fonction de deux critères : la population et la localisation de la plante. Plusieurs noms sont donnés à *Teucrium polium* L.: (Quezel et Santa, 1963 ; Bahramikia et Yazdanparast 2012)

- ✓ Nom arabe : khayata, hamzoucha, hamria, djertil, jaada, Jead
- ✓ Nom français : Germandrée tomenteuse, Pouliot des montagnes
- ✓ Nom Anglais : Felty germander

### **I.1.7. Composition chimique de la plante**

Les extraits de la partie aérienne de *Teucrium polium* L. sont riches en polyphénols, flavonoïdes, iridoïdes et stéroïdes (Djabou *et al.*, 2012, Movahedi *et al.*, 2014). Les huiles essentielles contiennent principalement des monoterpènes, des diterpènes, des sesquiterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes oxygénés (Kabouche *et al.*, 2007, Krache *et al.*, 2017).

Des études préliminaires réalisées sur les feuilles et les fleurs de *Teucrium polium* L. ont révélé la présence de composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes et les tanins, ainsi que d'autres composés, des saponines, des stéroïdes. Le carvacrol et le caryophyllène sont les éléments les plus abondants des huiles essentielles dans *Teucrium polium* L. (Malki et Yahia 2014).

### **I.1.8. Utilisations traditionnelles et scientifiques de la plante**

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). De plus, de nombreuses activités biologiques ont été étudiées *in vitro* et *in vivo*, pour différents extraits de cette plante, telles que les activités : antioxydante, anticancéreuse, analgésique, diurétique, antipyrétique, anti-inflammatoire et antispasmodique (Kabouche, 2007, Sharififar *et al.*, 2009, Akin *et al.*, 2010, Saleh *et al.*, 2020).

### **I.1.9. Toxicité de la plante**

Les effets toxiques causés par la Germandrée varient selon la dose et la durée d'utilisation (Bachtarzi *et al.*, 2016; Dağ *et al.*, 2014). Une utilisation prolongée (qui dépasse les 90 jours) engendre des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques (Aktürk Esen *et al.*, 2019; Rafieian-

Kopaei et Baradaran, 2013). L'étude de toxicité aiguë (16 g/Kg de plante pendant 14 jours) et subaiguë (500 et 1000 g/Kg pendant 28 jours) sur des souris et des rats a révélé que la plante était non toxique (Meguellati *et al.*, 2019).

## **I.2. Métabolites secondaires**

Les plantes médicinales renferment des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites (Hopkins, 2003) :

- Les métabolites primaires : ce sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules d'une plante pour y assurer sa survie et jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction des cellules (glucides, protéines, lipides et acides nucléiques).
- Les métabolites secondaires : ce sont des molécules ayant une répartition limitée dans la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. ils sont divisés principalement en polyphénols, terpènes et alcaloïdes.

Les métabolites secondaires jouent plusieurs rôles sur les plans physiologiques, technologiques et nutritionnels. Ces multiples rôles sont en relation avec leurs structures chimiques d'où l'intérêt particulier accordé aux recherches sur ces métabolites (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

### **I.2.1. Grands groupes de métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes, parmi lesquels, les composés phénoliques, les terpènes, stéroïdes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possède une très large gamme d'activités biologiques (Li *et al.*, 2007).

### **I.2.1.1. Composés phénoliques**

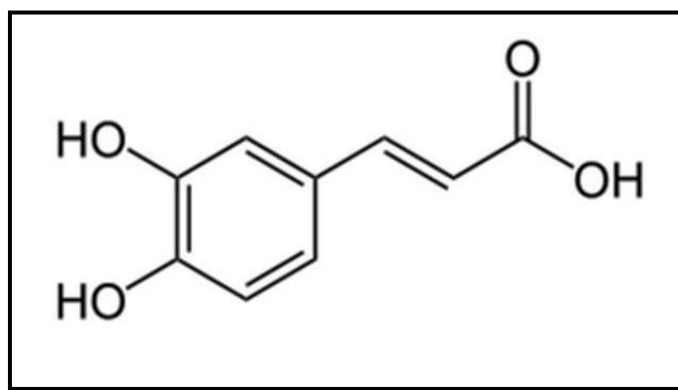
Les polyphénols constituent un groupe de métabolites le plus répandu du règne végétale avec plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues (Marin et Andriantsitohaina, 2002). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits) (Boizot et Charpentier, 2006). L'élément de base qui caractérise les structures des composés phénoliques est le noyau benzénique.

Les principales classes des composés phénoliques sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (Boizot et Charpentier 2006).

- **Acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les végétaux et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique.

Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféïque, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

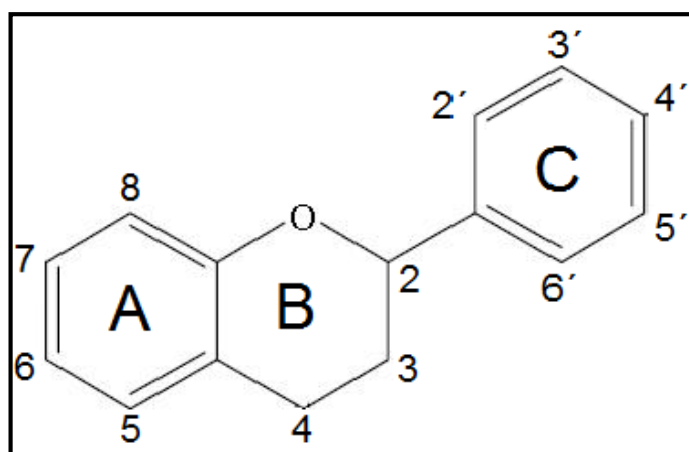


**Figure 02 : Structure chimique de l'acide caféïque (Boizot et Charpentier, 2006).**

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Erlund, 2004). Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux. Ils sont rencontrés dans les fruits et les légumes, le thé, le café et dans plusieurs plantes médicinales utilisées comme remèdes en médecine traditionnelle dans le monde (Di Carlo *et al.*, 1999).

Ces composés dérivent de l'enchaînement benzo- $\gamma$ -pyrone (Figure 03).



**Figure 03 : Structure de base d'un flavonoïde (Di Carlo *et al.*, 1999).**

- **Tanins**

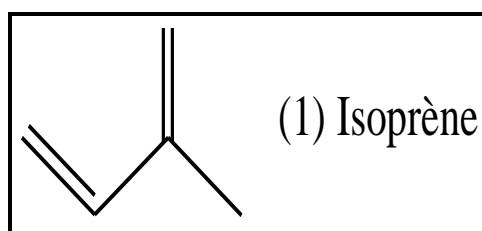
Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente ayant en commun la propriété de tanner la peau. Cette aptitude est liée à leur propriété de se combiner aux protéines. Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Dalton. On distingue deux grands groupes de tanins différents, à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Macheix *et al.*, 2005).

#### **1.2.1.2. Alcaloïdes**

En général, ces composés possèdent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Actuellement, la structure chimique d'environ 16 000 alcaloïdes est connue. Environ 20 % des espèces de plantes produisent des alcaloïdes. Ils ont une nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs (Bouclé, 2010).

### 1.2.1.3. Terpènes

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération de molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones dont l'unité de base est l'isoprène (Figure 04) (Lhuillier, 2007).



**Figure 04 : Unité de base du terpène (Lhuillier, 2007).**

Les extraits de ces molécules sont employés comme condiment ou comme parfum. Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques  $(C_5H_8)_n$ . Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien disposés en anneaux (Kabouche, 2005).

### I.3. Stress oxydant

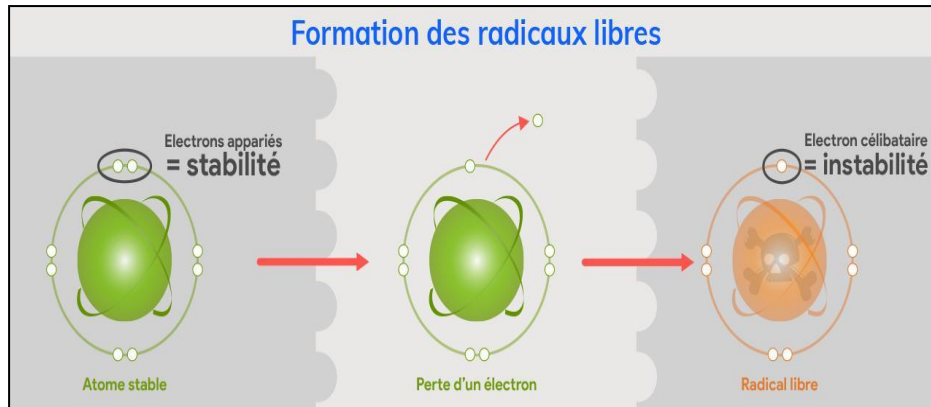
Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres ou espèces oxygénées réactives (caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs et à réguler leur production. Ceci conduit à des endommagements cellulaires et tissulaires souvent irréversibles conduisant à de nombreuses pathologies (Ríos-Arrabal *et al.*, 2013).

Cette perturbation peut avoir diverses origines, telle que : agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance) (Ríos-Arrabal *et al.*, 2013).

#### I.3.1. Radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant, sur ses orbitales atomiques externes, un ou plusieurs électrons célibataires (Ríos-Arrabal *et al.*, 2013). Cet électron lui confère une certaine instabilité et une haute réactivité (demi-vie courte) (Dian *et*

*al.*, 2017). Une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (Dacosta, 2003) (Figure 05).



**Figure 05 : Formation des radicaux libres (Dacosta, 2003).**

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. A des concentrations physiologiques, les radicaux libres jouent des rôles dans la signalisation, la migration et la différenciation cellulaire (Ziech *et al.*, 2010), mais à des concentrations plus élevées, ils induisent la mort cellulaire et l'apoptose (Salido et Rosado, 2009). La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires. Le meilleur agent pour lutter contre les radicaux libres est la présence d'antioxydant (Hasanuzzaman *et al.*, 2018).

### **I.3.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène**

Du point de vue de la terminologie, il est souvent fait mention d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron (Figure 06). Dans les systèmes biologiques, les principales espèces réactives de l'oxygène à un, deux et trois électrons sont respectivement : Le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ), et le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), et aussi certains dérivés oxygénés

réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) (Ríos-Arrabal *et al.*, 2013).

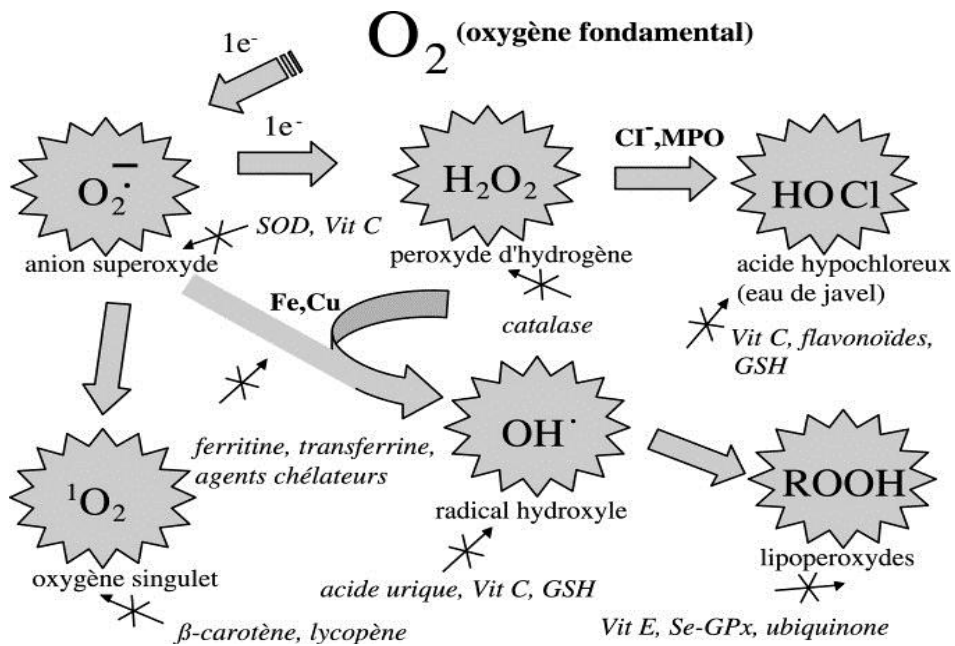


Figure 06 : Espèces réactives de l'oxygène (Pincemail *et al.*, 2002).

### I.3.1.2. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes, certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à la fin de défense (Halliwell, 1999). Les sources endogènes de ROS comprennent différents organes cellulaires tels que les mitochondries, les peroxisomes et le réticulum endoplasmique, où la consommation d'oxygène est élevée. Les sources exogènes représentées par des facteurs environnementaux dont : pollutions diverses, produits chimiques (alcools), tabagisme ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (Phaniendra *et al.*, 2015).

### I.3.2. Les Antioxydants

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des radicaux libres. Ces molécules sont désignées par le terme antioxydant (Kivrak *et al.*, 2019). Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par Halliwell comme « toute substance qui, en faible

concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1999).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Rolland, 2004).

### **I.3.2.1. Les Antioxydants endogènes**

La production physiologique d'ROS, est régulée par des systèmes de défenses endogènes effectuées par plusieurs molécules synthétisés dans notre organisme, ces systèmes sont composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (le glutathion, la bilirubine, l'acide urique, mélanine et mélatonine) et de protéines (transferrine, ferritine, ...) (Aguilar *et al.*, 2016).

### **I.3.2.2. Les Antioxydants exogènes**

En plus des substances propres à l'organisme, la défense endogène est renforcé par des apports exogènes dont : les médicaments, l'alimentation et les plantes (Rolland 2004).

- **Médicaments**

Les classes thérapeutiques d'origine médicamenteux comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihypertenseurs et d'autres constituent une source importante d'antioxydants.

- **Vitamine C ou acide ascorbique**

Est une vitamine hydrosoluble largement répondeur dans les fruits. L'ascorbate est un capteur de radicaux libres oxygénés. Elle capte les radicaux peroxydes RO<sub>2</sub> En réagissant avec ces divers oxyradicaux (Chauhan *et al.*, 2013).

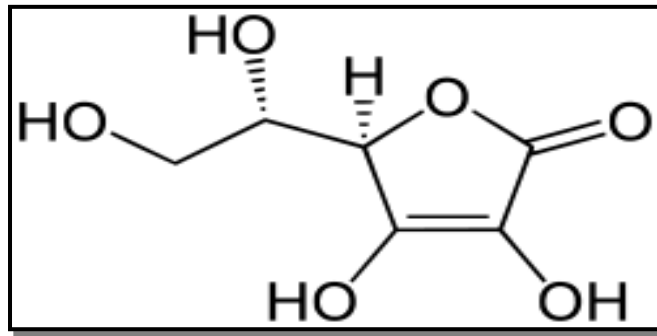


Figure 07 : Structure chimique de la vitamine C (Chauhan *et al.*, 2013).

- **Vitamine E ou tocophérol**

Est un antioxydant liposoluble protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres. Elle prévient la peroxydation des lipides membranaires en capturant les radicaux peroxydes lipidiques  $RO_2\cdot$  qui propagent les chaînes de peroxydation (Chauhan *et al.*, 2013).

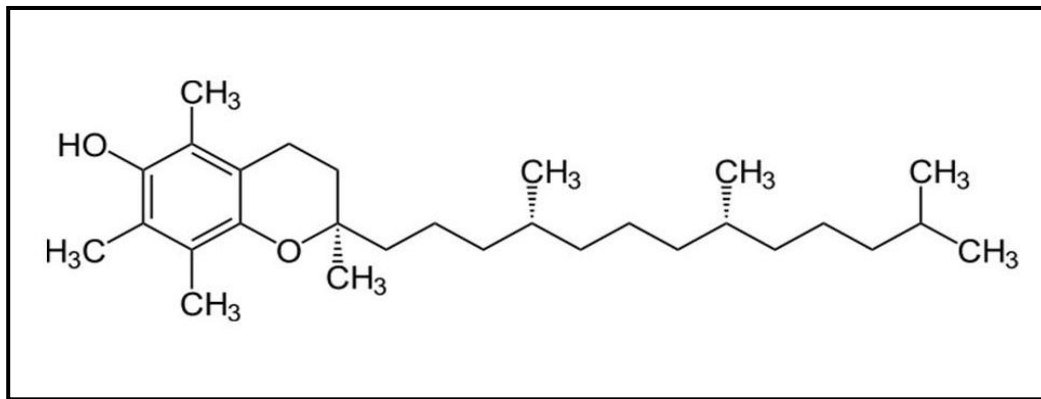


Figure 08 : Structure chimique de la vitamine E (Chauhan *et al.*, 2013).

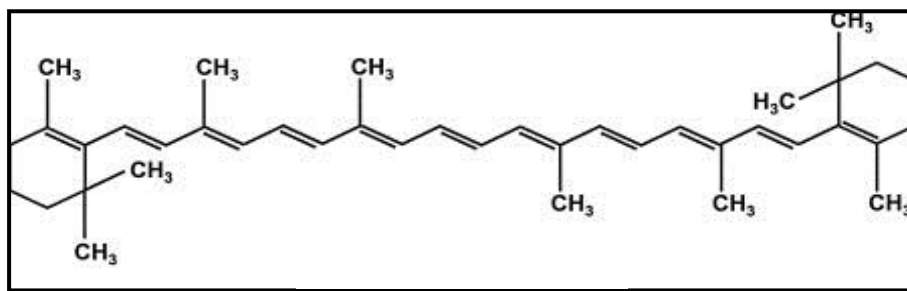
- **Sélénium**

C'est un oligo-élément connu récemment pour ses effets bénéfiques antioxydants. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure) et donne un signal préventif sur certains cancers (Hasanuzzaman *et al.*, 2012).

- **Antioxydants d'origine végétale**

Les caroténoïdes et les polyphénols sont des antioxydants naturels, ils constituent de vastes familles de composés comme : le  $\beta$ -carotène, l'acide caféique et la quercétine (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

Les caroténoïdes sont trouvées dans les légumes et fruits. Ils empêchent les dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire, elle possède la capacité de capter l'oxygène singulet  $^1O_2$ .



**Figure 09 : Structure chimique du  $\beta$ -carotène (Gardès-Albert *et al.*, 2003).**

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (Boizot et Charpentier, 2006). Les composés phénoliques sont fortement des antioxydants et anti-inflammatoires peuvent aussi avoir des propriétés antivirales.

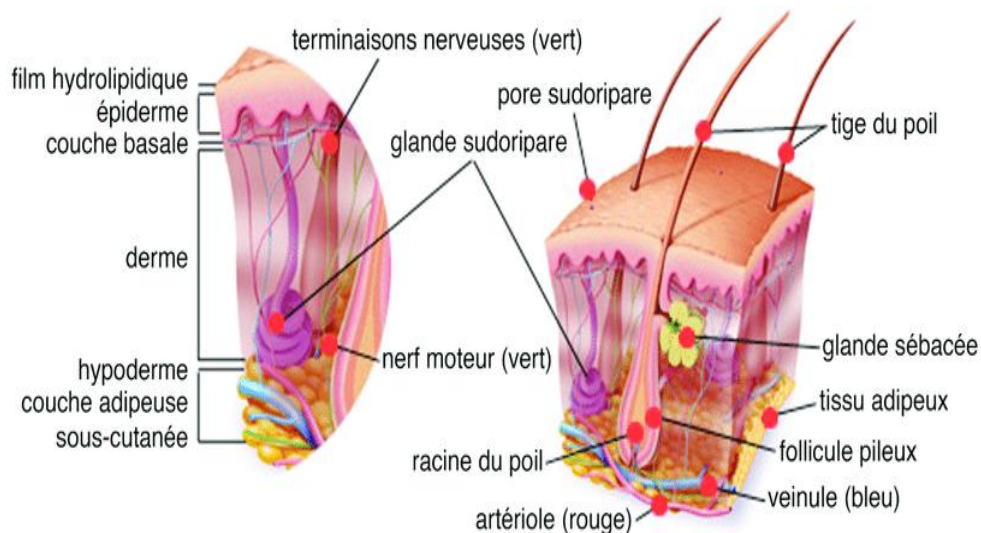
## **I.4. La Cicatrisation**

La cicatrisation d'une plaie est un phénomène biologique naturel. Les tissus humains et animaux sont capables de réparer des lésions localisées par des processus de réparation et de régénération qui leurs sont propres (Elzayat *et al.*, 2018).

### **I.4.1. La Peau**

La peau, aussi appelée tégument recouvrant le corps en entier. Chez l'adulte moyen, elle couvre une surface entre 1,2 et 2,2 m<sup>2</sup> et elle pèse environ 4kg (15% de la masse corporelle totale). Elle est riche en vaisseaux sanguins et reçoit environ un tiers du volume sanguin total en circulation. Elle est constituée de trois couches principales dont les cellules interagissent ensemble afin d'assurer ses différentes fonctions : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 10) (Kanitakis, 2002).

Ses annexes, localisées dans le derme, sont représentées par les phanères (poils et ongles), les glandes sébacées et les sudoripares. Le derme contient aussi des récepteurs sensoriels à la pression et à la température, associé à un réseau microcirculatoire et de fibres nerveuses. L'épaisseur de la peau varie selon le sexe, l'âge et la région du corps (Zaidi, 2010).



**Figure 10 : Structure de la peau (Zaidi, 2010).**

#### **I.4.1.1. Structure de la peau**

##### **➤ L'épiderme**

C'est un tissu épithélial de revêtement, sa fonction principale est la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (Jacques, 2010). Il est formé de plusieurs couches de cellules superposées dont une couche profonde formée de cellules qui se divisent très activement et assurent la régénération continue de la peau et des couches superficielles formant la couche cornée (Lacombe, 2006).

##### **➤ Le derme**

Le derme nourrit et supporte l'épiderme. C'est un tissu conjonctif irrigué par un grand nombre de vaisseaux. Il renferme aussi des terminaisons sensorielles et des glandes sudoripares. Il est constitué de fibres de collagène (support structural), d'élastine et de réticuline (responsables de l'élasticité et l'extensibilité du derme) (Guillet et Cartier, 1999).

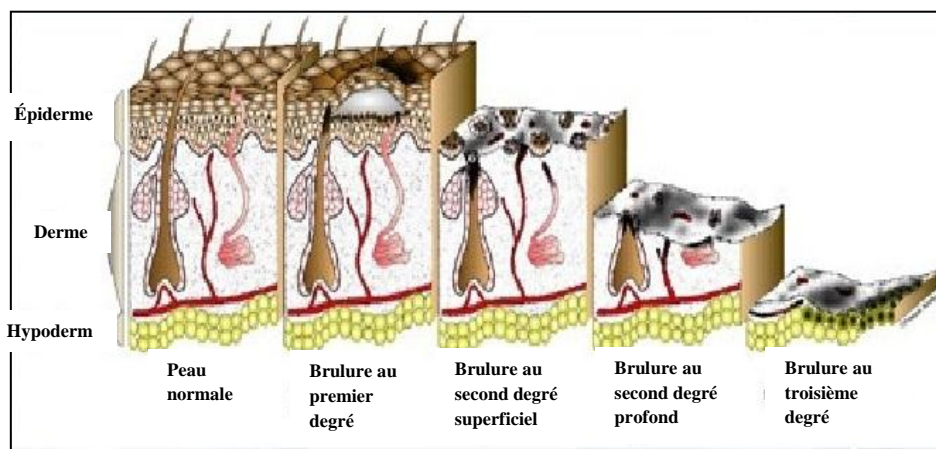
##### **➤ L'hypoderme**

L'hypoderme présente une structure lâche, qui se compose principalement de téguments lipidiques et forme une couche souple de mobilisation contenant des organes sensoriels et fonctionnels. Les couches adipeuses sont séparées les unes des autres par du tissu conjonctif. L'hypoderme a un rôle de protection (le froid, la pression et agressions) (Zaidi, 2010). Parfois, volontairement ou accidentellement, la structure de la peau peut être rompue, ceci conduit à l'apparition d'une plaie.

### **I.4.2. Définition de la plaie**

Une plaie se définit comme une rupture de la cohérence anatomique et fonctionnelle de la peau, elle est caractérisée par une perte de substance cutanée plus ou moins importante. Elle est causée généralement par un instrument tranchant, ou déchirure de la peau avec des bords irréguliers (Smeltzer *et al.*, 2010).

Les lésions de la peau peuvent être différenciées par leur profondeur (plaies superficielle, profonde, pénétrante), leur forme (linéaire, punctiforme, irrégulière), leur nombre (unique ou multiple) et leur complexité (association de différents types de lésion).



**Figure 11 : Classification des plaies en fonction de leur profondeur (Colige, 2012).**

#### **I.4.2.1. Classification des plaies**

La classification des plaies est essentielle afin d'instaurer le meilleur traitement possible en fonction de leur gravité, de leur évolution, du dommage tissulaire et de leur couleur (Tableau 01) (Elzayat *et al.*, 2018).

**Tableau 01 : Classification des plaies selon le stade (NPUAP 2014).**

<b>Stade</b>	<b>Caractéristiques de la plaie</b>
<b>Stade I</b>	Zone d'érythème avec décoloration de la peau, chaleur et œdème.
<b>Stade II</b>	Perte tissulaire partielle touchant l'épiderme, le derme ou les deux avec absence de nécrose et a contours rouges, chauds, partiellement indurés.
<b>Stade III</b>	Perte tissulaire totale atteignant le tissu sous-cutané et pouvant s'étendre au fascia sous-jacent sans toutefois le pénétrer. Présence de nécrose et d'inflammation.
<b>Stade IV</b>	Perte tissulaire totale atteignant le muscle, l'os et les structures de soutien, telles que tendon et capsule articulaire avec destruction et nécrose importantes ; infection systémique possible.
<b>Stade X</b>	Escarrification jaunâtre ou tissu nécrosé noir épais recouvrant le lit de la plaie (limite ainsi l'évaluation de l'extension de la plaie). Toutes les plaies (sauf le stade I, où la peau est intacte) peuvent passer par ce stade : il faut enlever l'escarre et les tissus morts afin d'évaluer le vrai stade de la plaie.

À noter que les plaies sont souvent très douloureuses aux stades I et II et très longues à guérir aux stades III et IV.

### **I.4.3. Cicatrisation des plaies**

La cicatrisation est l'ensemble des phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée (Chen *et al.*, 1992). Ce phénomène naturel est possible grâce à la coopération entre de nombreux médiateurs solubles (facteurs de croissance et cytokines), la mise en jeu de différents types cellulaires (cellules inflammatoires, endothéliales, sanguines, épithéliales et immunitaires) et les interactions avec la matrice extracellulaire (Chen *et al.*, 1992).

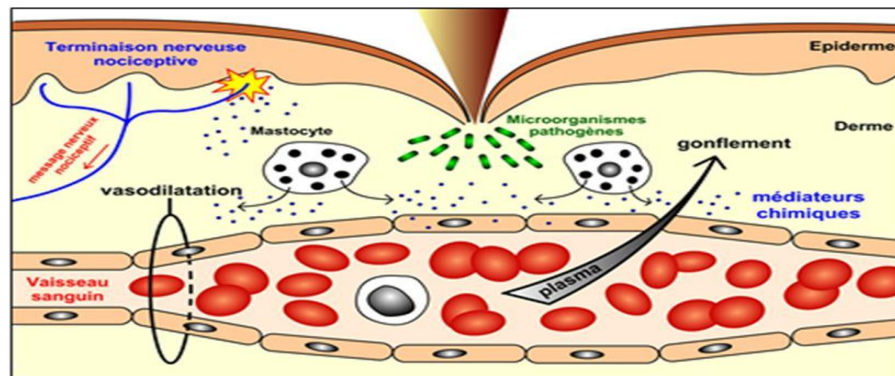
#### **I.4.3.1. Les phases de la cicatrisation**

Le déroulement de la cicatrisation d'une plaie profonde (qui atteint également le derme) est classiquement divisée en quatre étapes principales : la phase vasculaire, la phase inflammatoire, la phase épithéliale et la phase de remodelage tissulaire (Xiamin *et al.*, 2019).

Ces phases sont orchestrées de manière contrôlée pour reprendre leur fonctionnement normal (Elzayat, 2018). Ces étapes de la cicatrisation sont interdépendantes, elles ne sont pas strictement séparées dans le temps mais se chevauchent (Monique, 2019).

➤ **Phase vasculaire et hémostatique (1-2 jours)**

Le processus de cicatrisation normale commence immédiatement après la lésion tissulaire. La plaie provoque une rétraction élastique des berges et une effraction vasculaire. Le saignement déclenche le processus d'hémostase par vasoconstriction et agrégation plaquettaire, ce qui entraîne un écoulement de facteurs de coagulation pour former un caillot de fibrine. Ce caillot sanguin comble la plaie et les polynucléaires affluents. Il y a libération de chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance tels que : le facteur de croissance transformant (TGF)-b, dérivé des plaquettes du facteur de croissance (PDGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), et facteur de croissance épidermique qui déclenchent l'inflammation (Figure 12).



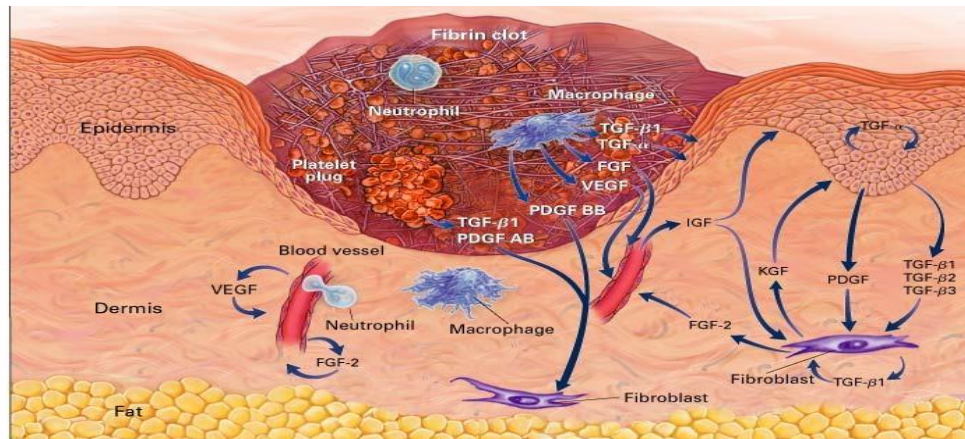
**Figure 12 : Phase vasculaire et hémostatique (Monique, 2019).**

➤ **Phase inflammatoire dite de détersion (2 à 15 jours)**

Une plaie, implique toujours la présence d'une réaction inflammatoire qui va durer jusqu'à la phase de remodelage tissulaire. Cette réaction est caractérisée par un gonflement provoqué par la formation d'exsudat, une rougeur et une chaleur due à la vasodilatation. Elle permet de stopper l'hémorragie et de combattre les pathogènes. Les neutrophiles et les macrophages digèrent les bactéries et libèrent des facteurs de croissance ; des cytokines et des protéases. Elle fournit une matrice provisoire pour la migration des cellules et joue un rôle dans la formation du tissu cicatriciel (Figure 13).

Il y a migration et activation des cellules inflammatoires

- ✓ Les polynucléaires neutrophiles puis les macrophages, dont le rôle est anti-infectieux ;
- ✓ Les fibroblastes apparaissent ainsi que les fibres de collagène qu'ils synthétisent ;
- ✓ La croissance du tissu conjonctif de granulation repousse le caillot fibrineux vers la surface ;
- ✓ Le bourgeon épidermique apparaît sur les berges.



**Figure 13 : Phase inflammatoire (Monique, 2019).**

➤ **Phase de ré-épithélialisation (Plusieurs semaines)**

La troisième phase de la cicatrisation consiste à reformer un nouveau tissu au niveau de la plaie. C'est une phase essentiellement cellulaire qui permet de restaurer la fonction de barrière épidermique grâce à la prolifération et à la migration des kératinocytes. Il y a prolifération des fibroblastes. La synthèse du collagène devient abondante et la matrice extracellulaire se réorganise.

L'angiogenèse avec la prolifération des cellules endothéliales permet la reconstruction d'un réseau vasculaire avec l'apport d'oxygène et de nutriments. Comme conséquence, le tissu de granulation est en formation, l'épithélialisation le recouvre progressivement à partir des berges ou des annexes et la contraction des berges se fait avec l'apparition de myofibroblastes. (Figure 14).

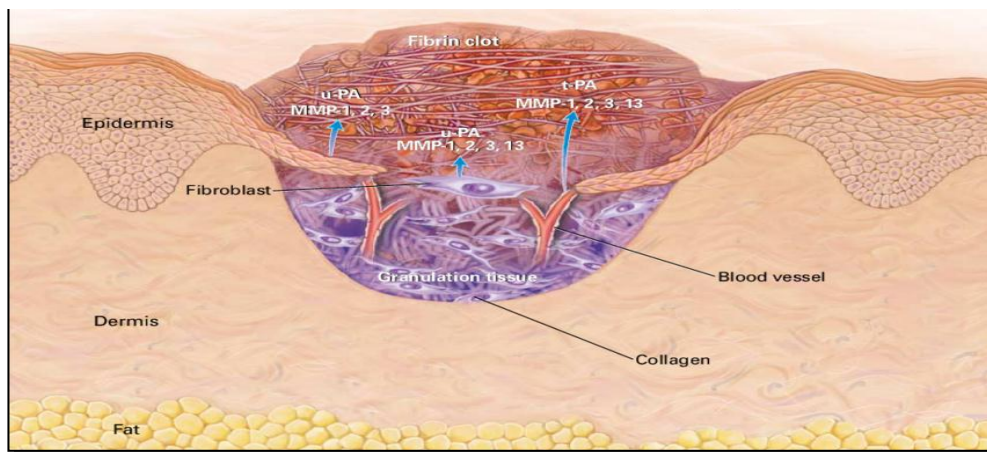


Figure 14 : Phase de ré-épithélialisation (Monique, 2019).

➤ Phase de remodelage dite de maturation cicatricielle (1 mois à plusieurs années)

Même si la matrice extracellulaire est remodelée pendant tout le processus de cicatrisation, la phase de remodelage proprement dite débute deux à trois semaines après la blessure et peut durer quelques années selon la nature de la plaie.

Lors de cette phase, de nombreux processus activés lors de la cicatrisation vont s'arrêter. La plupart des cellules migrent hors du site de la blessure ou entrent en apoptose. Cette phase est caractérisée par la maturation et l'épaississement de l'épiderme, le remodelage de la matrice extracellulaire, la normalisation du réseau capillaire et la maturation cicatricielle (figure 15).

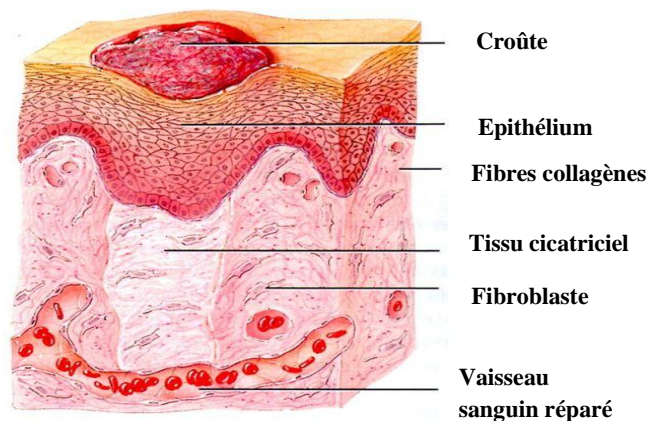


Figure 15 : Phase de maturation (Monique, 2019).

#### **I.4.3.2. Facteurs influençant la cicatrisation**

Plusieurs facteurs peuvent influencer le processus de cicatrisation, parmi ces facteurs on cite : la malnutrition (carence en albumine, fer, zinc, vitamine C), l'âge (diminution des processus de réparation), le diabète, l'obésité, le tabagisme (hypo-vascularisation), la localisation de la plaie, son environnement, son hydratation, son degré de contamination et sa vascularisation (une bonne vascularisation est essentielle pour une bonne cicatrisation) (Monique, 2019).

#### **I.4.3.3. Traitement local des plaies**

Le traitement des plaies dépend de leur importance et de leur gravité (Elzayat *et al.*, 2018). Elles peuvent nécessiter un traitement général, en plus du traitement local. Les produits conventionnels couramment utilisés sont les antiseptiques et les antibiotiques (Poinsat et Talon, 2017). Parfois, on a recours à des produits cicatrisants tels que le miel et propolis ou aux plantes médicinales.

Parmi les produits de phytothérapie utilisés, certains ont fait l'objet d'essais expérimentaux pour tenter de mettre en évidence leurs potentiels cicatrisants. Selon les résultats des études, les plantes peuvent stimuler l'angiogenèse et les tissus de granulation ou potentialiser le processus de cicatrisation et en même temps avoir un rôle antiseptique c'est le cas de *Centella asiatica*, *Allium cepa*, *Terminalia chebula* (Soni et Singhai, 2012).

En Algérie, peu d'études scientifiques existent sur le potentiel cicatrisant des plantes médicinales locales, pourtant les enquêtes ethnobotaniques citent plusieurs plantes, et même plusieurs recettes à base de plante, de miel et d'huile d'olive (Boudjelal *et al.*, 2013).

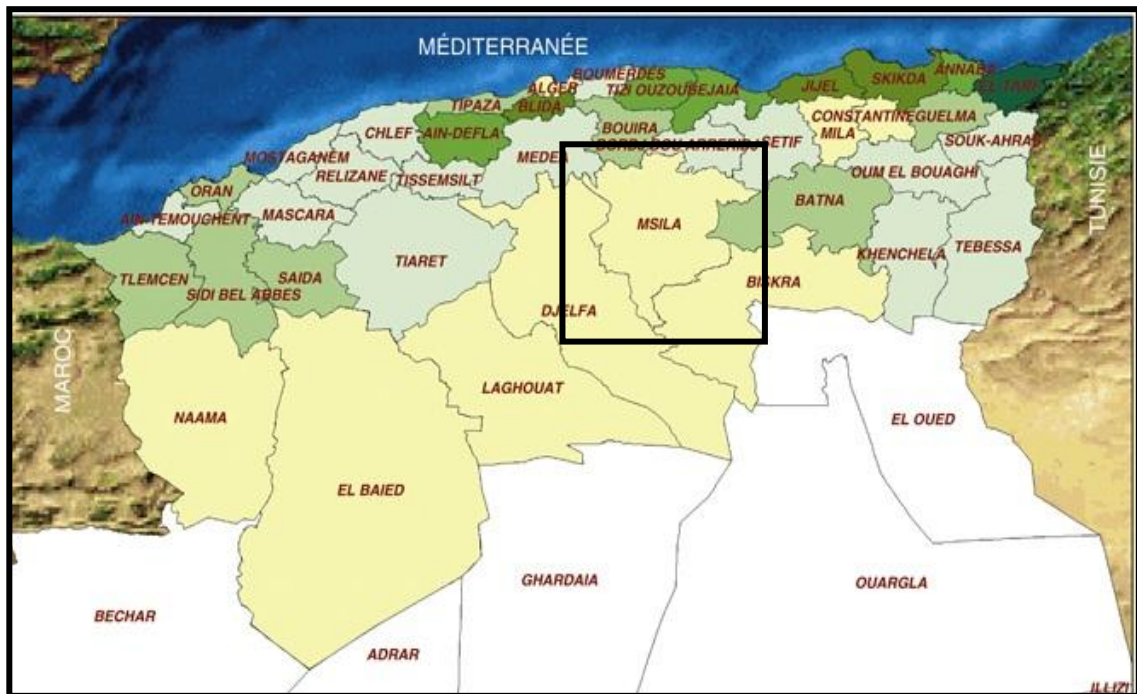
# *Matériel et Méthodes*

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. Présentation de la zone d'étude

#### II.1.1. Localisation géographique

La Wilaya de M'Sila se situe à 35°40' latitude Nord et 04°30' longitude Est, sur une altitude d'environ 500 m. Elle est située au Sud Est d'Alger, limitée au Nord par les Wilaya de Médéa, Bordj Bou-Arredj, Sétif et Bouira, à L'Ouest par Djelfa, à l'Est par Batna et au Sud par Djelfa et Biskra (Figure 16). Elle couvre pré de 18,175 Km<sup>2</sup> (Station météorologique de M'Sila).



**Figure 16 : Localisation géographique de la wilaya de M'sila.**

Sur le plan régional, la Wilaya de M'Sila occupe une position privilégiée dans la partie centrale de l'Algérie du nord dans son ensemble, elle fait partie de la région des hauts plateaux du centre. Le territoire de la wilaya constitue une zone charnière entre deux grandes chaînes de montagnes qui sont l'Atlas Saharien et l'Atlas Tellien. Cette localisation lui donne une configuration géographique spécifique caractérisée par deux principaux écosystèmes : steppe (représentée par Chott El-Hodna) et de la forêt (représentée au nord par la forêt de Maadid et de Ouanougha et au sud par la forêt de Djebel Messaad) (Boudjelal *et al.*, 2013).

## II.2. Matériel végétal

La partie aérienne de *Teucrium polium* L. ssp *capitatum* a été récoltée en période de floraison durant le mois de Mai 2018 à Bousaâda (située à 69 km au sud-ouest de la wilaya de M'Sila) (Figure 17).



**Figure 17 : *Teucrium polium* L.**

L'identification botanique de la plante a été faite par le Dr. Sarri Dj, en se basant sur les critères morphologiques de Quezel et Santa, du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences, Université Mohammed Boudiaf/ M'Sila. Un spécimen (AB-92) a été déposé au niveau de l'herbier du même département. La plante a été nettoyée, séchée puis réduite en poudre en vue de son utilisation ultérieure.

## II.3. Animaux

Les animaux (des lapins New Zélandais albinos pesant entre 1.9 et 2.1 kg et des souris Swiss pesant entre 31 et 33 g) ont été ramenés de l'institut Pasteur d'Algérie/Alger. Ils ont été alimentés *ad libitum* avec un régime de croquette (Office Nationale de l'Alimentation du Bétail, Bejaia) et de l'eau. Ils ont été maintenus dans les conditions de température et de lumière ambiante. Tous les protocoles expérimentaux étaient conformes à la Directive du Conseil de la Communauté Européenne (86/609/CEE) et l'Association Algérienne des Sciences en Expérimentation Animale.

#### **II.4. Préparation des extraits**

L'extrait méthanolique a été obtenu en utilisant une extraction continue au Soxhlet. La poudre de plante (50 g) a été mise en contact avec 500 ml de méthanol pendant 6 h (Bimakr *et al.*, 2011). L'extrait méthanolique (EM) obtenu a été filtré puis soumis à une évaporation à basse pression à 35 °C dans un rotavapor (Buchi 461).

L'huile essentielle (HE) a été obtenue par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, en immergeant la poudre de plante (100 g) dans un ballon contenant 1000 ml d'eau distillée pendant 3 h (European Pharmacopoeia, 2005). L'huile a été séchée avec du sulfate de sodium anhydre.

Les rendements d'extraction de l'EM et l'HE ont été calculés selon la formule suivante :

$$\mathbf{R\ (\%) = [(M_{\text{Extrait}} / M_{\text{Plante sèche}})] \times 100}$$

Où :

R (%) : Rendement d'extraction

M<sub>Extrait</sub> : Masse de l'extrait

M<sub>Plante sèche</sub> : Masse de la plante sèche

Les extraits obtenus (EM et HE) ont été conservés dans des flacons ambrés à 4°C pour une identification phytochimique complète ainsi que pour une étude toxicologique et évaluation des activités biologiques *in vitro* et *in vivo* (antioxydante et cicatrisante) (Figure 18).

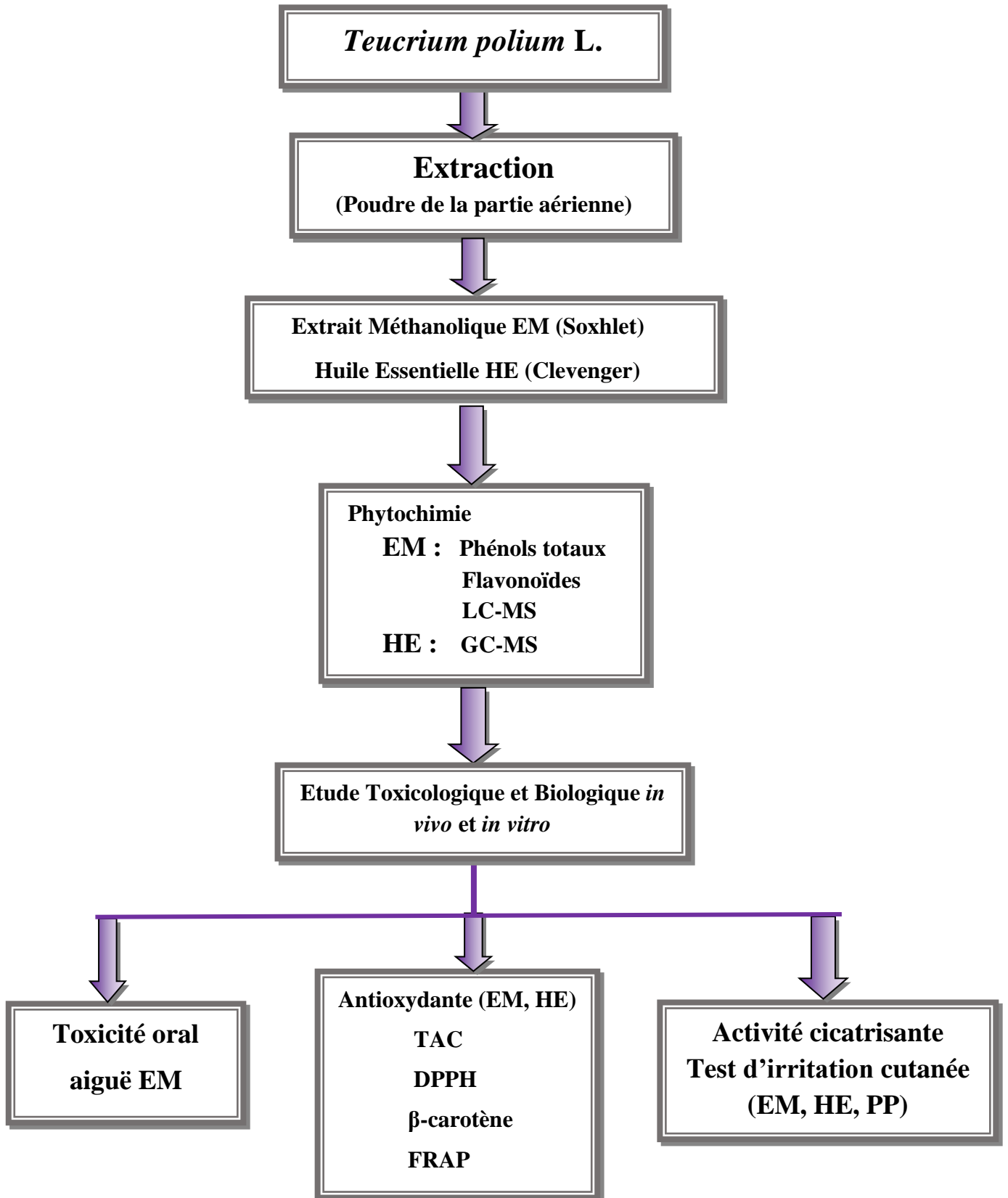


Figure 18 : Extraction, identification, toxicité et activités biologiques des extraits de *Teucrium polium* L.

## **II.5. Analyses phytochimique des extraits**

### **II.5.1. Dosage des polyphénols totaux**

La teneur totale en phénol de l'extrait méthanolique a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965). Un volume de 0.2 ml de l'extrait a été mélangé à 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu. Après 4 min, 0.8 ml d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/l) sont ajoutés au mélange. La solution finale est gardée à la température ambiante pendant 2 h. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. La teneur phénolique totale a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

### **II.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux**

Le taux de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique a été mesuré selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (Carocho *et al.*, 2014). 1 ml d'extrait méthanolique a été mélangé avec 1 ml d'une solution de méthanol à 2% d'AlCl<sub>3</sub>. Après 10 min, l'absorbance a été déterminée à 430 nm. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ / g ES).

Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

### **II.5.3. Analyse de l'EM par HPLC-UV-MS-ELSD**

L'analyse HPLC-UV-MS-ELSD de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* L. a été réalisée au niveau de laboratoire de Pharmacie-Biologie, Université de Bale, Suisse.

L'extrait méthanolique de *T. polium* L. (32 g) a été mis en suspension dans 500 ml d'eau puis successivement partitionné avec acétate d'éthyl EtOAc (3 x 500 ml) et n-butanol n-BuOH saturé en H<sub>2</sub>O (4 x 500 ml), pour fournir une fraction soluble dans EtOAc (8,2 g), une fraction soluble dans le n-BuOH (10,8 g) et une fraction soluble dans le H<sub>2</sub>O (12,6 g).

L'analyse HPLC-PDA-MS de ces fractions (EtOAc, n-BuOH et H<sub>2</sub>O) a été effectuée sur un système chromatographique équipé d'un dégazeur, une pompe quaternaire (LC-20AD), un four à colonne (CTO-20AC), un détecteur PDA (SPD-M20A) et un spectromètre de masse à trois quadripôles (LCMS-8030) (Shimadzu, Kyoto, Japon). La séparation a été réalisée sur une colonne SunFire C18 (3,5 µm, 3,0 x 150 mm i.d., Waters) équipée d'une colonne de garde (3,0 x 10 mm). La phase mobile était constituée d'eau +

0,1% d'acide formique (A) et d'acétonitrile + 0,1% d'acide formique (B). Un gradient de 5-80% de B en 30 min suivi de 80-100% de B en 5 min a été appliqué. Le débit était de 0,4 ml / min. 10 µl de l'extrait (dissous dans du DMSO) ont été injectés. Le logiciel LabSolutions (Shimadzu) a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.

La fraction EtOAc a été préparé sous forme de charge sèche, elle est adsorbé dans 25g de gel de silice 60. Cette fraction a été séparée par chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) sur une colonne de silice (47 x 5 cm, i.d) avec un gradient de n-hexane / EtOAc / MeOH [n-hexane / EtOAc (98: 2) (0-10 min), n -hexane / EtOAc 2-70% EtOAc (10-420 min), n-hexane / EtOAc 70-100% EtOAc (420-480 min), EtOAc / MeOH 0-20% MeOH (480-540 min), 100% MeOH (540-600 min)] à un débit de 20 ml / min. Au total, 540 fractions ont été collectées, elles ont été combinées sur la base d'une analyse CCM entre tous les cinq fractions pour obtenir 22 fractions de compositions différentes (Fr.1-Fr.22).

La HPLC préparative a été effectuée sur un système LC / MSD préparatif (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) constitué d'une pompe quaternaire (série 1200, 1290 Infinity II 1260 Prep Bin Pump), un détecteur PDA (série 1100) et un LC / MS quadripôle 6120. Une colonne OBD SunFire Prep C18 (5 µm, 30 x 150 mm i.d., Waters, Milford, MA, USA), équipée d'une cartouche C18 Prep Guard (10 x 30 mm i.d.) a été utilisée. Le débit était de 20 ml / min. L'acquisition et le traitement des données ont été effectués à l'aide du logiciel ChemStation (Agilent Technologies). Un système d'injection manuelle 1290 Infinity II 1290 Valve Drive (Agilent Technologies) a été utilisé.

La séparation HPLC préparative, avec différents gradient d'acétonitrile dans l'eau (tous les deux contenant 0,1% d'acide formique) en 30 min, des fractions sélectionnée a donnée des différents composés tels que:

- Fr. 11 (85 mg) : le composé **14** (1,3 mg, tR = 29,3 min) avec un gradient de 5% à 80%.
- Fr. 14 (327 mg) : Les composés **10** (12,5 mg, tR = 11,9 min), **11** (2,0 mg, tR = 12,6 min) et **13** (16,9 mg, tR = 19,3 min) avec un gradient de 45% à 60%.
- Fr. 21 (247 mg) : les composés **9** (6,1 mg, tR = 20,8 min) et **12** (3,0 mg, tR = 23,9 min) avec un gradient de 5% à 80%.
- Fr. 22 : le composé **2** (11,4 mg, tR = 11,3 min) avec un gradient de 15% à 50%.

- Une fraction (25,6 mg) : le composé **3** (3,5 mg, tR = 21,4 min), un mélange de **4** et **5** (4,8 mg, tR = 23,4 min) et **6** (3,3 mg, tR = 29,8 min) avec 16% acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique.
- Une partie de la fraction soluble dans le n-BuOH (1,0 g): le composé **1** (373 mg, tR = 11,6 min) avec un gradient de 5% à 80%.

Les composés isolés purs ont subi une analyse RMN pour bien identifier la structure chimique. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III (Rheinstetten, Allemagne) fonctionnant à 500,13 MHz pour  $^1\text{H}$  et 125,77 MHz pour  $^{13}\text{C}$ . Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN 2D ont été mesurés dans DMSO-d<sub>6</sub> ou CDCl<sub>3</sub> (ARMAR Chemicals) avec une sonde TXI 1 mm à 23 ° C. Les données ont été analysées à l'aide des logiciels Topspin (Bruker) et Spectrus Processor (ACD / Lab, Toronto, Canada).

#### **II.5.4. Analyse de l'HE par GC-FID-MS**

Cette analyse de l'huile essentielle a été réalisée au niveau de l'institut chimie biomoléculaire à Catania, Italie.

L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse (GC) a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse modèle 17A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un logiciel d'exploitation Class VP Chromatography Data System version 4.3 (Shimadzu, Japon).

1 µl d'HE a été injecté en mode split (1: 200) dans une colonne capillaire SPB-5 (15 m x 0.10 mm x 0.15 µm) avec le hélium (1 ml/min) comme gaz vecteur. La température du four a été maintenue à 60°C pendant 1 minute, puis programmée à 250°C au niveau de l'injecteur et 280°C dans le détecteur. Après injection, la vitesse linéaire de migration à l'intérieur de la colonne a été de 19 cm/sec. Les pourcentages de composés ont été déterminés à partir de leurs zones de pic dans les profils GC-FID.

La chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) a été réalisée en mode rapide sur un modèle GCMS-QP5050A, et un logiciel d'exploitation GCMS solution version 1.02 (Shimadzu), avec la même colonne et les mêmes conditions opératoires utilisées pour GC-FID analytique.

1 µl d'HE a été injectée en mode split (1:96) dans la colonne à une tension d'ionisation de 70 eV et multiplicateur d'électrons 900 V. La température de la source d'ions a été de 180°C. Les données de spectres de masse ont été acquises en mode de balayage dans la plage m / z 40-400.

L'identité des composants a été réalisée en se basant sur la comparaison de leur indice de rétention GC (par rapport aux n-alcanes C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> sur la colonne SPB-5), la correspondance informatique des données spectrales MS avec celles des bibliothèques NIST MS, la comparaison des modèles de fragmentation avec ceux rapportés dans la littérature et, dans la mesure du possible, la co-injection avec des standards authentiques.

## **II.6. Evaluation toxicologique et biologiques (*in vivo* et *in vitro*) des extraits de *T. polium***

### **L.**

#### **II.6.1. Etude toxicologique**

##### **II.6.1.1. Test de toxicité orale aiguë**

L'étude de la toxicité de l'extrait méthanolique de la plante a été menée conformément aux directives de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 423, 2002b). Cette étude a permis, après administration de l'extrait, d'évaluer les symptômes observés et de fournir une indication sur la classe de toxicité de l'extrait selon la DL<sub>50</sub> (Tableau 02).

**Tableau 02 : Échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949) pour les souris et les rats (Frank *et al.*, 1992).**

<b>Indice de toxicité</b>	<b>Classes de toxicité</b>	<b>DL<sub>50</sub> par voie orale pour la souris ou le rat (dose unique)</b>
<b>1</b>	Extrêmement toxique	< 1 mg/kg pc
<b>2</b>	Très toxique	1 à 50 mg/kg pc
<b>3</b>	Moyennement toxique	50 à 500 mg/g pc
<b>4</b>	Faiblement toxique	500 à 5000 mg/kg pc
<b>5</b>	Pratiquement non toxique	5000 à 15000 mg/kg pc
<b>6</b>	Relativement sans danger	> 15000 mg/kg pc

##### **II.6.1.2. Constitution des groupes et traitements des animaux**

Des souris femelles Swiss ont été divisées en quatre groupes de trois souris chacun. Le groupe 1, témoin sain, a reçu de l'eau distillée ; les groupes 2, 3 et 4 ont reçu en dose unique et par voie orale l'extrait méthanolique aux doses 1000, 2000 et 5000 mg / kg de poids corporel respectivement.

### **II.6.1.3. Observations des animaux**

Les souris traitées ont été observés individuellement pendant les 4 premières heures qui ont suivi les traitements, puis régulièrement durant les premières 24 et 48 h et quotidiennement par la suite pendant 14 jours. Durant cette période, toutes les variations comportementales et symptomatiques observées à l'œil nu sont reportées y compris le nombre de morts. Les observations portaient principalement les aspects physiques externes (apparence et perte de cheveux), perturbations comportementales et physiologiques (agitation, anorexie, paralysie partielle, asthénie, sensibilité au bruit et à la lumière, hypersalivation) et les signes cliniques (changements dans les rythmes cardiaque et respiratoire, contraction abdominale, diarrhée) (Hussain Mir *et al.*, 2013).

Au cours de cette étude, l'évolution corporelle, consommation de l'eau et de nourriture par les souris le long de l'expérimentation a été suivie tous les cinq jours, leurs poids sont déterminés avant le traitement. Cette répartition a été réalisée selon l'homogénéité de leurs poids.

### **II.6.1.4. Examen histologique et dosages biochimiques sériques**

À la fin de l'expérience, les souris ont été sacrifiées. Les organes (foie, reins et cœur) ont été prélevés pour des examens histopathologiques. Le sang a été immédiatement recueilli dans des tubes pour le dosage des différents paramètres biochimiques (Gandhare *et al.*, 2013).

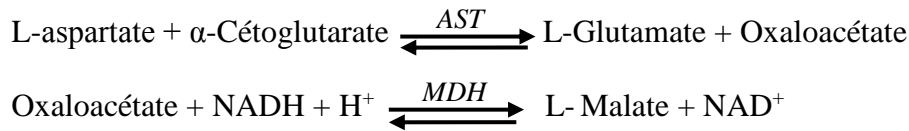
Le taux des transaminases, phosphatase alcaline, protéines sériques totales, créatinine, urée et acide urique ont été dosés selon la fiche technique Spinreact (Espagne).

- **Dosage de l'Aspartate aminotransférase (AST)**

Par la Méthode cinétique UV. IFCC. Conforme aux recommandations de l'IFCC ; *International Federation of Clinical Chemistry* (1985) (Bergmeyer *et al.*, 1986a). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS09-F 13/02/14).

➤ *Principe de la méthode*

L'Aspartate aminotransférase (AST) précédemment appelée Glutamate Oxaloacétate Transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé de la L-Aspartate au  $\alpha$ -Cétoglutarate en formant le L-Glutamate et l'Oxaloacétate. L'oxaloacétate formé est ensuite réduit en L-Malate par le Malate déshydrogénase (MDH) et en présence du coenzyme NADH,H.



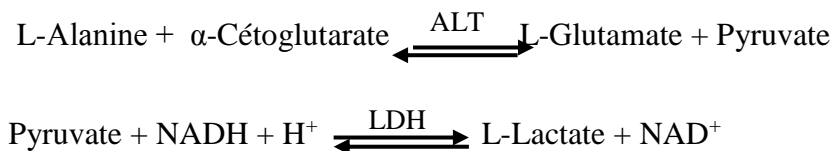
La vitesse d'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup> est proportionnelle à l'activité catalytique de l'AST. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

- **Dosage de l'Alanine aminotransférase (ALT)**

Par la Méthode cinétique UV. IFCC. Conforme aux recommandations de l'IFCC ; *International Federation of Clinical Chemistry* (1985) (Bergmeyer *et al.*, 1986 b). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS09-F 13/02/14).

➤ *Principe de la méthode*

L'alanine Aminotransférase (ALT) ou la Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé de la L-Alanine au  $\alpha$ -Cétoglutarate en formant le L-Glutamate et le Pyruvate. Le pyruvate formé est ensuite réduit en L-Lactate par le Lactate déshydrogénase (LDH) et en présence du coenzyme NADH,H.



La vitesse d'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup> est proportionnelle à l'activité catalytique de l'ALT. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

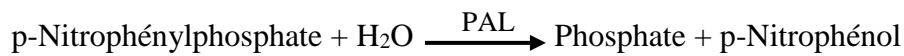
- **Dosage de la Phosphatases alcalines (PAL)**

Par la Méthode cinétique au Tampon DEA, Méthode optimisée basée sur les recommandations de la société allemande de chimie clinique DGKC (Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, 1972). Selon la fiche technique *Spinreact* (BEIS44-F 13/02/14).

➤ *Principe de la méthode*

En milieu alcalin, en présence du Magnésium (Mg<sup>2+</sup>) et d'un accepteur de phosphate, la Diéthanolamine (DEA), les Phosphatases alcalines (PAL) catalysent l'hydrolyse du p-

Nitrophénylphosphate en p-Nitrophénol (composé jaune) et phosphate inorganique, selon la réaction suivante :



La vitesse d'apparition du p-Nitrophénol, suivie par la variation de l'absorbance à 405 nm, est proportionnelle à l'activité des PAL dans le spécimen

- **Dosage des Protéines totales (Prot Tot)**

Par la Méthode colorimétrique de Biuret. Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS30-F 05/05/15).

- *Principe de la méthode*

Dans un milieu alcalin, Les ions cuivriques interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines formant un complexe bleu violet où l'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité des protéines plasmatiques.

- **Dosage de la Créatinine (Créa)**

Par la Méthode colorimétrique-cinétique de Jaffé (sans déprotéinisation). Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS13-F 13/09/13).

- *Principe de la méthode*

Le dosage de la créatinine est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium comme décrit par Jaffé (Delanghe et Speeckaert, 2011) sans l'étape de déprotéinisation de l'échantillon.

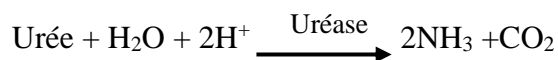
La créatinine en réagissant avec l'acide picrique en milieu alcalin forme un complexe de couleur rouge. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de la créatinine présente dans l'échantillon.

- **Dosage de l'Urée**

Par la Méthode enzymatique cinétique UV (Uréase-GLDH). Selon la fiche technique *Spinreact* (BSIS32-F 13/09/13).

➤ *Principe de la méthode*

L'urée, présente dans l'échantillon, est hydrolysée par l'uréase en Ammoniaque (NH<sub>3</sub>) et en Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). L'Ammoniaque formé réagit avec l' $\alpha$ -Cétoglutarate pour former le L-glutamate par une réaction, catalysée par la Glutamate déshydrogénase (GLDH), avec oxydation simultanée de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduite (NADH) en Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD). Deux moles de NADH sont oxydées pour chaque mole d'urée présente.



La diminution de l'absorbance due à la conversion du NADH en NAD<sup>+</sup>, mesurée pendant un temps donné à 340 nm, est proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon testé.

• **Dosage de l'Acide urique (AU)**

Par la Méthode enzymatique colorimétrique (Uricase-POD), selon la fiche technique Spinrect (BSIS01-F 12/09/13).

➤ *Principe de la méthode*

L'uricase agit sur l'acide urique présent dans l'échantillon pour produire de l'allantoïne, du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène réagit avec le 2-4 diclorophénol sulphonate (DCPS) et le 4-aminophénazone (4-AP) pour former un complexe de couleur rouge, la Quinonéimine.



L'absorbance mesurée à 520 nm (490-530) de la quinonéimine formée, est proportionnelle à la concentration de l'acide urique présent dans le spécimen (Fossati *et al.*, 1980).

## **II.6.2. Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante**

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante des extraits de plantes. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel. Le présent travail a pour but de mettre en évidence le potentiel antioxydant des extraits de *Teucrium polium* L.

### **II.6.2.1. Capacité Antioxydante Totale (TAC)**

La capacité antioxydante totale (TAC) des extraits (EM et HE) est évaluée selon la méthode de phosphomolybdène (Prieto *et al.*, 1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) en molybdate Mo (V) en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo (V) à pH acide.

Un volume de 0.3 ml des extraits (EM, HE et Acide Ascorbique dans l'eau déionisée) a été combinée avec 3 ml de la solution de réactif (0.6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes ont été incubés dans un bain-marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm. La capacité antioxydante totale des extraits a été calculée par l'équation suivante :

$$\text{TAC (\%)} = \left( \frac{A_{\text{extrait}} - A_{\text{contrôle}}}{A_{\text{blanc}}} \right) \times 100$$

Où :

$A_{\text{extrait}}$  : Absorbance de l'extrait mélangé avec la solution de réactif

$A_{\text{contrôle}}$  : Absorbance de l'eau déionisée mélangée avec l'extrait

$A_{\text{blanc}}$  : Absorbance de la solution de réactif mélangée avec de l'eau déionisée

L'activité antioxydante a été exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent acide ascorbique par mg d'extrait ( $\mu\text{g}$  EAA / mg ES). Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

### **II.6.2.2. Test de piégeage de radical libre DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle)**

Le DPPH se caractérise par sa capacité à produire des radicaux libres relativement stables. Ce test consiste à la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH $\bullet$  en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire DPPH-H (Figure 19). En effet, la présence des radicaux DPPH $\bullet$  donne une coloration pourpre foncée à la solution et qui absorbe fortement à 517 nm. Au

cours de la réaction, la colorimétrie de la solution change sous l'effet d'un agent antioxydant qui entraîne la décoloration de la solution (Athamena *et al.*, 2010).

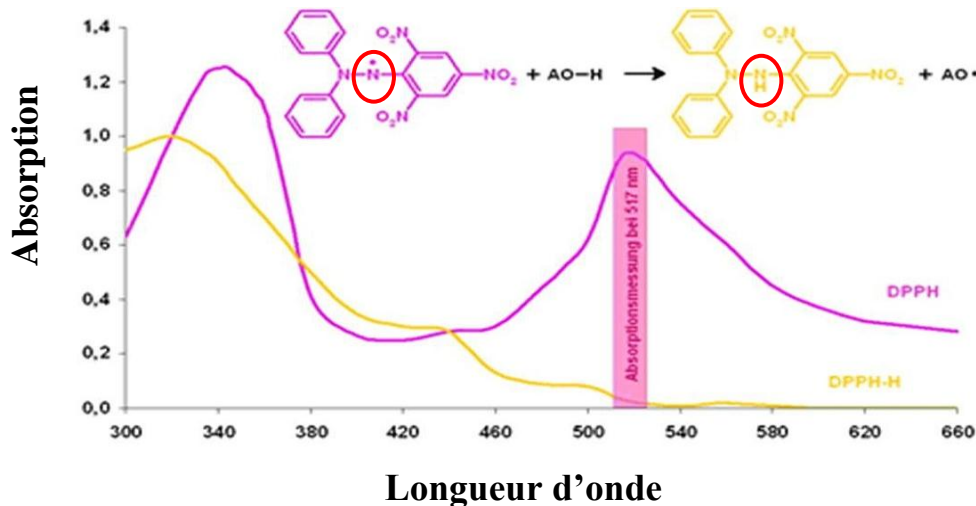


Figure 19 : Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive (Matkowski *et al.*, 2008).

Ce test est réalisé selon le protocole décrit par Li *et al.*, (2009). Un volume de 1ml des extraits (EM, HE et BHT) à différentes concentrations a été mélangé avec du DPPH 0.1 mM. Le mélange a été laissé à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été lue à 517 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I %) estimée selon l'équation suivante :

$$I (\%) = ([A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}] / A_{\text{contrôle}}) \times 100$$

Où :

$A_{\text{contrôle}}$  : Absorbance du contrôle DPPH (contenant tous les réactifs sauf l'extrait)

$A_{\text{extrait}}$  : Absorbance de l'extrait à différentes concentrations.

L'IC<sub>50</sub> (la concentration qui correspond à 50% d'inhibition) a été calculée en traçant des pourcentages d'inhibition par rapport aux concentrations de l'échantillon. Le contrôle positif est représenté par un antioxydant standard : butyle hydroxytoluène (BHT). Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

### **II.6.2.3. Test de Blanchiment du $\beta$ -carotène**

Le test est réalisé selon le protocole décrit par Tepe *et al.*, (2005). Une émulsion de  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été préparée par dissolution de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml de chloroforme. Par la suite, 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Après évaporation totale du chloroforme, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés à cette émulsion sous une agitation. 350  $\mu$ l des extraits (EM et HE) solubilisés dans du méthanol (2 mg/ml), sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. La même procédure a été répétée avec le contrôle positif (BHT) et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Toutes les mesures ont été effectuées en triple. L'activité antioxydante (AA%) a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$AA (\%) = (AE / AE_{t0}) \times 100$$

Où :

AE : Absorbance de l'extrait au moment de lecture

AE<sub>t0</sub> : Absorbance de l'extrait au temps 0

### **II.6.2.4. Pouvoir réducteur FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

L'évaluation FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) de couleur jaune en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>) de couleur bleu par un antioxydant (Pellegrini *et al.*, 2003) . En effet le Fe<sup>+3</sup> participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

Le pouvoir réducteur a été déterminé en utilisant la méthode d'Oyaizu (1986). 2.5 ml des différentes concentrations des extraits (EM, HE et acide Ascorbique) ont été mélangés à 2.5 ml de la solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 2.5 ml de ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Les mélanges ont été incubés à 50°C pendant 30 min dans l'obscurité. Par la suite, 2.5 ml de l'acide trichloroacétique (10%) ont été additionnés pour stopper la réaction. Le tout a été maintenu à température ambiante pendant 10 min.

A la fin, 2.5 ml du surnageant de chaque concentration a été mélangé avec 2.5 ml de l'eau distillée et 0.5 ml de FeCl<sub>3</sub>, 6 H<sub>2</sub>O (0.1%). L'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

L'activité chélatrice est calculée selon l'équation :

$$AC (\%) = 1 - (A_{\text{Extrait}}/A_{\text{Contrôle}}) \times 100$$

Où :

$A_{\text{Extrait}}$  : Absorbance extrait

$A_{\text{Contrôle}}$  : Absorbance contrôle

### **II.6.3. Evaluation de l'activité cicatrisante**

Le pouvoir cicatrisant de la plante et de ses extraits (EM et HE) a été réalisée *in vivo* sur un modèle de plaie d'excision sur des lapins albinos New-zélandais.

#### **II.6.3.1. Préparation de l'onguent**

Généralement, les herboristes de la wilaya de M'Sila mélangent la poudre de plante de *Teucrium polium* L. soit avec la vaseline ou la cire d'abeille pour obtenir un onguent à 10 % qu'ils appliquent directement sur la plaie (Boudjelal *et al.*, 2013).

Lors de l'étude de l'activité cicatrisante, l'onguent a été préparé en mélangeant les extraits (EM, HE) ainsi que la poudre de la plante avec de la vaseline (Unilever, France) à une concentration de 10% pour obtenir les onguents suivants : OEM (onguent extrait méthanolique), OHE (onguent huile essentielle) et OPP (onguent poudre de plante). La vaseline a été choisie parce qu'elle dépourvu de vertus thérapeutique. Cicatryl-Bio (Pierre Fabre, France) a été utilisé comme médicament de référence (CIC).

#### **II.6.3.2. Test de l'irritation cutanée**

Le test a été conduit en conformité aux directives de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 404, 2002a). Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel d'irritation cutanée de l'onguent 10% par voie topique.

Les lapins ont été rasés à l'aide d'un rasoir électrique sur le tronc et les zones latérales. Le côté gauche a servi de site d'essai, tandis que les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. Les différents onguents (OEM, OHE et OPP) ont été appliqués topiquement à raison de 0.5 g.

Les animaux traités ont été observés durant la première heure, ensuite 4h et 24 heures puis une fois par jour pendant une période de 14 jours après l'application topique. Aux sites d'application, la peau a été observée pour des signes d'érythème, d'œdème et de blessure locale. L'irritation cutanée a été marquée et enregistrée selon une échelle de valeurs décrite dans l'OCDE 404 (2002) (Tableau 03).

**Tableau 03 : Classement des réactions cutanées (érythème, escarre et œdème)  
(OCDE 404, 2002a).**

<b>Formation d'érythème et d'escarre</b>	
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4
<b>Formation d'œdème</b>	
Pas d'œdème	0
Œdème très léger (à peine perceptible)	1
Œdème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4

### **II.6.3.3. Potentiel cicatrisant de *Teucrium polium* L.**

Le dos de chaque lapin a été rasé avec un rasoir électrique. Les animaux ont été laissés dans leurs cages 24 heures pour vérifier l'absence d'irritation de la zone rasée (Hwisa *et al.*, 2013). Les animaux ont été répartis en 5 groupes de 4 lapins chacun comme suit : le premier groupe non traité (NT), le deuxième groupe a été traité avec Cicatryl-Bio, médicament de référence (CIC), le troisième groupe avec OEM 10%, le quatrième groupe avec OHE 10%, le cinquième avec OPP 10% et le sixième groupe avec de la vaseline (VAS).

#### **II.6.3.4. Induction des plaies d'excision, traitement et suivi de la cicatrisation**

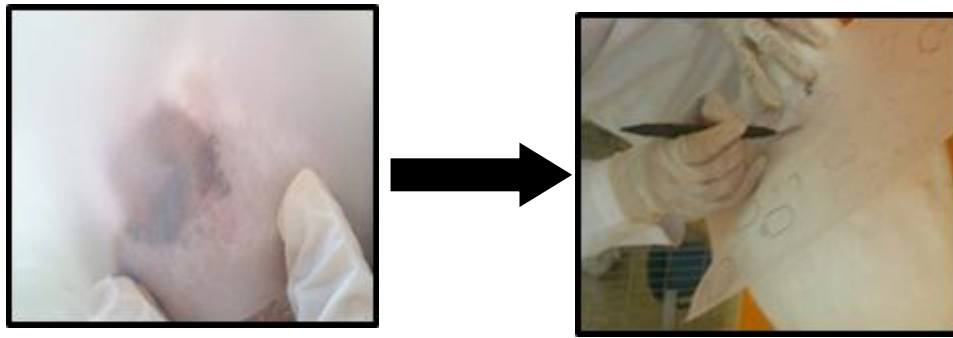
Les lapins ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de kétamine (90 mg/kg)-xylazine (10 mg/kg) (Mashreghi *et al.*, 2013). Un cercle de 2,5 cm de diamètre a été tracé sur la peau de la région lombaire qui a ensuite été excisée (Figure 20).



**Figure 20 : Différentes étapes de l'excision de la peau.**

Les plaies ont été immédiatement traitées après l'excision, les animaux placés dans des cages individuelles. Les préparations (CIC, OEM 10%, OHE 10%, OPP 10% et VAS) ont été appliquées par voie topique à raison de 0,5 g par lapin une fois par jour jusqu'à une cicatrisation complète (Pipelzadeh *et al.*, 2003).

Le poids corporel des lapins a été suivi chaque trois jour durant le traitement. Les dimensions des plaies d'excision ont été mesurées tous les 4 jours pendant la période d'essai, en traçant les plaies sur un papier transparent et en mesurant à travers le papier millimétrique (Figure 21).



**Figure 21 : Traçage d'une plaie**

Le pourcentage de l'évolution de la contraction de la plaie a été calculé à l'aide de la formule suivante (Tamri *et al.*, 2014):

$$\% \text{ Contraction de plaie} = \frac{\text{Taille initiale} - \text{Taille d'une journée spécifique}}{\text{Taille initiale}} \times 100$$

Les plaies ont été photographiées chaque 5 jour pour suivre la chronologie de la cicatrisation.

#### **II.6.3.5. Les coupes histologiques des organes**

Après sacrifice des animaux, les organes des souris (foie, reins et cœur) ainsi que les tranches de tissus (peau cicatrisée avec 0.5 cm de peau saine) des lapins ont été prélevés puis conservés dans du formol à 10% pendant 72 h. les coupes histologique sont préparées au niveau de laboratoire privé d'histopathologie à M'Sila. Les échantillons ont été déshydratés en les faisant passer par trois bains successifs d'éthanol (70-75 ; 90-95 et 100°C) pendant 30 min chacun. Les échantillons sont ensuite éclaircis 2 fois dans un bain à xylène pendant 20 min pour être inclus dans la paraffine à 2 reprises pendant 4 heures. L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques contenant de la paraffine fondue par chauffage à 60°C. Après refroidissement, les blocs de paraffine obtenus ont ensuite été coupés avec un microtome (Leica, Allemand). Les coupes de 5 µm d'épaisseur obtenues sont étalées sur des lames et séchées pendant 1 heure à 37°C pour être réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine (Marck, 2010).

## **II.7. Analyses statistiques**

Les résultats obtenus lors des différents tests sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SD pour les tests *in vitro* et moyenne  $\pm$  SEM pour les tests *in vivo* et les différences ont été considérées significatives à  $p \leq 0.05$ . Les comparaisons des résultats des contrôles et ceux des différents essais ont été fait par le test de Tukey pour les comparaisons multiples en utilisant le logiciel Graph Pad. Prism (version 7.00). Le test ANOVA univariée a été appliqué sur les résultats de l'activité cicatrisante et la signification intergroupe a été analysée à l'aide du test de Dunett.

# *Résultats et discussion*

### **III. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **III.1. Analyses phytochimiques des extraits**

##### **III.1.1. Rendement de l'extraction**

La préparation de l'extrait méthanolique (EM) à partir de la partie aérienne de *T. polium* L. a été effectuée grâce au Soxhlet en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction.

Cette extraction a donné un rendement de 17.5% en matière sèche. Le résultat obtenu est supérieur à celui obtenu par Sharififar *et al.*, (2009) et Gandhare *et al.*, (2013) ou le rendement variait de 14.9% et 8.8% en matière sèche respectivement. Malki et Yahia, (2014) ont obtenu un rendement de 47.76% après extraction éthanolique de la partie aérienne de *T. polium* de la région de Biskra. Ce rendement d'extraction est nettement supérieur au notre.

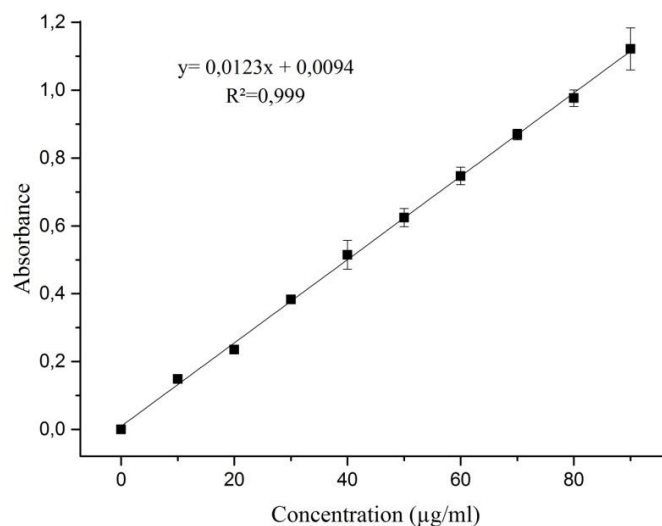
Le rendement d'extraction dépend généralement de la méthode d'extraction (le choix du solvant extracteur) et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (à chaud ou à froid) (Jerković *et al.*, 2012).

L'huile essentielle (HE) a été obtenue grâce à l'hydrodistillation. Le rendement d'extraction calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne était de 0.42% (P/P). Ce résultat paraît plus faible que celui obtenu par Kabouche *et al.*, (2007), pour la même plante de la région de Constantine (Est Algérien) ayant donné un rendement de 1.7% (P/P). D'autre part, Lograda *et al.*, (2014) ainsi que Bendjabeur *et al.*, (2018) ont obtenus des rendements de 0.37% et 0.27% respectivement à partir des plantes récoltées au niveau de la région de Sétif et de Bouira. La même plante, récoltée en Jordanie a donné un rendement d'extraction de 0.8% (P/P) (Aburjai et Hudaib, 2006).

Les variations des rendements des huiles essentielles peuvent être liées à l'origine géographique de la plante (Saeidi *et al.*, 2018).

### III.1.2. Dosage des polyphénols totaux

La détermination de la quantité des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg EAG/g d'extrait sec en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 22).



**Figure 22 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.**

La quantité en phénols totaux de l'EM de *T. polium* L. obtenue était de  $86.63 \pm 0.03$  mg EAG/g ES.

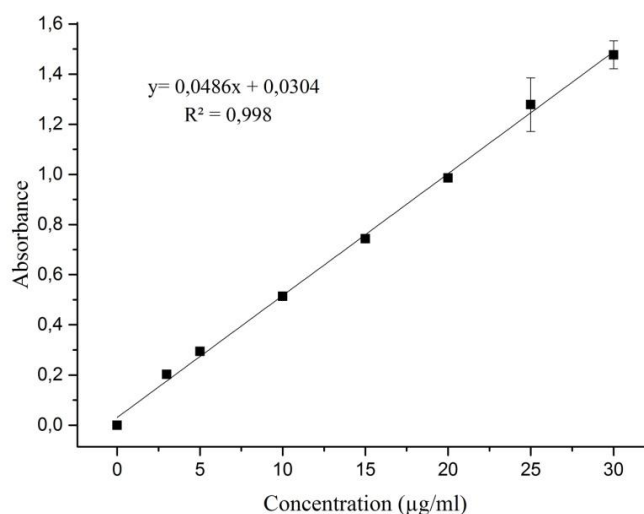
En Algérie, Djeridane *et al.*, (2006) ont rapporté une teneur totale en composés phénoliques dans l'extrait hydro-éthanolique de la même plante de  $4.92 \pm 0.21$  (mg EAG / g de plante sèche). Cette teneur est très faible en comparaison avec nos résultats. Selon Aouadhi *et al.*, (2013), la teneur totale en composés phénoliques dans l'extrait méthanolique de *T. polium* de la Tunisie était de  $34.7 \pm 0.01$  mg d'acide gallique par ml d'extrait. Bakari *et al.*, (2015) ont signalé une valeur de  $48.88 \pm 0.01$  mg de EAG / g d'extrait d'une plante aussi récolté de la Tunisie. El Atki *et al.*, (2019) ont trouvé une quantité de phénols totaux de 109.26 mg de EAG / g ES d'une plante récolté du Maroc.

Les teneurs en composés phénoliques peuvent être influencées par le type de solvant d'extraction. En effet, l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols que l'extrait hydroéthanolique (Djeridane *et al.*, 2006).

Cette différence est aussi due à l'origine de la plante et les conditions climatiques qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Cheynier *et al.*, 2013). La distribution des métabolites secondaires peut varier pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux facteurs génétiques, la qualité du sol et les conditions climatiques (la température, l'exposition solaire, la sécheresse et la salinité) (Falleh *et al.*, 2008).

### III.1.3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été quantifiée par le dosage direct grâce au trichlorure d'aluminium en utilisant la quercétine comme standard (Figure 23). Elle est exprimée en mg EQ/g d'extrait sec.



**Figure 23 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.**

Les résultats de ce dosage ont montré que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante renferme des teneurs intéressantes en flavonoïdes de  $24.43 \pm 0.01$  mg EQ/g ES.

Selon les données de la littérature, nous notons que la teneur en flavonoïdes totaux varie pour la même plante en fonction du solvant d'extraction et de la région de provenance. Dans ce contexte, Djeridane *et al.*, (2006) ont rapporté que la teneur totale en flavonoïdes est de  $4.63 \pm 0.10$  mg équivalent ritine /g plante sèche de *T. polium*. De même ; Aouadhi *et al.*, (2013) ont constaté que la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'une *T. polium* tunisienne est de  $2.67 \pm 0.05$  mg équivalents Ritine / ml d'extrait. Ces teneurs restent faibles en comparaison avec nos résultats. Bakari *et al.*, (2015) ont la même valeur d'une plante aussi de la Tunisie ( $2.75 \pm 0.01$  mg EQ / g d'extrait). D'autre part, El Atki *et al.*, (2019) ont trouvé une valeur de flavonoïde 102.99 mg équivalent ritine / g ES de *Teucrium* issue du Maroc.

### III.1.4. Analyse de l'EM par HPLC-UV-MS

L'utilisation combinée de la chromatographie en phase liquide (HPLC) couplé avec l'UV-vis, et le détecteur à barrettes diode, ainsi que la spectrométrie de masse (MS), et l'ionisation à pulvérisation électronique (ESI) est à ce jour un outil puissant qui permet l'acquisition d'importantes données analytiques, à savoir les spectres UV-vis et les masses pour obtenir des indications fondamentales sur la nature chimique des composants phénoliques de l'extrait de la plante étudiée (Figure 24).

Le chromatogramme obtenu a révélé la présence de plusieurs pics correspondant aux flavonoïdes et aux dérivés d'acide caféique. Plusieurs composés ont été identifiés à partir de leurs données UV et MS, et par comparaison chromatographique avec des échantillons de référence commerciaux (composés 7 et 8). D'autres composés ont été identifiés par analyse RMN  $H^1$  et 2D après isolement. Le tableau 04 regroupe les polyphénols identifiés dans l'EM de la plante.

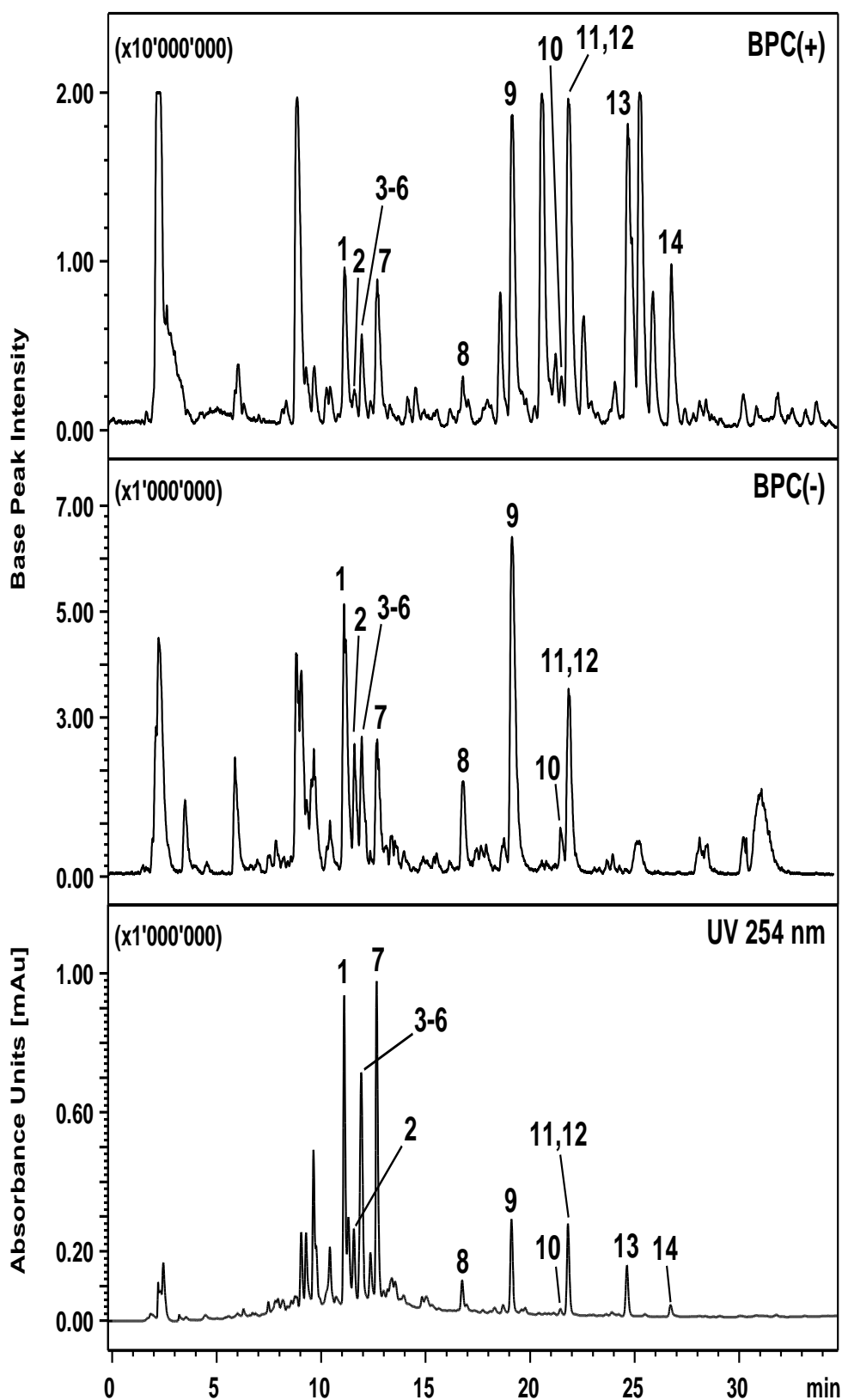


Figure 24: Chromatogrammes HPLC-UV-MS de l'extrait méthanolique de *Teucrium polium* L.

**Tableau 04 : La composition chimique de l'EM de *T. polium* L.**

<b>Pics</b>	<b>Rt (min)</b>	<b>Nom de composé</b>
<b>1</b>	11.1	Poliumoside
<b>2</b>	11.6	Acteoside
<b>3</b>	11.9	Hyperoside
<b>4</b>	11.9	Isoquercitrine
<b>5</b>	11.9	Lutéoline 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside
<b>6</b>	11.9	Lutéoline 7-O- (5-O-syringoyl- $\beta$ -D-apiofuranosyl) - (1 $\rightarrow$ 2) - $\beta$ -D-glucopyranoside
<b>7</b>	12.7	Diosmine
<b>8</b>	16.8	lutéoline
<b>9</b>	19.1	Cirsiliol,
<b>10</b>	21.4	Cirsimaritine
<b>11</b>	21.8	Cirsilineol
<b>12</b>	21.8	Eupatorin
<b>13</b>	24.6	5-desmethylinensetin
<b>14</b>	26	Salvigenin

Tous les composés identifiés ont été précédemment signalés dans plusieurs travaux scientifiques, c'est le cas du poliumoside (De Marino *et al.*, 2012; Oganesyanyan *et al.*, 1991), acteoside (Elmasri *et al.*, 2015), hyperoside (Rudakova *et al.*, 2014), isoquercitrin (Shammas et Verykokidou-Vitsaropoulou, 1987), luteolin 7-O-glucoside (D'Abrosca *et al.*, 2013; De Marino *et al.*, 2012), luteolin 7-O- $\beta$ -D-(5-O-syringyl) apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside (D'Abrosca *et al.*, 2013), diosmin (Al Bahtiti, 2012), luteolin (D'Abrosca *et al.*, 2013; Elmasri *et al.*, 2015), cirsiol (Elmasri *et al.*, 2015; Stefkov *et al.*, 2011; Verykokidou-Vitsaropoulou et Vajias, 1986), cirsimaritin (Elmasri *et al.*, 2015; Stefkov *et al.*, 2011; Verykokidou-Vitsaropoulou et Vajias, 1986), cirsilin (Stefkov *et al.*, 2011), eupatorin (Verykokidou-Vitsaropoulou et Vajias, 1986), 5-desmethylinensetin (Alwahsh *et al.*, 2015; Harborne *et al.*, 1986; Kisiel *et al.*, 2001; Topcu *et al.*, 1996) et salvigenin (Elmasri *et al.*, 2014). Exception faite pour le composé correspondant au pic 13. Ce dernier composé a été précédemment décrit dans d'autres espèces du genre *Teucrium*. À notre connaissance, cette étude représente le premier rapport d'un profil polyphénolique détaillé de *T. polium* L.

La Figure 25 regroupe la structure des composés phénoliques identifiés dans l'EM de *T. polium* L.

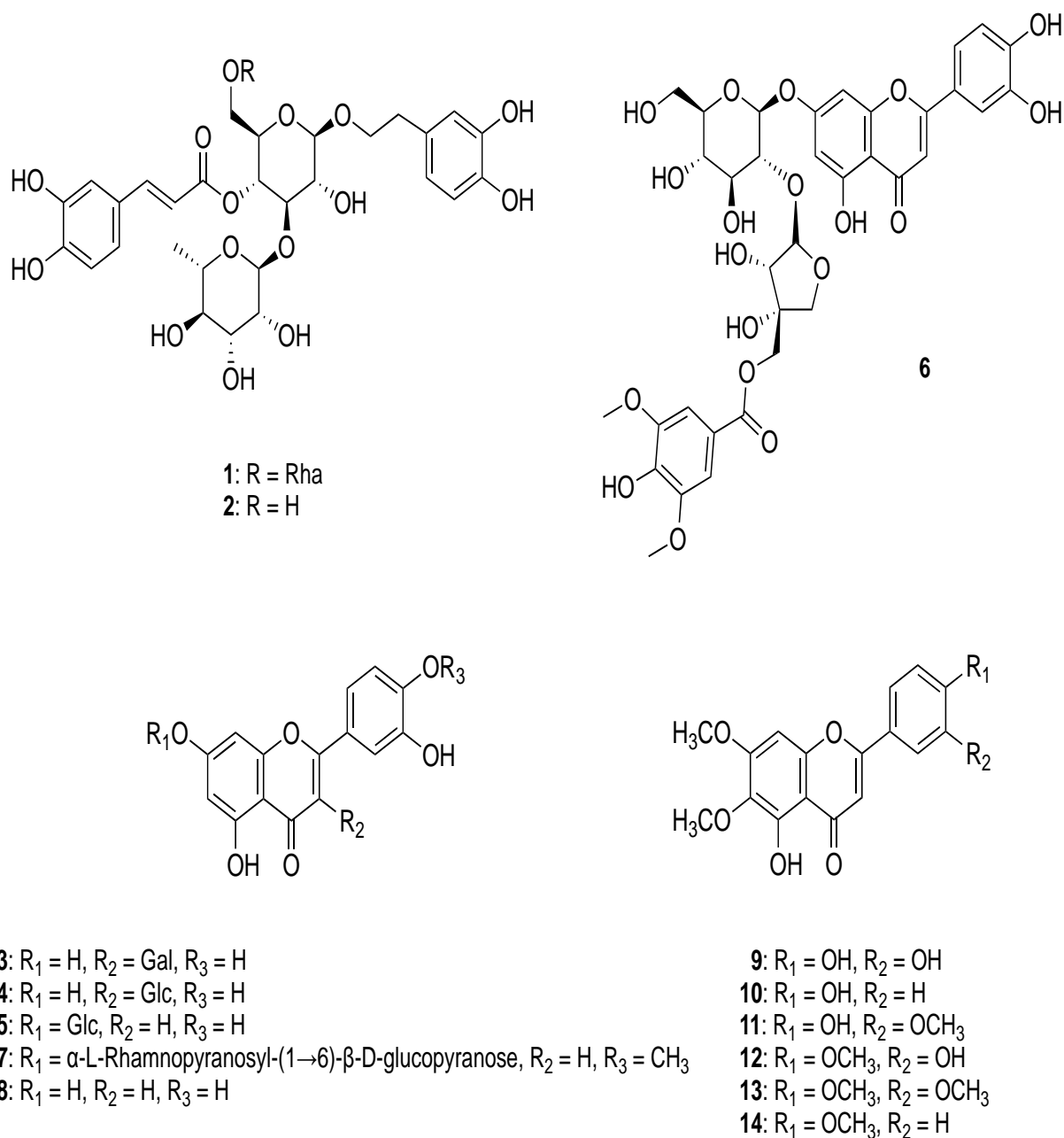


Figure 25: Structure des composés phénoliques identifiés dans l'EM de *Teucrium polium* L.

### **III.1.5. Analyse de l'HE par GC-FID-MS**

La composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. a été déterminée par une combinaison d'analyses GC-FID et GC-MS. Le Tableau 05 regroupe les 83 composants identifiés dans l'HE. Ces molécules ont été subdivisées en quatre classes : les monoterpènes hydrocarbonés (MH), les monoterpènes oxygénés (MO), les sesquiterpènes (S) et autres (A), correspondant à la classe des composants non terpénoïdes.

Les principaux composants identifiés dans l'HE sont dans cet ordre :  $\beta$ -pinène (33%), germacrène D (17%),  $\alpha$ -pinène (10%), myrcène (8%), limonène (7%), bicyclogermacrène (3%), *trans*- $\beta$ -guaiène (1,7%), spathunelol (1,6%) et  $\beta$ -bourbonène (1,3%). Tous les autres composés comprenant également tous les monoterpènes oxygénés et les autres classes sont inférieurs à 1%.

Tableau 05: Composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L.

#	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Classe / Composés	%	SD
<b>Monoterpènes Hydrocarbonés (12)</b>				<b>59.692</b>	<b>0.003</b>
3	930	931	$\alpha$ -Thujene	0.067	0.000
4	939	941	$\alpha$ -Pinene	9.744	0.004
5	954	954	Camphene	0.250	0.000
6	960	959	Thuja-2.4(10)-diene	0.085	0.000
7	979	987	$\beta$ -Pinene	32.794	0.016
8	990	996	Myrcene	7.844	0.005
9	1017	1020	$\alpha$ -Terpinene	0.039	0.000
10	1026	1028	<i>o</i> -Cimene	0.071	0.000
11	1029	1036	Limonene	7.260	0.005
12	1037	1041	$\beta$ -Z-Ocimene	0.217	0.000
14	1050	1052	$\beta$ -Z-Ocimene	1.081	0.001
18	1088	1091	Terpinolene	0.239	0.005
<b>Monoterpènes Oxygenés (30)</b>				<b>6.091</b>	<b>0.007</b>
16	1072	1078	<i>cis</i> -Linalool oxide	0.021	0.001
17	1082	1088	Camphenilone	0.027	0.001
19	1096	1101	Linalool	0.237	0.005
20	1105	1105	$\alpha$ -Fenchocamphorone	0.107	0.006
22	1116	1113	endo-Fenchol	0.064	0.001
23	1126	1127	$\alpha$ -Campholenal	0.046	0.000
24	1140	1142	Nopinone	0.263	0.001
25	1139	1145	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.821	0.006
26	1142	1148	<i>trans</i> -Sabinol	0.057	0.006
27	1143	1151	<i>cis</i> -Sabinol	0.294	0.000
28	1158	1162	Nerol oxide	0.030	0.000
29	1164	1167	Pinocarvone	0.609	0.001
30	1169	1172	Borneol	0.185	0.000
31	1177	1182	Terpinen-4-ol	0.079	0.020
32	1188	1189	$\alpha$ -Terpineol	0.027	0.000
33	1195	1199	Myrtenal	0.848	0.013
34	1195	1201	Myrtenol	0.647	0.016
36	1205	1214	Verbenone	0.073	0.000
37	1216	1224	<i>trans</i> -Carveol	0.118	0.001
38	1229	1233	Nerol	0.207	0.000
39	1241	1245	Cumin aldehyde	0.070	0.001
40	1243	1248	Carvone	0.132	0.000
41	1267	1275	Geranial	0.024	0.001
42	1271	1279	Perilla aldehyde	0.102	0.001
43	1285	1289	Bornyl acetate	0.265	0.000
44	1290	1296	Thymol	0.427	0.068
45	1298	1303	<i>trans</i> -Pinocarvyl acetate	0.093	0.000
47	1326	1330	Myrtenyl acetate	0.031	0.000
51	1361	1368	Neryl acetate	0.082	0.000
52	1381	1383	Geranyl acetate	0.105	0.047
<b>Sesquiterpènes (28)</b>				<b>30.072</b>	<b>0.170</b>
49	1338	1343	$\delta$ -Elemene	0.098	0.001
53	1388	1392	$\beta$ -Bourbonene	1.305	0.004
54	1390	1397	$\beta$ -Elemene	0.105	0.004
56	1420	1426	$\beta$ -Ylangene	0.271	0.000
57	1430	1442	$\beta$ -Copaene	0.029	0.000
58	1436	1452	Neryl acetone	0.116	0.000
59	1454	1457	$\alpha$ -Humulene	0.081	0.001
60	1466	1469	<i>allo</i> -Aromadendrane	0.460	0.000

61	1479	1475	$\gamma$ -Muurolene	0.062	0.000
62	1481	1496	Germacrene D	16.585	0.016
63	1489	1498	$\beta$ -Selinene	0.454	0.081
64	1500	1507	Bicyclogermacrene	3.172	2.205
65	1502	1513	<i>trans</i> - $\beta$ -Guaiene	1.700	2.157
66	1502	1517	$\gamma$ -Patchoulene	0.264	0.063
67	1513	1521	$\gamma$ -Cadinene	0.285	0.014
68	1523	1528	$\delta$ -Cadinene	0.528	0.177
69	1538	1540	$\alpha$ -Cadinene	0.070	0.000
70	1561	1566	Germacrene B	0.159	0.008
71	1575	1568	Germacrene D-4-ol	0.150	0.005
72	1578	1588	Spathulenol	1.592	0.006
74	1592	1609	Viridiflorol	0.058	0.004
76	1640	1631	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0.109	0.005
77	1642	1651	<i>epi</i> - $\alpha$ -Muurolol	0.432	0.001
78	1654	1665	$\alpha$ -Cadinol	0.634	0.001
79	1676	1684	Cadalene	0.045	0.004
80	1688	1697	Eudesma-4(15)7-dien-1 $\beta$ -ol	0.244	0.001
81	1700	1704	Eudesm-7(11)7-en-4-ol	0.643	0.001
82		1849	Perhydro farnesyl acetone <sup>d</sup>	0.420	0.001
<b>Autres (13)</b>				<b>0.653</b>	<b>0.001</b>
1	855	855	2 <i>E</i> -Hexenal	0.078	0.000
2	902	923	Heptanal	0.043	0.004
13	1042	1048	Benzene acetaldehyde	0.022	0.000
15	1055	1063	Pentyl iso butanoate	0.061	0.003
21	1112	1110	1-Octen-3-yl acetate	0.027	0.000
35	1201	1207	Decanal	0.025	0.000
46	1317	1319	3 <i>E</i> -Hexenyl tiglate	0.047	0.000
48	1332	1333	Hexyl tiglate	0.022	0.000
50	1359	1363	Eugenol	0.084	0.000
55	1400	1410	Tetradecane	0.040	0.000
73	1600	1604	Hexadecane	0.060	0.002
75	1612	1620	Tetradecanal	0.127	0.004
83	1900	1866	Nonadecane	0.018	0.000

<sup>a</sup> La numérotation se réfère à l'ordre d'élution, et les valeurs (aire de pic relative%  $\pm$  SD) représentent les moyennes de 3 répétitions (t = trace, <0,05%); <sup>b</sup> Indice de conservation de la documentation (RI); <sup>c</sup> Indice de rétention (RI) par rapport au mélange standard de n-alcanes sur colonne SPB-5; <sup>d</sup> Identifié provisoirement par les données MS uniquement.

Ce profil est plus ou moins similaire à ceux précédemment rapportés dans la littérature (Bendjabeur *et al.*, 2018 ; Bendif *et al.*, 2018 ; Kerbouche *et al.*, 2015 ; Mahmoudi *et al.*, 2013 ; Kabouche *et al.*, 2007), mais très différent des autres études rapportant la prépondérance des sesquiterpènes dans la caractérisation chimique des huiles essentielles issus d'autres régions (Jordanie, France, Algérie, Serbie, les Balkans et l'Iran) (Ebadollahi *et al.*, 2020). Sur la base d'une étude de la littérature, de nombreux autres composés ont également été identifiés dans l'huile essentielle de *T.polium*, notamment le  $\delta$ -cadinène et l' $\alpha$ -cadinol (Al-Sarar *et al.*, 2020), l'undécane, le dodécane, le tridécane, le lycopersène (Ebadollahi *et al.*, 2020), l' $\alpha$ -pinène, le verbénol, l' $\alpha$ -terpinéol (Nikpour *et al.*, 2018), spathuléol et épizonarène (Sadrizadeh *et al.*, 2018), germacrène D, ocimène,  $\beta$ -pinène (Fertout-Mouri *et al.*, 2018), limonène et camphre (Maizi *et al.*, 2019).

La différence dans la qualité ou la quantité de la composition des huiles volatiles peut être due à des différences génétiques, aux conditions de séchage, au mode de distillation et/ou d'extraction et à des facteurs géographiques ou climatiques (Mahmoudi et Nosratpour, 2013 ; Nikpour *et al.*, 2018).

### **III.2. Evaluation toxicologique et biologiques (*in vivo* et *in vitro*) des extraits de *T. polium* L.**

#### **III.2.1. Etude toxicologique**

##### **III.2.1.1. Test de toxicité orale aiguë**

La toxicité aiguë systémique se définit par des effets toxiques qui apparaissent à la suite d'une exposition à dose unique de l'extrait de la plante. L'OCDE recommande d'administrer plusieurs doses qui permettent d'obtenir un pourcentage de mortalité des animaux allant de 0 à 100% (OCDE 423, 2002b). Les doses doivent être comprise entre 5 et 5000 mg/kg pc pour permettre de situer les substances testées sur une échelle comparative de toxicité des substances chimiques de Hodge et Sterner en 1949 (Frank *et al.*, 1992).

Lors de cette étude, 3 groupes de 3 souris femelles chacun, ont reçu par gavage une dose unique de l'extrait méthanolique de 1000, 2000 et 5000 mg/kg pc respectivement. L'observation des effets toxiques a duré 14 jours.

##### **III.2.1.1.1. Observations des animaux**

Aucune mortalité n'a été enregistrée chez les souris des lots traités durant les 14 jours de l'expérimentation. Aucun signe spécifique, symptôme respiratoire, nerveux, cutané ou gastro-intestinal n'a été mentionné avec les doses testées y compris la dose la plus élevée 5000 mg/Kg pc.

En se référant à l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1949) pour les souris et les rats, l'extrait de *T. polium* L. est classé comme substance «non toxique» ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg pc) (Lu, 1992), car aucune souris du lot recevant l'extrait à une dose de 5000 mg/kg pc n'est morte. Ceci confirme l'innocuité de la forme traditionnelle d'utilisation de la plante.

### III.2.1.1.2. Evolution pondérale

La variation du poids corporel des souris a été notée tous les 5 jours afin de suivre l'évolution pondérale des animaux traités et témoins, et de vérifier l'effet de l'extrait sur la consommation en eau et nourriture (Annexe 3). Au J<sub>0</sub>, les différents lots de souris femelles ont des moyennes de poids relativement homogènes. Durant les 14 jours de l'expérimentation, l'évolution du poids semble être normale, témoignant l'insensibilité de l'animal à l'extrait. Le traitement des souris par l'extrait n'a provoqué aucune variation significative du poids corporel par rapport aux témoins durant toute la période d'essai (Tableau 06).

**Tableau 06: Evaluation pondérale des souris traités et témoin.**

Jours	Traitements mg/kg pc			
	Témoin	1000	2000	5000
0	33.0 ± 0.00	33.0 ± 0.00	33.0 ± 0.00	38.0 ± 0.00
5	32.0 ± 0.00	33.55 ± 1.27	32.67 ± 2.02	38.10 ± 1.30
10	32.67 ± 0.58	34.18 ± 0.22	32.93 ± 1.81	39.37 ± 1.55
15	31.67 ± 0.76	33.0 ± 0.28	33.17 ± 1.81	39.0 ± 1.00

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3)

### III.2.1.1.3. Masse relative des organes

L'examen macroscopique des différents organes prélevés (foie, reins et cœur) après le sacrifice, a montré que ces derniers avaient des tailles et des formes normales.

Les résultats obtenus concernant la masse relative des organes sont indiqués dans le Tableau 07. Les valeurs de la masse relative du foie et des reins ont montré une augmentation significative à la dose 5000 mg/kg pc par rapport aux organes du lot témoin. Le poids relatif du cœur ne présente aucune différence significative chez les groupes traités comparés au groupe témoin. Une hypertrophie d'un organe peut signifier le début d'un dysfonctionnement mais c'est généralement un signe vulnérable de la toxicité (Raza *et al.*, 2002).

**Tableau 07: Variation des valeurs de la masse relative des organes des souris.**

Organes	Doses (mg/kg pc)			
	Témoin	1000	2000	5000
<b>Foie</b>	1.63 ± 0.05	1.71 ± 0.22	1.80 ± 0.09	2.03 ± 0.23*
<b>Reins</b>	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.03	0.45 ± 0.06 *
<b>Cœur</b>	0.27 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.01

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3), \* p ≤ 0.05 lorsque le poids des organes des lots traités est comparé au poids des organes du lot témoin.

#### III.2.1.1.4. Paramètres biochimiques sériques après sacrifice

Afin de s'assurer l'absence de toxicité de l'extrait méthanolique sur les différents organes, les paramètres biochimiques ont été dosés chez les souris des différents lots traités et témoin après sacrifice. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 08.

**Tableau 08 : Variation des paramètres biochimiques après sacrifice des souris.**

Paramètres	Doses (mg/kg pc)			
	Témoin	1000	2000	5000
<b>ALT (UI/L)</b>	11.00 ± 0.61	16.00 ± 1.00	15.66 ± 2.55	14.67 ± 1.02
<b>AST (UI/L)</b>	54.67 ± 3.57	42.83 ± 3.51	53.20 ± 2.94	49.00 ± 11.29
<b>PAL (UI/L)</b>	40.66 ± 3.97	39.16 ± 3.83	43.16 ± 8.77	40.00 ± 2.31
<b>Prot Tot (g/dL)</b>	60.00 ± 1.61	70.50 ± 3.43	72.00 ± 1.53	70.60 ± 2.50
<b>AU (mg/dL)</b>	41.90 ± 4.49	42.32 ± 3.83	51.89 ± 7.63	25.98 ± 0.74
<b>Urée (mg/L)</b>	0.88 ± 0.02	0.91 ± 0.01	0.92 ± 0.00	0.93 ± 0.01
<b>Créa (mg/L)</b>	4.09 ± 0.15	5.43 ± 0.36	4.29 ± 0.47	4.05 ± 0.15

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=3)

#### III.1.1.4.1. Marqueurs de la fonction hépatique

Le foie est la première cible de toutes substances susceptibles d'avoir une toxicité. Il métabolise les substances étrangères à des composés qui peuvent être hépatotoxique (Rhiouani *et al.*, 2008). Certaines enzymes hépatiques sont des indicateurs de la fonction hépatique à savoir, l'alanine aminotransférase (ALT), l'aspartate aminotransférase (AST) et la phosphatase alcaline (PAL).

L'analyse des transaminases et la phosphatase alcaline des souris (tableau 08) montre que l'extrait n'affecte pas ces paramètres hépatiques. Cet extrait n'a probablement aucun effet hépatotoxique sur les souris.

De même, l'administration de l'extrait n'entraîne aucune variation significative des teneurs sérique en protéines totales chez les souris par rapport au lot témoin sain.

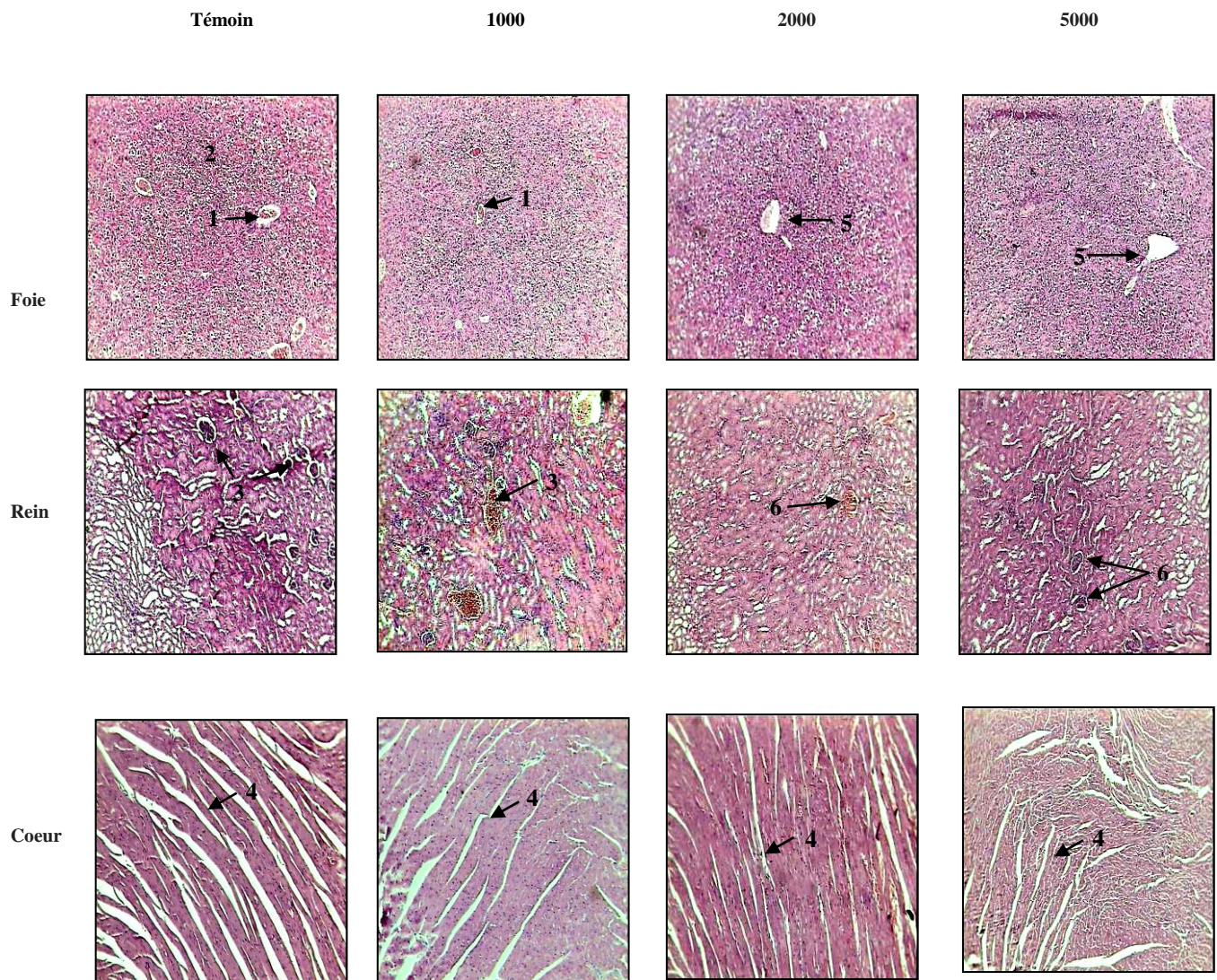
#### **III.1.1.4.2. Marqueurs de la fonction rénale**

Au cours du processus de filtration, les reins peuvent être exposés à des concentrations élevées de substances toxiques d'origine endogène ou exogène (Dasari *et al.*, 2017). L'évaluation de la fonction rénale repose essentiellement sur le dosage de l'urée et de la créatinine, qui sont considérés comme d'excellents marqueurs de la fonction rénale (Sirwal *et al.*, 2004).

Selon les résultats obtenus, l'extrait de la plante à différentes doses, n'a induit aucun changement significatif de la concentration plasmique de l'urée, acide urique et de la créatinine chez les souris traitées comparativement au groupe témoin. Selon les résultats obtenus, l'extrait ne possède aucune néphrotoxicité.

#### **III.2.1.1.5. Examen histopathologique**

L'étude histopathologique constitue une étape très importante dans l'étude de la toxicité. Le foie, le rein et le cœur, constituent les organes cibles lors d'une telle étude. Les coupes histologiques des organes des souris traitées ont été comparées à celles des souris témoins sains. Les résultats de l'examen histopathologique sont indiqués dans la Figure 26.



1 : Veine centrale ; 2 : Sinusoïde hépatique ; 3 : Glomérule ; 4 : Fibre myocardique ; 5 : Dilatation de la veine porte ; 6 : Tubulaire

**Figure 26: Coupes histologiques des différents organes (foie, rein et cœur) des souris traitées à différentes doses (GX10).**

L'observation des coupes histologiques du foie, reins et cœur des souris traitées par rapport aux témoins a permis de constater la conservation de l'architecture cellulaire (lobulaire et tubulaire) de ces organes. Le traitement des souris par différentes doses de l'extrait méthanolique de *T. polium* L. n'a induit aucun signe de toxicité et les observations ont révélé un rein normal et un lobule hépatique typiques pour toutes les souris traitées. Une légère dilatation de la veine porte a été observée aux doses de 2000 et 5000 mg/kg pc. Si les raisons de cette particularité histologique ne sont pas claires, cela ne doit pas être considéré

comme un signe de toxicité en l'absence de toute autre anomalie surtout au niveau des paramètres biochimiques. Des observations similaires ont été rapportées dans l'étude de Meguellati *et al.*, (2019). Il est important de mentionner que des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques de *T. polium* L. ont été mis en évidence dans de nombreuses études expérimentales où la vacuolisation, la destruction et la dégénérescence du foie et des reins étaient les événements les plus fréquemment décrits (Aktürk Esen *et al.*, 2019; Rafieian-Kopaei et Baradaran, 2013). L'absence de toxicité observée dans notre étude peut s'expliquer par la durée d'administration relativement courte. En effet, les effets toxiques de *T. polium* L. ont été liés à la dose et à la durée d'utilisation (Bachtarzi *et al.*, 2016; Dağ *et al.*, 2014). D'après nos données, un traitement à court terme avec un extrait de *T. polium* L. semble être non toxique.

### **III.2.2. Etude *in vitro* de l'activité antioxydante**

Le pouvoir antioxydant peut être évalué *in vivo* ou *in vitro* en appliquant des méthodes qui mesurent la capacité antioxydante d'une molécule ou d'un extrait naturel. Les résultats d'une seule méthode ne donnent que des suggestions réduites sur les propriétés antioxydantes des extraits. La combinaison de plusieurs techniques complémentaires, associant des mécanismes différents est nécessaire pour une évaluation efficace et complète du potentiel antioxydant chez la plante. Quatre tests ont été choisis pour mesurer le pouvoir antioxydant des extraits (EM et HE) de la plante.

#### **III.2.2.1. Capacité Antioxydante Totale (TAC)**

L'activité antiradicalaire des extraits EM et HE est exprimée en IC<sub>50</sub>. Les résultats sont présentés dans le Tableau 09.

**Tableau 09 : Résultat du test TAC des extraits de *T. polium* L.**

<b>Extraits/Standard</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg EAA/mg ES)</b>
<b>EM</b>	253.19 ± 2.10***
<b>HE</b>	508.91 ± 7.56*
<b>A.A</b>	417.99 ± 1.32

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). \*p ≤ 0.05 ;  
\*\*\*p ≤ 0.001 lorsque les IC<sub>50</sub> des extraits sont comparés avec le standard.

L'EM est doté d'un puissant pouvoir antioxydant, deux fois plus important que l'acide ascorbique, antioxydant de référence ( $IC_{50}$  EM :  $253.19 \pm 2.10$   $\mu$ g EAA/mg ES et  $IC_{50}$  A.A :  $417.99 \pm 1.32$   $\mu$ g EAA/mg ES).

L'HE a présenté une capacité antioxydante totale inférieure à celle de l'A.A avec une  $IC_{50}$  supérieur de  $508.91 \pm 7.56$   $\mu$ g EAA/mg ES.

La capacité antioxydante totale de l'extrait aqueux de *T. polium* récolté au Maroc est supérieur à celle trouvée lors de notre étude avec une  $IC_{50}$  153,89 mg E Vit C / g de poids sec (El Atki *et al.*, 2019).

### III.2.2.2. Effet piègeur de radical DPPH'

Le test DPPH est l'un des tests les plus utilisés à cause de sa simplicité et sa reproductibilité (El Atki *et al.*, 2019). Une faible valeur d' $IC_{50}$  indique une forte activité antioxydante (Baali *et al.*, 2019). Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 10.

**Tableau 10: Résultat de test DPPH des extraits de *T. polium* L.**

Extraits/Standard	$IC_{50}$ ( $\mu$ g/ml)
EM	$23.52 \pm 0.06^{**}$
HE	$5530 \pm 0.1^{***}$
BHT	$14.6 \pm 0.71$

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3), \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  lorsque les  $IC_{50}$  des extraits sont comparés avec le standard.

L'HE a présenté une capacité très faible par rapport au BHT ( $5530 \pm 0.1$   $\mu$ g/ml, et  $14.6 \pm 0.71$   $\mu$ g/ml respectivement).

L' $IC_{50}$  de l'extrait méthanolique est très significativement ( $p \leq 0.01$ ) supérieur à celle de BHT ( $23.52 \pm 0.06$   $\mu$ g/ml et  $14.6 \pm 0.71$   $\mu$ g/ml respectivement). Cela indique la faible activité antioxydante de l'EM à piéger le radical libre DPPH.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs études ayant prouvées l'importante activité antiradicalaire de la plante avec des  $IC_{50}$  qui varient de 20.0 à 23.6  $\mu$ g/ml (Sharififar *et al.*, 2009, Aouadhi *et al.*, 2013, Dridi *et al.*, 2016).

Concernant l'HE, les travaux de Maizi *et al.*, (2019) ont montré une IC<sub>50</sub> égale à 16000 ± 0.15 µg/ml de huile essentielle issu de la région de Mascara, ce qui est supérieur par rapport à nos résultats.

### III.2.2.3. Test de blanchissement du β-carotène

La cinétique de blanchissement du β-carotène en absence et en présence de l'EM, de l'HE et du BHT a été suivie régulièrement pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative (AA) des extraits a été déterminée. Le Tableau 11 regroupe les résultats obtenus.

**Tableau 11: Résultat de test de blanchissement du β-carotène des extraits de *T. polium* L.**

Extraits/Standard	IC <sub>50</sub> %
EM	81.95 ± 2.42
HE	53.52 ± 1.48*
BHT	89.10 ± 0.55

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3). \*p ≤ 0.05 lorsque les extraits sont comparés avec le standard

L'HE possède un faible potentiel antioxydant avec un pourcentage d'inhibition du β-carotène de 53.52 ± 1.48 % ce qui est significativement (p ≤ 0.05) inférieur au pourcentage d'inhibition du standard BHT (89.10 ± 0.55 %) à la concentration de 2 mg/ml.

Nos résultats montrent que l'EM inhibe de manière similaire l'oxydation couplé de l'acide linoléique et β-carotène avec une IC<sub>50</sub> 81.95 ± 2.42 % par rapport au BHT.

Peu de travaux se sont intéressés à l'inhibition du β-carotène avec la germandrée. Selon Özer *et al.*, (2017), l'infusion de *Teucrium polium* a donné un pourcentage de 71,5 %. D'autre part, Panovska *et al.*, (2005) ont trouvé un pourcentage d'inhibition du β-carotène de 43% de l'extrait butanolique de *Teucrium polium* récolté de Macedonia.

L'huile essentielle d'une plante issue d'Iran inhibe l'oxydation de β-carotène de manière proche à notre plante, elle présente un pourcentage de 61% (Mahmoudi et Nosratpour, 2013).

### III.2.2.4. Pouvoir réducteur (FRAP)

La capacité à réduire le fer est variable entre les deux extraits de la plante. Le Tableau 12 regroupe les résultats obtenus.

**Tableau 12: Résultat de test de pouvoir réducteur des extraits de *T.polium* L.**

Extraits/Standard	IC <sub>50</sub> µg/ml
EM	64.5 ± 0.69***
HE	20.99 ± 1.82
A.A	13.58 ± 0.22

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=3).\*\*\* p ≤ 0.001 lorsque les IC<sub>50</sub> des extraits sont comparés avec le standard.

En effet, elle est significativement faible (p ≤ 0.001) avec l'EM en comparaison avec l'acide ascorbique (64.5 ± 0.69 µg/ml et 13.58 ± 0.22 µg/ml respectivement).

Au contraire, l'HE présente une concentration de réduction non comparable avec celle du standard, acide ascorbique (20.99 ± 1.82 µg/ml et 13.58 ± 0.22 µg/ml respectivement).

Les résultats obtenus, sont différents et ne concordent pas avec ceux obtenus par Dridi *et al.*, (2016) et Malki *et al.*, (2015) ayant trouvé des concentrations de 31.43 ± 3.45 mg/ml et 31.58 ± 7.37 mg/ml respectivement. El Atki *et al.*, (2019) ont trouvé un résultat nettement supérieur au notre (280 ± 0.14 µg/ml).

En général, L'activité anti-radicalaire des extraits est dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes (Bahramikia, 2012, Naczk et Shahidi, 2004). l'effet antioxydant n'est pas seulement dose-dépendant mais également structure-dépendant (Rodriguez-Bernaldo *et al.*, 2015).

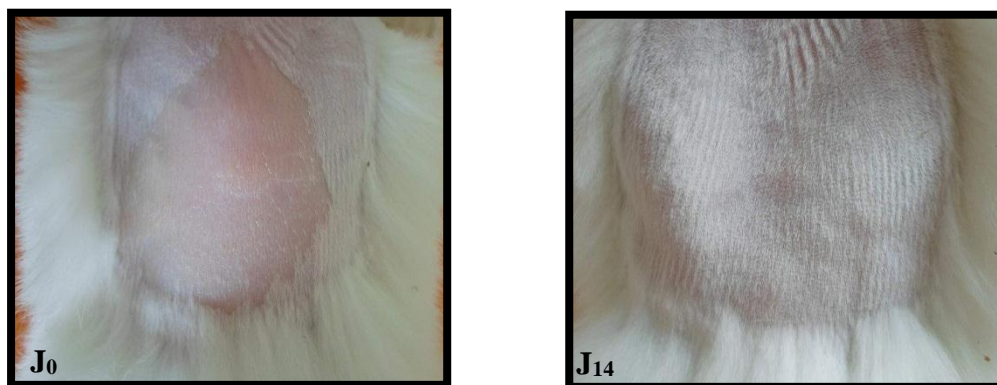
Des recherches antérieures ont révélé que l'activité antioxydante des huiles essentielles peut être attribuée aux interactions synergiques des composés insaturés tels que le limonène et l'α-pinène (Zengin et Baysal, 2014). La faible concentration de ces composants dans l'huile de *Teucrium polium* L. peut expliquer le faible pouvoir antioxydant de notre huile (Warsito *et al.*, 2018).

### **III.2.3. Evaluation de l'activité cicatrisante**

#### **III.2.3.1. Irritation cutanée aiguë**

La toxicité cutanée aiguë correspond aux effets néfastes survenant après l'application d'une substance à une dose unique dans une courte période (OCDE 404, 2002a). L'évaluation de la toxicité cutanée est très importante et concerne tout produit destiné à être appliqué sur la peau (Vinardell et Mitjans, 2008).

Durant toute la période de l'expérimentation (14 jours), aucun signe de toxicité ou de mortalité n'a été observé sur les lapins traités par les différents onguents, à savoir OEM 10%, OHE 10% et OPP 10%. Aucun changement dans le comportement des animaux, perte de poils, irritation cutanée, érythème, escarre, œdème ou toute autre réaction sur la peau n'a pas été enregistrée (Figure 27).



**Figure 27: Test d'irritation cutanée chez le lapin.**

#### **III.2.3.2. Evolution du poids corporel**

Les animaux ont été pesés le jour de l'excision cutanée (J<sub>0</sub>), la mesure du poids est suivie régulièrement chaque trois jours tout au long de l'expérimentation. Les résultats de la variation du poids sont groupés dans le Tableau 13.

**Tableau 13 : Effet des différents onguents sur le poids corporel des lapins.**

Groupes	Poids corporel (kg)					
	Nombre de jours					
	0	3	6	9	12	15
NT	2.04 ± 0.09	1.93 ± 0.09	2.10 ± 0.17	2.11 ± 0.11	2.12 ± 0.10	2.16 ± 0.10
CIC	1.95 ± 0.10	1.86 ± 0.12	1.90 ± 0.14	1.93 ± 0.16	2.11 ± 0.12	2.12 ± 0.20
OPP 10%	2.09 ± 0.10	2.11 ± 0.11	2.24 ± 0.12	2.28 ± 0.11	2.31 ± 0.12	2.32 ± 0.13
OEM 10%	2.09 ± 0.15	2.05 ± 0.25	2.15 ± 0.21	2.35 ± 0.19	2.47 ± 0.22	2.55 ± 0.19
OHE 10%	2.02 ± 0.25	1.92 ± 0.27	2.05 ± 0.23	2.2 ± 0.29	2.47 ± 0.32	2.92 ± 0.15
VAS	2.10 ± 0.08	1.98 ± 0.23	2.12 ± 0.06	2.14 ± 0.06	2.17 ± 0.05	2.18 ± 0.07

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (n = 4).

Après l'excision de la peau (J<sub>3</sub>), un déficit pondéral non significatif a été enregistré chez la plupart des animaux. La diminution du poids corporel est indépendante de la nature du traitement, elle est probablement liée à l'effet direct du traumatisme lésionnaire ainsi qu'aux facteurs physiopathologique du processus de cicatrisation telle que la synthèse du collagène (Djerrou, 2011). Un gain de poids corporel normal a été observé dans les groupes y compris le groupe non traité, suggérant une insensibilité de l'animal à l'onguent appliqué.

### III.2.3.3. Evolution du processus cicatriciel des plaies

Au cours de la période de cicatrisation, et selon un intervalle du temps précis, les plaies ont été régulièrement mesurées et photographiés. L'évolution de la surface de chaque plaie d'excision est réalisée sur les animaux traités et non traités. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 14.

**Tableau 14: Effet de différents traitements sur l'évolution du processus cicatriciel des plaies d'excision chez les lapins.**

Groupes	Contraction des plaies (cm)				
	Nombre de jours				
	0	4	8	12	16
NT	3.05 ± 0.12	2.67 ± 0.07	2.32 ± 0.21	2.27 ± 0.50	1.75 ± 0.48
CIC	3.12 ± 0.14	2.50 ± 0.23	2.20 ± 0.28	1.30 ± 0.24**	0.46 ± 0.02***
OPP 10%	3.07 ± 0.25	2.37 ± 0.13	2.27 ± 0.26	1.15 ± 0.22**	0.60 ± 0.29***
OEM 10%	2.75 ± 0.11	2.32 ± 0.08	1.70 ± 0.16**	0.50 ± 0.14***	0.22 ± 0.09***
OHE 10%	3.37 ± 0.25	3.18 ± 0.23	2.56 ± 0.12	1.25 ± 0.28**	0.35 ± 0.17***
VAS	3.35 ± 0.08	2.75 ± 0.12	2.45 ± 0.21	2.25 ± 0.15	1.10 ± 0.14***

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n=4), \*p ≤ 0.05), \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001 lorsque les groupes traités sont comparés au groupe NT.

Aucune différence significative de la surface des plaies en cm n'est observée durant les quatre premiers jours qui suivent l'excision de la peau. A partir du 8<sup>ème</sup> jour, une contraction de la surface des plaies est observée. Elle s'accélère jusqu'au 16<sup>ème</sup> jour. La surface de contraction des plaies est significativement ( $p \leq 0.05$ ) potentialisée dans les groupes traités par Cicatryl, médicament de référence, ainsi que les différents onguents, OEM, OHE et OPP. Elle est très hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) pour le groupe des lapins traité par l'OEM 10%, OHE 10% et OPP 10% par rapport au lot NT. Le même résultat est observé pour le groupe de lapins traité par la vaseline.

Les résultats du Tableau 15 montrent que l'évolution de la contraction (%) des plaies n'est pas significativement modifiée durant la période de 4 à 8 jours après l'excision chez tous les groupes de l'expérimentation.

**Tableau 15: Effet de différents traitements sur l'évolution du pourcentage de contraction des plaies d'excision chez les lapins.**

Groupes	Pourcentage des plaies (%)			
	Nombre de jours			
	4	8	12	16
NT	15.73 ± 0.37	23.93 ± 0.24	25.57 ± 0.50	42.62 ± 0.38
CIC	19.87 ± 0.13	29.48 ± 0.28	58.33 ± 0.24**	85.25 ± 0.18***
OPP 10%	22.8 ± 0.24	26.0 ± 0.2	62.5 ± 0.03***	80.4 ± 0.65***
OEM 10%	15.63 ± 0.85	38.18 ± 0.64*	81.81 ± 0.47***	92.00 ± 0.14***
OHE 10%	5.63 ± 0.23	24.03 ± 0.12	62.90 ± 0.28 ***	89.61 ± 0.17 ***
VAS	17.91 ± 0.25	26.86 ± 0.17	32.83 ± 0.47*	65.16 ± 0.32**

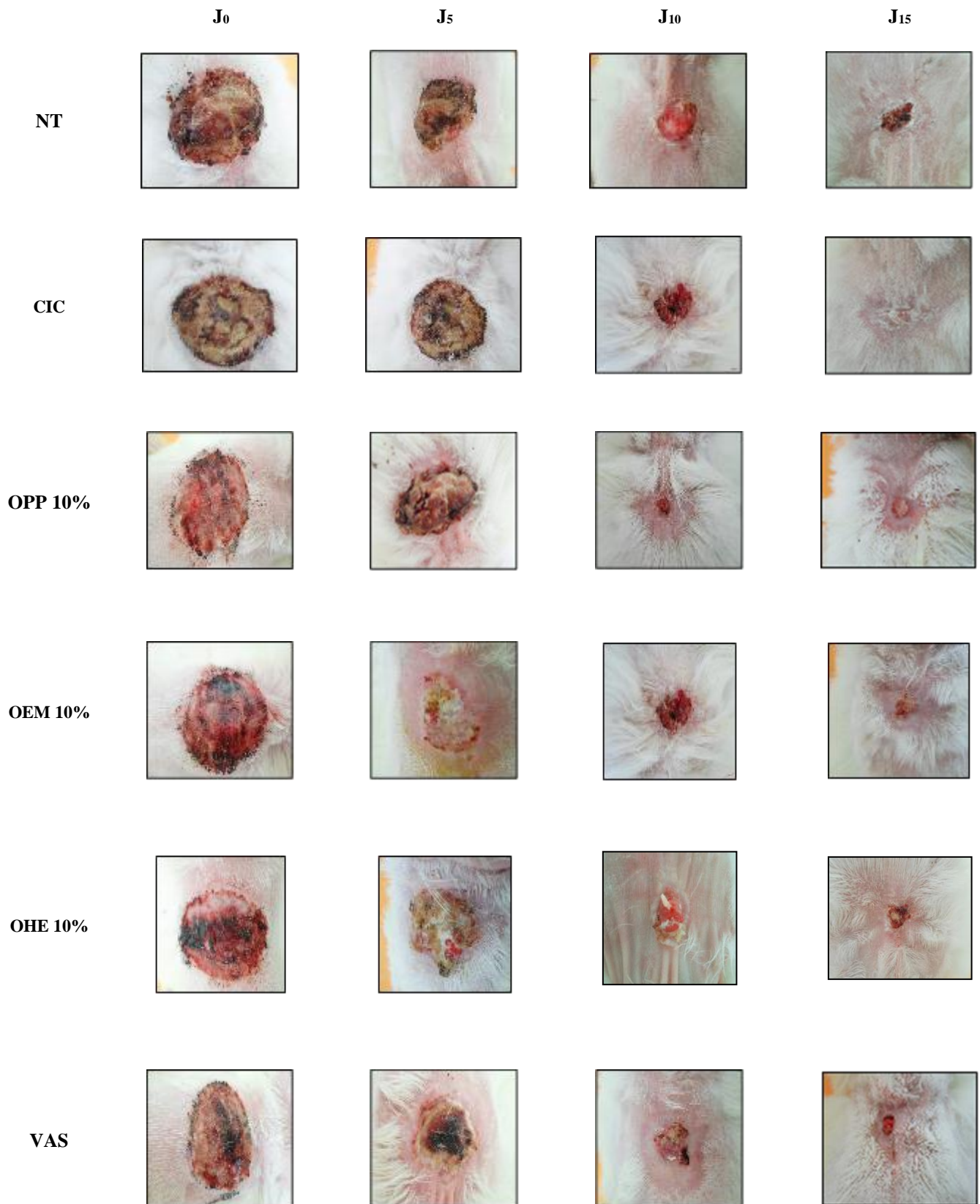
Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM (n = 4), \*P ≤ 0.05), \*\* p ≤ 0.01, \*\*\* p ≤ 0.001 lorsque les groupes traités sont comparés au groupe NT.

Tous les animaux traités (CIC, OEM 10%, OHE 10% et OPP 10%) ont montré un pourcentage de contraction très significative et significative de la zone de la plaie par rapport aux groupes NT et VAS ( $p \leq 0.001$  et  $p \leq 0.01$  respectivement). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes traités avec les préparations de l'onguent et du médicament de référence Cicatryl-Bio. L'OEM 10% a prouvé son efficacité dans le processus de cicatrisation avec 92.00 ± 0.14% de contraction des plaies d'excision chez le lapin et l'OHE 10% avec un pourcentage de contraction de 89.61 ± 0.17%, ce qui était mieux que 85.25 ± 0.18% obtenu avec le médicament de référence Cicatryl-Bio.

Les observations visuelles quotidiennes (Figure 28) indiquent la présence des signes d'inflammation (rougeur et fièvre) autour de la plaie chez des lapins de différents groupes, les premiers jours qui suivent l'excision de la peau. Ces signes disparaissent rapidement

pour les lots traités (CIC, OEM 10%, OHE 10% et OPP 10%) et persistent quelques jours pour le reste des groupes (NT et VAS).

La repousse du poil a été entravée, mais ce phénomène est identique dans tous les lots. Par la suite, la repousse est redevenue normale chez les animaux des différents lots.



**Figure 28: Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision chez les différents groupes.**

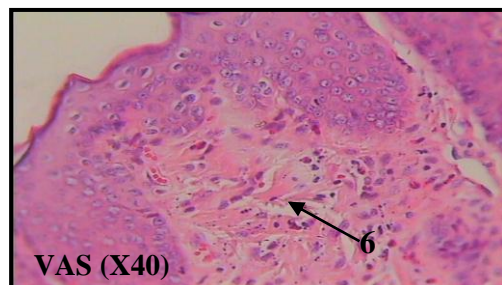
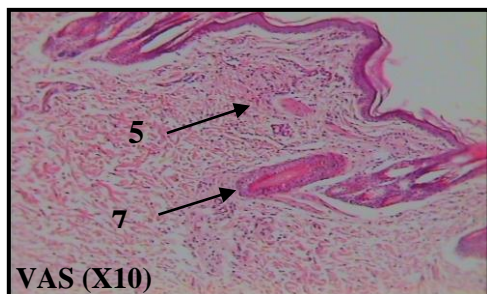
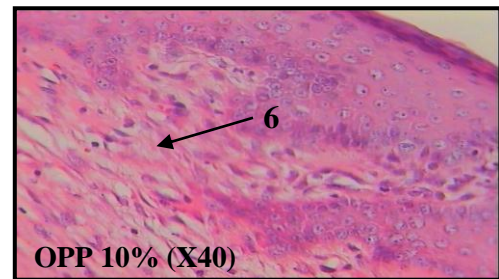
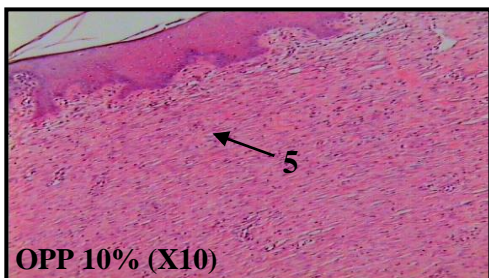
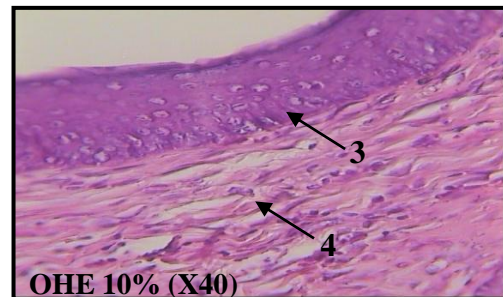
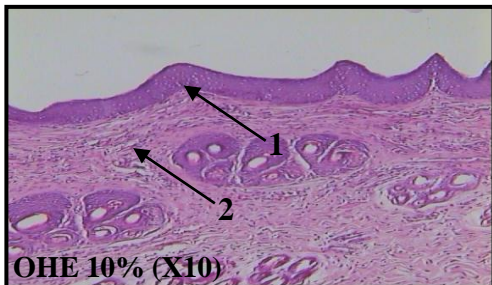
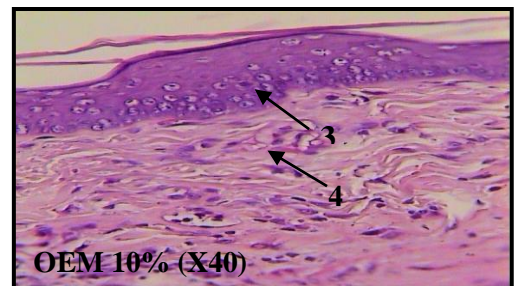
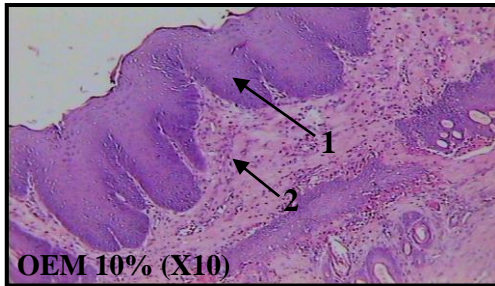
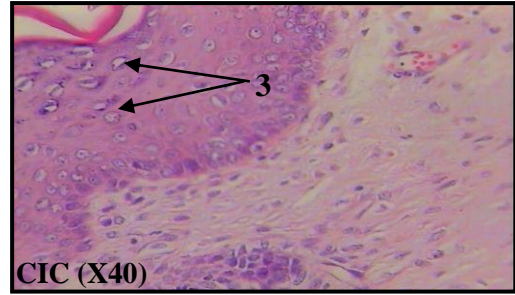
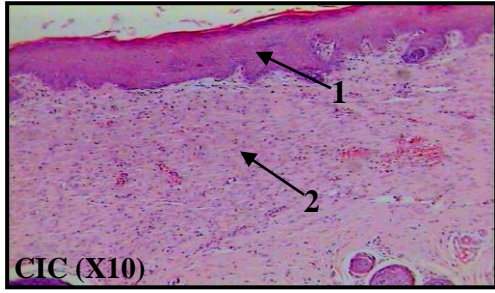
L'onguent à base d'extrait méthanolique et huile essentielle de la plante a prouvé son efficacité dans le processus cicatriciel avec une contraction (en cm et en %) des plaies d'excision chez les lapins comparable à celle obtenue avec Cicatryl, médicament de référence.

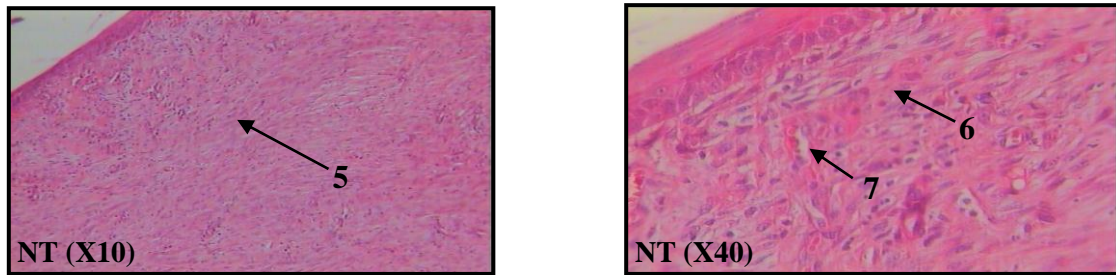
#### **III.2.3.4. Coupes histologiques**

La coloration à l'Hématoxyline permet de visualiser l'organisation structurale cutanée. Les résultats de l'examen histologique sont indiqués dans la Figure 29. Ils permettent de comparer des zones cicatricielles néo régénérées des lapins (traités ou non traités) par rapport à une zone saine sur une même coupe histologique d'un même échantillon.

L'épiderme normal comporte une couche de cellules basales et deux, rarement trois couches de cellules intermédiaires surmontées par trois couches de cellules granuleuses.

Le derme est un tissu conjonctif habituellement lâche en périphérie et plus dense (fibreux) en profondeur. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses sensibles libres et corpusculaires, ainsi que diverses annexes cutanées dérivées de l'épiderme et plongeant dans le derme.





1: derme mature épais; 2: collagène; 3: cellules de la granulosa; 4: épiderme; 5: bourgeon charnu;  
6: épiderme incomplet ; 7: angiogenèse

**Figure 29 : Évaluation histologique de coupes de peau de plaie colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (G X 10 et 40) de divers groupes (CIC, OEM 10%, OHE 10%, OPP 10%, VAS et NT).**

La figure 29 indique le résultat de l'étude des coupes histologiques des différents lots traités et le lot non traité en comparaison avec les coupes de la peau d'un lapin sain.

Les coupes histologiques des groupes NT et VAS ont montré la présence de bourgeons charnus avec plus de cellules inflammatoires, moins de dépôts de collagène et une maturation incomplète du derme et de l'épiderme. En comparaison avec les coupes de la peau du lapin sain, il apparaît évident que la réépithélisation est incomplète. Cela indique que, malgré la contraction de la plaie, la vaseline n'a pas de propriétés thérapeutiques. En effet, au cours du processus de cicatrisation, la vaseline est capable d'inhiber l'évaporation de l'eau de la plaie. La formation d'un environnement physiologique humide dans la plaie favorise la réparation cutanée et la régénération des tissus endommagés. Cependant, la thérapie avec de la vaseline peut provoquer une altération et une macération tissulaire (Djerrou *et al.*, 2011).

Les onguents OEM 10%, OHE 10% et OPP 10% préparés à partir de la plante *T. polium* L. ont considérablement amélioré le processus de cicatrisation des plaies après excision chez les lapins. À l'examen histologique, les groupes traités (CIC, OEM 10%, OHE 10%, OPP 10%) ont montré un dépôt de collagène plus élevé et une réépithélialisation complète. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec OEM 10% et OHE 10%, ces traitements ont eu un fort impact sur la granulation et l'épithélialisation des plaies, accéléré la réparation tissulaire et réduit la durée de ce processus.

L'effet de l'OEM 10% peut être dû aux effets combinés des constituants polyphénoliques, principalement des flavonoïdes et des dérivés de l'acide caféique. Par exemple, il a été démontré que la fraction flavonoïde du Ginkgo biloba augmente la prolifération des fibroblastes cutanés humains normaux *in vitro* (Kim *et al.*, 1997). Les fibroblastes sont responsables de la synthèse des fibres de collagène et de l'activité cicatrisante. L'actéoside (2), dérivé d'acide caféique, a récemment été rapporté pour réguler l'expression des métalloprotéinases matricielles et faciliter ainsi éventuellement le remodelage des matrices extracellulaires (Si *et al.*, 2018).

L'activité cicatrisante de l'OHE 10% est probablement due aux constituants bioactifs, principalement des terpènes, qui augmentent l'absorption percutanée de médicaments et d'autres composés en raison de leurs caractéristiques lipophiles. Selon Cal et Sopala (2008), la concentration maximale de terpènes dans la couche cornée et l'épiderme a été obtenue dans les 15 minutes suivant l'application. Cette biodisponibilité des molécules actives stimule la production de cellules inflammatoires (macrophage de type 2) qui est une étape clé de régulation du processus de cicatrisation. L'effet anti-inflammatoire est essentiel pour raccourcir la période de guérison ainsi que pour réduire la douleur et les cicatrices (Tümena *et al.*, 2018).

Nos données confirment les résultats obtenus dans des études antérieures réalisées sur d'autre modèle animal. Meguellati *et al.*, (2019) ont rapporté que le traitement avec un extrait de tissu calleux dérivé de *T.polium* avait un fort impact sur la granulation et l'épithélialisation des plaies, accéléré la réparation tissulaire et réduit la durée du processus de cicatrisation chez le rat. Ansari et coll (2013) ont également démontré l'efficacité d'un extrait de *T.polium* à 2% avec 91.5% de contraction de la plaie contre 75.3% pour le médicament de référence crème à la sulfadiazine d'argent sur des brûlures expérimentales au deuxième degré chez la souris.

*Conclusion et  
perspectives*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La phytothérapie constitue une alternative sérieuse ou un complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouvelles molécules reste une priorité de santé publique. La pharmacopée traditionnelle algérienne est riche en produits naturels utilisés pour le traitement de plusieurs pathologies.

L'objectif de ce travail, est la validation scientifique de l'utilisation de *Teucrium polium* L. dans la médecine traditionnelle comme agent cicatrisant par la population locale, ainsi que l'identification des molécules actives ayant un rôle dans ce pouvoir. Cette étude c'est effectuée sur l'extrait méthanolique et l'huile essentielle de la plante.

L'analyse HPLC-UV-MS de l'extrait méthanolique, a permis une caractérisation détaillée pour la première fois du profil phénolique avec l'identification d'une nouvelle molécule, 5-desmethylinensetin.

L'analyse de l'huile essentielle par GC-FID-MS, a permis d'identifier 83 molécules subdivisés en monoterpènes hydrocarbonés, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes et des composants non terpénoïdes.

Selon les données expérimentales de la toxicité orale aiguë chez les souris femelles Swiss (Observations des animaux, dosages biochimiques et coupes histologiques après sacrifice) et en se basant sur l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner, la plante peut être classée dans la catégorie non toxique (DL50 > 5000 mg/kg pc).

L'activité antioxydante *in vitro* des extraits de *Teucrium polium* L. reflète le potentiel antioxydant réel de la plante. Les résultats obtenus diffèrent d'un test à un autre et d'un extrait à un autre ; Le meilleur résultat a été obtenu avec l'extrait méthanolique qui a montré, selon sa grande teneur en polyphénols la plus grande puissance (TAC > DPPH >  $\beta$ -carotène > FRAP).

L'effet cicatrisant des onguents (base de l'extrait méthanolique, de l'huile essentielle ou de la poudre de plante respectivement) et à la concentration de 10% pour chacun, a été évalué sur des plaies d'excision sur des lapins New Zélandais albinos. L'onguent extrait méthanolique 10% a montré des propriétés cicatrisantes prometteuses et ceci par la diminution de la surface de la plaie (92% de contraction) et en réduisant la période de cicatrisation. L'effet cicatrisant de cet onguent est comparable à celui du médicament de référence Cicatryl-Bio.

L'effet irritant/corrosif aigu sur la peau, selon la directive de l'OCDE n°404 (OECD, 2002), nous a permis de classer les onguents de la plante comme non irritant. Ces derniers sont tolérables sur la peau à court terme.

En perspectives, d'autres recherches sont nécessaires, afin de standardiser la composition chimique de l'onguent extrait méthanolique et de comprendre le mécanisme physiologique derrière son activité cicatrisante. Par la suite, l'étude relation structure-activité permettra de corréliser les résultats de l'activité cicatrisante avec des structures bien précises responsables de cette activité. Cette étude est très importante si l'on veut améliorer l'effet pharmacologique de ces composés. Ceci permettra dans le future, la synthèse de molécules potentiellement actives. L'étude *in vivo* avec les molécules de synthèse, viendra confirmer ou infirmer ce premier résultat concernant le pouvoir cicatrisant de la plante.

D'autres tests toxicologiques semblent plus que nécessaires afin de déterminer les effets à long terme, ainsi que d'autres vertus thérapeutiques restent à dévoiler dans l'espoir de trouver, à cette plante, une place en pharmacologie moderne.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

1. Aburjai T, Hudaib M. (2006) Composition of the Essential Oil from Jordanian Germander (*Teucrium polium* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 18: 97-99.
2. Aguilar TAF, Carolina B, Hernández Navarro BCH, Pérez JAM. (2016) Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. Chapitre 1, *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf*, 2: 4-14.
3. Akin M, Oguz D, Saracoglu HT. (2010) Antibacterial Activity of Essential oil from *Thymbra spicata* var. *spicata* L. and *Teucrium polium* (Stapf Brig.). *International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 1 (1).
4. Aktürk Esen S, Kahvecioğlu S, Gül CB, Aktaş N, Esen İ. (2019) Toxic effects of herbal medicines: *Teucrium polium* and acute kidney injury. *European Respiratory Journal*, 5 : 1028–1030.
5. Al Bahtiti NH. (2012) "*Teucrium polium*" Extracts Jordanian Ja'adeh. *Asian Journal of Agricultural Sciences*, 4: 379–382.
6. Al-Sarar A, Hussein H, Abobakr Y, Al-Zabib A, Bazeyad AY. (2020) Mosquitocidal and repellent activities of essential oils against *Culex pipiens* L. *Entomological Research*, 50: 182-188.
7. Alwahsh MAA, Khairuddean M, Chong WK. (2015) Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. *Records of Natural Products*, 9: 159.
8. Ansari R, Sahinfard N, Namjou A, Rafieian M, Shirzad H, Rafieian-kopaei M. (2013) Ameliorative property of *Teucrium polium* on second degree burn. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 2: 9–11.
9. Aouadhi Ch, Ghazghazi H, Hasnaoui B, Maaroufi. (2013) Secondary Metabolite, antioxidant and Antibacterial Activities of *Teucrium polium* L Methanolic Extract. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4 (8): 1790-1797.
10. Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, Khebri S. (2010) Activite Anti-Oxydante Et Antimicrobienne D'extraits De *Cuminum Cuminum* L. *Lebanese Science Journal*, 11: 1.
11. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. (2005) Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 27-36.
12. Baali F, Boumerfeg S, Napoli E, Boudjelal A, Righi N, Deghima A, Baghiani A, Ruberto G. (2019) Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from Two Wild Algerian Medicinal Plants: *Mentha pulegium* L. and *Lavandula stoechas* L. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22:3.
13. Babar A, Naser AAW, Saiba S, Aftab A, Shah AK, Firoz A. (2015) Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5(8): 601–611.
14. Bachtarzi K, Hilmi S, Laouar H, Belkheiri A, Pacha YH. (2016) The chronic toxic effect of *Teucrium polium* aqueous extract on some blood parameters in rat. *Der Pharma Chemica*, 8: 384–387.
15. Bahramikia S, Yazdanparast R. (2012) Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 26: 1581–1593.

16. Bakari S, Ncir M, Felhi S, Hajlaoui H, Saoudi M, Gharsallah N, Kadri A. (2015) Chemical Composition and *in vitro* Evaluation of Total Phenolic, Flavonoid, and Antioxidant Properties of Essential Oil and Solvent Extract from the Aerial Parts of *Teucrium polium* Grown in Tunisia. *Food Sci Biotechnol*, 24: 1943–1949.
17. Bendjabeur S, Benchabane O, Bensouici C, Hazzit H, Baaliouamer A, Bitam A. (2018) Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of *Thymus algeriensis* and *Teucrium polium* from Algeria. *J. Food Meas. Charact*, 12: 2278–2288.
18. Bendif H, Lazali M, Souilah N, Miara MD, Kazernavičiūtė R, Baranauskienė R. (2018) Supercritical CO<sub>2</sub> extracts and essential oils from *Teucrium polium* L. growing in Algeria: chemical composition and antioxidant activity. *Journal Essential Oil Research*, 30 (6): 488-497.
19. Benkhaled A, Boudjelal A, Napoli E, Baali F, Ruberto G. (2020) Phytochemical profile, antioxidant activity and wound healing properties of *Artemisia absinthium* essential oil. *Asian Pacific journal of Tropical Biomedecin*, 10 (11): 496-504.
20. Bergmeyer HU, Harder M, Rej R. (1986) Approved Recommendation (1985) On Ifcc Methods For The Measurement Of Catalytic Concentration Of Enzymes. *International Federation Of Clinical Chemistry*, 24: 481-495.
21. Bimakr M, Abdul Rahman R, Taip F, Ganjloo A, Salleh L, Selamat J, Hamid A, Zaidu I. (2011) Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts processing*, 67–72.
22. Binti Jusril N, Mamat A, Shahzad Aslam M, Syarhabil M. (2016) Effect Of Drying Methods On The Antioxidant Properties Of Pandanus Amaryllifolius. *Indian Research Journal Of Pharmacy And Science*, 9: 706-715.
23. Boizot N, Charpentier JP. (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-82.
24. Bouclé S. (2010) Synthèse d'analogues d'alcaloïdes marins à potentiel anti-tumoral, Thèse de doctorat, Université François – Rabelais De Tours, p 35-45.
25. Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. (2012) Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83 (2): 286-292.
26. Boudjelal A, Henchiri C, Sari M, Sarri D, Hendel N, Benkhaled A, Ruberto G. (2013) Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *J Ethnopharmacol*, 148: 395–402.
27. Bounar R , Rebbas Kh, Ghadbane M, Dahia M, Miara Md. (2017) Flora And Medicinal Plants In The Green Spaces Of Bousaâda (Algeria) And Surroundings. *Global J Res. Med. Plants And Indigen. Med*, 6 (1) : 01–14.

28. Cal K, Sopala M. (2008) Ex-vivo skin absorption of terpenes from Vicks VapoRub ointment. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 14: 19-23.
29. Carochio M, Barreiro MF, Morales P, Ferreira ICFR. (2014) Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 377–399.
30. Chauhan DS, Tomar A, Tiwari M, Singh VP, Tomar S, Tripathi S. (2013) Endogenous and exogenous antioxidants status in seminal plasma of skeletal fluorotic patients. *Sch. J. App. Med*, 1(3):152-157.
31. Chen WY, Rogers A, Lydon M. (1992) Characterization of biological properties of wound fluid collected during early stages of wound healing. *Journal of investigative dermatology*, 99 (5): 559-564.
32. Cheriet TH, Hanfer M, Boudjelal A, Baali N, Mancini I, Seghiri R, Ameddah S, Menad A, Benayache F, Benayache S. (2016) Glycosyl flavonoid profile, in vivo antidiabetic and in vitro antioxidant properties of *Linaria reflexa* Desf. *Natural Product Research*, 1478-6427.
33. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. (2013) Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1-20.
34. D'Abrosca B, Pacifico S, Scognamiglio M, D'Angelo G, Galasso S, Monaco P, Fiorentino A. (2013) A new acylated flavone glycoside with antioxidant and radical scavenging activities from *Teucrium polium* leaves. *Natural Product Research*, 27: 356–363.
35. Dacosta Y. (2003) Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, 317.
36. Dağ M, Öztürk Z, Aydinli M, Koruk I, Kadayifçi A. (2014) Postpartum hepatotoxicity due to herbal medicine *Teucrium polium*. *Annals of Saudi Medicine*, 34: 541–543.
37. Darapbour E, Motamedi H, Mansour S, Nejad S. (2010) Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Medicine*, 124-127.
38. Dasari S, Ganjaji SM, MeriGa B. (2017) Bird glutathion S-transferase: endogeneous and exogeneous toxic insults. *Advances in animals and veterinary sciences*, 5 (9): 388.
39. Delanghe JR, Speeckaert MM. (2011) Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for?. *NDT Plus*, 4(2): 83–86.
40. De Marino S, Festa C, Zollo F, Incollingo F, Raimo G, Evangelista G, Iorizzi M. (2012) Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 133: 21–28.
41. Djabou N, Muselli A, Allali H, Dib M, Tabti B, Varesi L, Costa J. (2012) Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of *Teucrium polium* L. *Phytochemistry*, 51-62.
42. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. (2006) Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654–660.
43. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A A et Capasso F. (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sci*, p 337-53.

44. Dian MS, Lestaris T, Alexandra FD, Jelita H, Thalib I. (2017) Antioxidant and Anti-Glycation Activity of Ethanol Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Leaves Extract. *International Journal of Pharmacognosy And Phytochemical Research*, 9: 5.
45. Dridi A, Hadeif Y, Bouloudani L. (2016) Determination of Total Phenol, Flavonoid, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of *Teucrium polium* L. in Algerian East. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(10): 1566-1570.
46. Ebadollahi A, Taghinezhad E. (2020) Modeling and optimization of insecticidal effects of *Teucrium polium* L. essential oil against red four beetle (*Tribolium castaneum* Herbst) using response surface methodology. *Information Processing in Agriculture*, 7: 286-293.
47. El Atki Y, Aouam I, El kamari F, Taroq A, Lyoussi B, Abdellaoui A. (2019) Antioxidant activity of two wild *Teucrium* species from Morocco. *Int J Pharm Sci and Res*, 10(6): 2723-2729.
48. Elmasri WA, Hegazy M-EF, Aziz M, Koksai E, Amor W, Mechref Y, Hamood AN, Cordes DB, Pare PW. (2014) Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103: 107-113.
49. Elzayat E M, Auda SH, Alanazi F K, Al-Agamy M H. (2018) Evaluation of wound healing activity of henna, pomegranate and myrrh herbal ointment blend. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26 (5): 733-738.
50. Erlund I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology», *Nutr Res*, p 851-874.
51. Fallah H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331 (5): 372-379.
52. Fertout-Mouri N, Latreche A, Mehdadi Z, Toumi-Bénali F, Khaled MB. (2017) Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 15 : 346-353.
53. Frank, C L U. (1992) Toxicologie, Données générales procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque, Paris, 73- 202.
54. Gandhare B, Kavimani S, Raj Kapoor B. (2013). Acute and Subacute Toxicity Study of Methanolic Extract of *ceiba pentandra* (Linn.) Gaertn. on Rats. *Journal of Scientific Research*, 5 (2): 315-324.
55. Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003) Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité chimique*, 91-96.
56. Grubescic RJ, Vladimir Knezevic S, Kremer D, Kalodera Z, Vukovic J. (2007) Trichome micromorphology in *Teucrium* (Lamiaceae) species growing in Croatia. *Biologia, Bratislava*, 62 (2): 148-156.
57. Guillet G, Cartier H. (1999) Dermatologie, guide pratique, Ed. Heures de France, Paris : 382.
58. Halliwell B. (1999) How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*, 9: 1-32.
59. Harborne JB, Tomas-Barberan FA, Williams CA, Gil MI. (1986) A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry*, 25: 2811-2816.

60. Hasanuzzaman M, Hossain MA, Fujita M. (2012) Exogenous Selenium Pretreatment Protects Rapeseed Seedlings from Cadmium-Induced Oxidative Stress by Upregulating Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification Systems. *Biol Trace Elem Res*, 149:248–261.
61. Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Khan MIR, Fujita M. (2018) Silicon-mediated regulation of antioxidant defense and glyoxalase systems confers drought stress tolerance in *Brassica napus* L. *South African Journal of Botany*, 115: 50–57.
62. Hopkings W. (2003) *PHYSIOLOGIE VEGETALE*, 2<sup>ème</sup> édition, de Boeck, Paris, p 268.
63. Hilan C, Sfeir R, Jawish D, Aitour S. (2006) Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae. *Libanaise Science Journal*, 7(2) :13-22.
64. Hussain Mir A, Sexena M, Malla MY. (2013) An acute oral toxicity study of methanolic extract from *Tridax procumbens* in Sprague Dawley's rats as per OECD guidelines 423. *Asian Journal of Plant Science & Research*, 3: 16–20.
65. Hwisa NT, Katakam P, Chandu BR, Abadi EG, Shefha EM. (2013) Comparative *in vivo* evaluation of three types of honey on topical wound healing activity in rabbits. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3: 139–143.
66. Jacques C. (2010) Etude de la diffusion et du métabolisme cutané de xénobiotiques sur la peau d'oreille de porc maintenue en survie par comparaison avec le foie. Thèse de doctorat. Université De Toulouse.
67. Jerković I, Gašo-Sokač D, Pavlović H, Marijanović Z, Gugić M, Petrović I, Kovač S. (2012) Volatile Organic Compounds from *Centaureum erythraea* Rafn (Croatia) and the Antimicrobial Potential of Its Essential Oil. *Molecules*, 17: 2058-2072.
68. Kabouche A. (2005) Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae, Thèse de doctorat, université mentouri constantine, Algérie, p 40-49.
69. Kabouche Z, Boutaghane N, Laggoune S, Kabouche A, Ait-Kaki Z, Benlabed K. (2005) Comparative anti-microbial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int J Aromather*, 15: 129–133.
70. Kabouche A, Kabouche Z, Ghannadi A, Sajjadi SE. (2007) Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* ssp. *aurasiacum* from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 19: 44–46.
71. Kanitakis J. (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12 (4): 390-401.
72. Kerbouche L, Hazzit M, Ferhat MA, Baaliouamer A, Miguel MG. (2015) Biological activities of essential oils and ethanol extracts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. and *Origanum floribundum* Munby. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(5): 1197-1208.
73. Kim SJ, Lim MH, Chun IK, Won YH. (1997) Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. *Skin Pharmacology and Physiology*, 10: 200–205.
74. Kisiel W, Stojakowska A, Piozzi F, Rosselli S. (2001) Flavonoids from *Teucrium fruticans* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70: 199–201.

75. Kivrak S, Göktürk T, Kivrak I, Kaya E, Karababa E. (2019) Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some *Salvia* species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Sci Technol*, 39 (2): 423-431.
76. Krache I, Boussoualim N, Ouhida S, Amraoui N, Baghiani A, Arrar L. (2017) Acute and Chronic Effects of Methanolic Extract of *Teucrium polium* on Blood Parameters and Histopathology of Liver and Kidney in Female Rats. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 2 (3): 1-11.
77. Lacombe M. (2006) Abrégé d'anatomie et de physiologie humaines : les fondamentaux, Ed. Groupe Liaisons SA, Paris : 229.
78. Lhuillier A. (2007) Contribution A L'étude Phytochimique De Quatre Plantes Malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.F Ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa Trichophylla* Baker (Monimiaceae) Et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae), Thèse de doctorat, l'institut national polytechnique de Toulouse, France, p 49.
79. Li H B, Cheng KW, Wong CC, Fan K W, chen F, Tian, Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae, *Food Chimestry*, p 771-776.
80. Li H, Hao Z, Wang X, Huang L, Li J. (2009) Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresources Technology*, 100: 970-974.
81. Lograda T, Ramdani M, Chalard P, Figueredo G, Deghar A. (2014) Chemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Teucrium polium* L. Essential Oil from Eastern Algeria. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 2321-2547.
82. Lu FC. (1992) Toxicologie : Données Générales, Procédures d'Evaluation, Organes Cibles, Evaluation du Risque, 1<sup>st</sup> ed. Elsevier Masson, Paris.
83. Macheix J, Fleuriet A, Jay-allemmand C. (2005) Les composés phénoliques des végétaux», Presses Polytechnique et Universitaires Romandes, Lausanne, p 6.
84. Mahmoudi R, Nosratpour S. (2013) *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties. *International Food Research Journal*, 20 (4): 1697-1701.
85. Mahmoudi R, Kazeminia M, Kaboudari A. (2017) Review on composition and antimicrobial effects of *Teucrium* (*Teucrium polium* L.) grown in Iran and a comparison with around the world. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 19: 54-64.
86. Malki S, Abidi L, Hioun S, Yahia A. (2015) Variability of phenolic contents in ethanolic extracts of *Teucrium polium* L. populations and effect on antioxidant and antimicrobial activities. *J. Microbiol. Biotech. Res*, 5 (4): 21-27.
87. Malki S, Yahia AL. (2014) Evaluation Of Diuretic Activity From *Teucrium Polium* L. *Capitatum* Extracts (Lamiaceae) In Rats. *IJPSR*, 5: 4.

88. Maizi Y, Meddah B, Meddah ATT, Hernandez JAG. (2019) Seasonal variation in essential oil content, chemical composition and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. growing in Mascara (North West of Algeria). *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6: 151-157.
89. Marck V. (2010) Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie, 1st ed. Elsevier Masson, Paris.
90. Martin S et Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, p 304-315.
91. Mashreghi M, Rezazade Bazaz M, Mahdavi Shahri N, Asoodeh A, Mashreghi M, Behnam Rassouli M, Golmohammadzadeh S. (2013) Topical effects of frog "Rana ridibunda" skin secretions on wound healing and reduction of wound microbial load. *Journal of Ethnopharmacology*, 145: 793–797.
92. Meguellati H, Ouafi S, Saad S, 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.
93. Miara MD, Bendif H, Ouabed A, Rebbas K, Ait Hamoud, M, Amirat M, Greene A, Teixidor-Toneu J. (2019) Ethnoveterinary remedies used in the Algerian steppe: Exploring the relationship with traditional human herbal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 244:112-164.
94. Monique R. (2019) Plaies, cicatrisation et pansements. Bonnes pratiques infirmier en fiche. Fiche 3, Elsevier Masson, France.
95. Movahedi A, Basir R, Rahmat A, Charaffedine M, Othman F. (2014) Remarkable Anticancer Activity of *Teucrium polium* on Hepatocellular Carcinogenic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9 : 726-724.
96. Naczk N, Shahidi F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054 (1): 95-111.
97. Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi MS, Ghorbani A. (2005) Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology Iranian. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 63-79.
98. Napoli E, Siracusa L, Ruberto G. (2020) New Tricks for Old Guys: Recent Developments in the Chemistry, Biochemistry, Applications and Exploitation of Selected Species from the Lamiaceae Family. *Chem. Biodivers*, 17: (3).
99. National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP). (2014) Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide. Cambridge media; Perth, Australia.

100. Nikpour H, Mousavi M, Asadollahzadeh H. (2018) Qualitative and quantitative analysis of *Teucrium polium* essential oil components by GC-MS coupled with MCR and PARAFAC methods. *Phytochemical Analysis*, 29: 590-600.
101. Oganesyanyan GB, Galstyan AM, Mnatsakanyan VA, Shashkov AS, Agababyan R V. (1991) Phenylpropanoid glycosides of *Teucrium polium*. *Khimiia Prirodnykh Soedinenii*, 630.
102. Organization of Economic Co-Operation and Development (OECD). (2002a). Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Publishing, Paris.
103. Organization of Economic Co-Operation and Development (OECD). (2002b) Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris.
104. Oyaizu M. (1986) Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.
105. Ozenda P. (1983) Flore de sahara. CNRS, 2<sup>ème</sup> édition. Centre National de la Recherche Scientifique Editions. Paris. : 622.
106. Özer Z, Kiliç T, Çarikçi S, Yilmaz H. (2018) Investigation of phenolic compounds and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. decoction and infusion, *J. BAUN Inst. Sci. Technol*, 20(1): 212-218.
107. Pandey K B et Rizvi S I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p 270-278.
108. Panovska Tk, Kulevanova S, Stefova M. (2005) In vitro antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae), *Acta Pharm*, 55 : 207–214.
109. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. (2003) Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *American Society for Nutritional Sciences*, 33 (9): 2812-2819.
110. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem*, 30(1):11–26.
111. Pharmacopée Européenne 8.0. (2008) Determination of essential oils in herbal drugs, 2 (8) 12: 251–252.
112. Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JD. (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 (4) : 233-239.
113. Pipelzadeh MH, Pipelzadeh MR, Husseinzadeh P. (2003) A study on the effects of modulation of intracellular calcium on excisional wound healing in rabbit. *Iranian Biomedical Journal*, 7: 161–166.
114. Poinat T, Talon D. (2017) Antiseptics and local antibacterials in the prevention and treatment of infected wounds. *Revue Francophone de Cicatrisation*, 1 (2) : 31-34.

115. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269: 337-341.
116. Quézel P, Santa S. (1963) Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, 1<sup>st</sup> ed. Éditions CNRS, Paris. 741–743.
117. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A. (2013) *Teucrium polium* and kidney. *Journal of Renal Injury Prevention*, 2: 3–4.
118. Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA. (2002) Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, 135–145.
119. Rebbas K, Bounar R. (2014) Études floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la région de M'Sila (Algérie). *Phytothérapie*, 12 (5), 284-291.
120. Réggami Y, Benkhaled A, Boudjelal A, Berredjem H, Amamra A, Benyettou H, Larabi N, Senator A, Siracusa L, Ruberto G. (2019) *Artemisia herba-alba* aqueous extract improves insulin sensitivity and hepatic steatosis in rodent model of fructose-induced metabolic syndrome. *Archives of Physiology and Biochemistry*.
121. Ríos-Arrabal S, Artacho-Cordón F, León J, Román-Marinetto E, Salinas-Asensio MM, Calvente I, Núñez MI. (2013) Involvement of free radicals in breast cancer. *Springerplus*, 2 (404) : 1-12.
122. Rodriguez-Bernaldo J, Soszynski A, Martinez A, Rauter AP. (2015) Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial crops and product*, 77: 315-322.
123. Roehrs M, Valentini J, Paniz C, Moro A, Charão M, Bulcão R, Freitas F, Brucker N, Duarte M, Leal M, Burg G, Grune T, Garcia SG. (2011) The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*, 12:59.
124. Rolland Y. (2004) Antioxydants naturels végétaux, Burgundy Botanical Extracts, 11 (6): 419-424.
125. Rudakova YG, Senchenko SP, Popova OI. (2014) The study of phenolic compounds of herb *Teucrium polium* L. *Vopr. Biol. Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii*, 34–37.
126. Sadrizadeh N, Khezri S, Dehghan P, Mahmoudi R. (2018) Antibacterial effect of *Teucrium polium* essential oil and *Lactobacillus casei* probiotic on *Escherichia coli* O157:H7 in Kishk. *Applied Food Biotechnology*, 5: 131-140.
127. Saeidi K, Moosavi M, Lorigooini Z, Maggi F. (2018) Chemical characterization of the essential oil compositions and antioxidant activity from Iranian populations of *Achillea wilhelmsii* K.Koch. *Industrial Crops and Products*, 112 : 274-280.
128. Saleh I, Abd-ElGawad A, El Gendy A E N, Abd El Aty A, Mohamed T, Kassem H, Aldosri F, Elshamy A, Hegazy ME. (2020) Phytotoxic and Antimicrobial Activities of *Teucrium polium* and

Thymus decussatus Essential Oils Extracted Using Hydrodistillation and Microwave-Assisted Techniques. *Plants*, 9 (716) : 1-15.

129. Salido M, Rosado JA. (2009) Apoptosis: involvement of oxidative stress and intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis genes. *Springer Science and Business Media*, 1-17.
130. Sassoui A, Hendel N, Sarri Dj, Sarri M, Filippo M, Maurizio B, Donato R, Angelo C, Roman P, Giovanni B. (2020) Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides?. *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 26594–26604.
131. Shammass G, Verykokidou-Vitsaropoulou E. (1987) Flavonoid heterosides of *Teucrium polium* L. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, 21: 144–148.
132. Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M. (2009) Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 112 : 885–888.
133. Si N, Kanazawa H, Okuyama K, Imada K, Wang H, Yang J, Zhao H, Bian B, Ito A, Sato T. (2018) Involvement of catechols in acteoside in the activation of promatrix metalloproteinase-2 and membrane type-1-matrix metalloproteinase expression via a phosphatidylinositol-3-kinase pathway in human dermal fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41: 1530–1536.
134. Singleton VL, Rossi JAJ. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
135. Sirwal IA, Banday KA, Reshi AR, Bhat MA, Wann MM. (2004) Estimation of Glomerular Filtration Rat (GFR). *JK Science*, 6: 121-123.
136. Smeltzer S, Bare B, Suddarth DS, Brunner D. (2010) *Soins infirmiers en médecine et en chirurgie, Généralités*, Ed. De Boeck, Paris : 744.
137. Station météorologique de M'Sila (2019).
138. Stefkov G, Kulevanova S, Miova B, Dinevska-Kjovkarovska S, Moolgaard P, Jaeaeager AK, Josefsen K. (2011) Effects of *Teucrium polium* spp. *capitatum* flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats. *Pharmaceutical Biology*, 49: 885–892.
139. Tamri P, Hemmati A, Boroujerdnia MG. (2014) Wound healing properties of quince seed mucilage: *In vivo* evaluation in rabbit full-thickness wound model. *International Journal of Surgery* ,12 : 843–847.
140. Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90(3) : 333-340.
141. Thoppil JE, Minija J, Tajo A, Deena MJ. (2001) Antimicrobial activity of *Teucrium plectranthoides* Gamble essential oil. *Journal of Natural Remedies*, 12: 155-157.
142. Topcu G, Eris C, Kurucu S, Ulubelen A. (1996) A new flavanone from *Teucrium alyssifolium*. *Turkish Journal of Chemistry*, 20: 265–267.

143. Tümena I, Akkolc EK, Taşand H, Süntarc I, Kurtcab M.(2018) Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). *Journal of Ethnopharmacology*, 211: 235–246.
144. Verykokidou-Vitsaropoulou E, Vajias C. (1986) Methylated flavones from *Teucrium polium*. *Planta Medica*, 52: 401–402.
145. Van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Radic Biol Med*, 20 (3): 331-342.
146. Vinardell MP, Mitjans M. (2008) Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97: 46–59.
147. Warsito W, Noorhamdani N, Sukardi S and Suratmo S. (2018) Assessment of antioxidant activity of citronellal extract and fractions of essential oils of *Citrus hystrix* DC Tropical. *Journal of Pharmaceutical Research*, 17: 1119–1125.
148. Xiamin M, Cheng Y, Jian H, Feng Y, Chang Y, Zheng R, Wu X, Xi li L, Zhang H. (2019) Hollow, rough, and nitric oxide-releasing cerium oxide nanoparticles for promoting multiple stages of wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, 8, 1900256.
149. Zaidi Z. (2010) Skin: Structure and Function. *Dermatology in Clinical Practice*, 1-15.
150. Zengin H, Baysal A. (2014) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Thyme and Clove Essential Oils and Application in Minced Beef. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6).
151. Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, Pappa A, Panayiotidis MI. (2010) The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental and carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*, 188: 334-339.

## Annexe 1 : Matériel de laboratoire



**MPLC**



**HPLC préparative**



**Batteries des lapins**

## Annexe 2 : Composition alimentaire des croquettes

Composants	%
Mais	52,80
Son	10,80
Soja	32,10
Calcaire	01,50
Phosphate	00,80
Compléments vitaminiques	02,00

## Annexe 3 : Toxicité orale aiguë

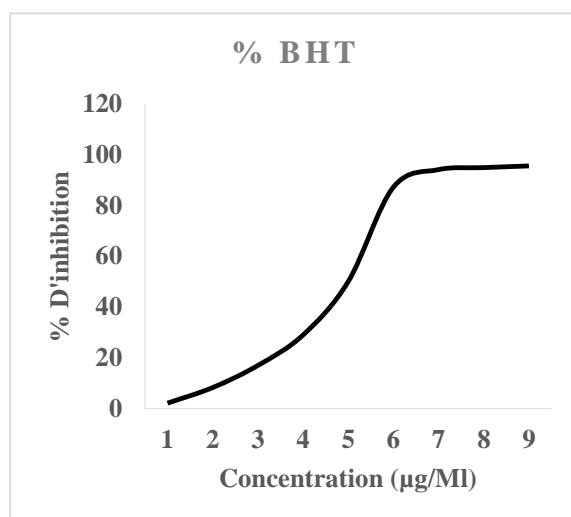
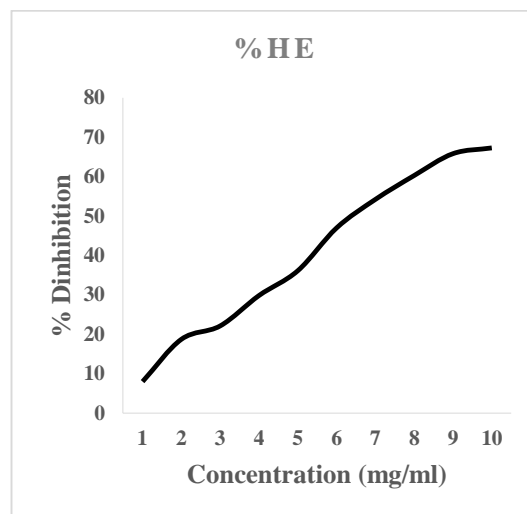
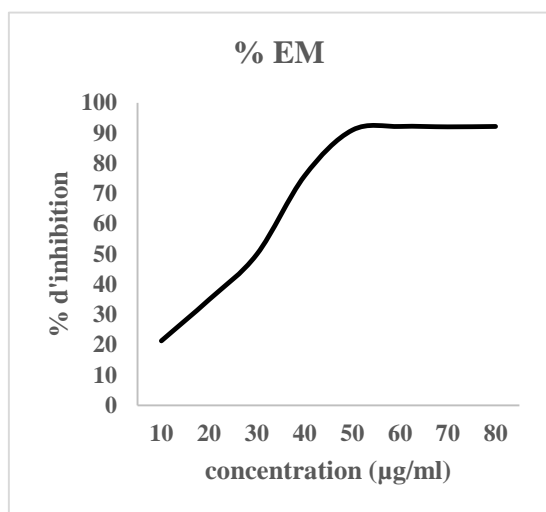
### Consommation de la nourriture par les souris pendant le traitement

jours	Consommation de nourriture (g)			
	Control	1000 mg/kg	2000 mg/kg	5000 mg/kg
1	18	25.5	22.5	26
5	20	28.0	28.5	40
10	25	25	22.5	35
15	22	26.5	28,5	31

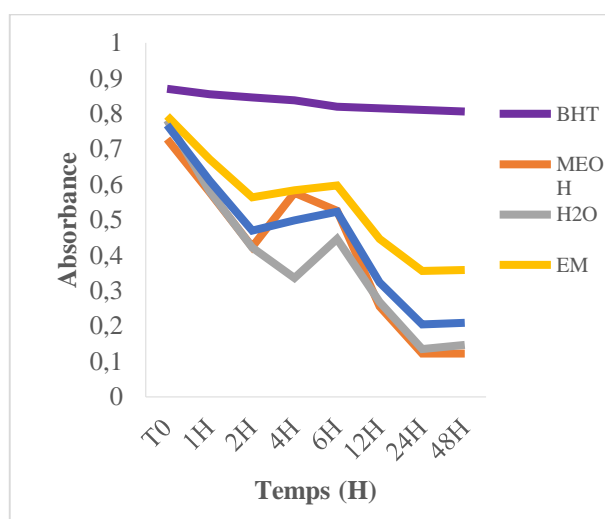
### Consommation de l'eau par les souris pendant le traitement

jours	Consommation de l'eau (ml)			
	Control	1000 mg/kg	2000 mg/kg	5000 mg/kg
1	20	20	30	20
5	30	31.5	35	40
10	25	20	22.5	25
15	21	21.5	29	32

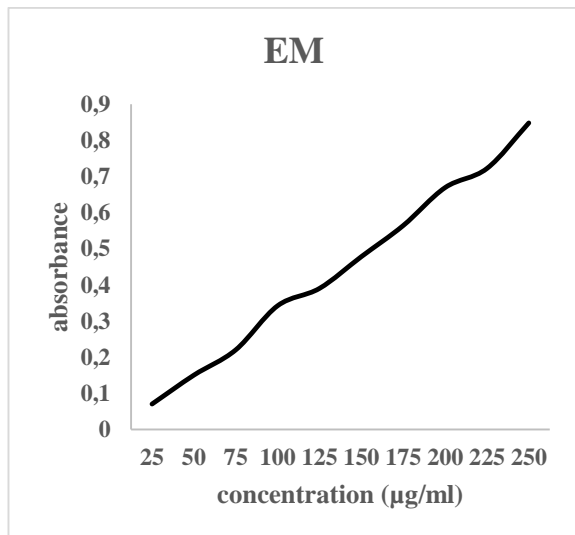
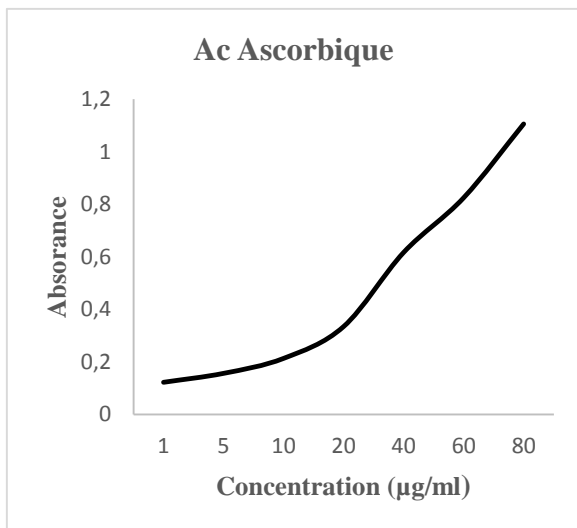
## Annexe 4 : Activité antioxydante



**Activité antiradicalaire des extraits (EM,HE et BHT) vis-à-vis du radical DPPH**



**Blanchissement de  $\beta$ -carotène par les extraits (EM, HE et BHT)**



**Pouvoir réducteur des extraits (EM et A.A)**

## Annexe 5 : Produits utilisés

### ✓ Cicatryl-bio

Cicatryl-bio est une pommade utilisée comme adjuvant de la cicatrisation pour les plaies et les brûlures et qui contient :

- Allantoïne guaiiazulène para-chlorométacrésol acétate d'alpha-tocophérol ;

### Autres ingrédients :

Pour 100 g de pommade :

- Parahydroxybenzoate de méthyle (E218), parahydroxybenzoate de propyle (E216),
- Paraffine liquide légère,
- Vaseline officinale,
- Mélange d'alcool cétostéarylique (90%) et de cétyl stéaryl sulfate sodique (10%),
- Mélange d'alcool cétostéarylique (70%) de cétyl stéaryl sulfate sodique (10 %) et d'acide gras éthoxylé d'origine organique (20%), monostéarate de glycérol, macrogol glycol 400, sorbitol (solution à 70%), eau purifiée.

**Substances actives** : Allantoïne, Alpha-tocophérol acétate, Gaïiazulène, P-chlorométacrésol

### ✓ Eau physiologique

Il s'agit de liquide physiologique : le NaCl à 0.9% utilisé comme placebo.



## **Annexe 6 : Préparation des coupes histologiques**

### **1. Hématoxyline-Éosine :**

C'est la technique la plus couramment utilisée en histologie animale et en anatomie pathologique de routine. L'hématoxyline : c'est le colorant basique, qui colore les structures acides en bleu violacé. Les noyaux, les ribosomes et le réticulum endoplasmique rugueux ont une forte affinité pour ce colorant en raison de leur richesse respective en ADN et en ARN. D'ailleurs, l'éosine est un colorant acide colore les structures basiques en rouge ou en rose. La plupart des protéines cytoplasmiques sont basiques, le cytoplasme des cellules apparaît donc habituellement coloré en rose ou en rouge rosé. Généralement, lorsque la coloration par l'hématoxyline est appliquée à des cellules animales, les noyaux sont colorés en bleu violet et les cytoplasmes en rose ou rouge. (Young *et al.*,2006)

### **2. Le traitement des coupes histologiques (Lafond2006)**

Les prélèvements histologiques ont été traités au laboratoire d'histopathologie à M'sila

#### **✓ Fixation, Inclusion en paraffine**

Les prélèvements réalisés et fixés dans du formaldéhyde commerciale dilué à 10% et tamponné à la neutralité pour 48 heures. Après déshydratation (passages successifs dans différents bains d'alcool de concentration croissante : 80°, 95° et 100°) les prélèvements ont été enrobés en paraffine puis éclaircissement dans du toluène. Cette étape d'imprégnation en paraffine a été réalisée dans un automate

Les prélèvements ont ensuite dans une station d'enrobage et coupés à une épaisseur de 3 µm à l'aide d'un microtome à mouvement vertical. Après récupération sur milieu liquide (bain-marie à 40°C), les coupes ont été étalées sur lame de verre préalablement recouverte d'une goutte d'albumine glycéinée. Elles ont ensuite été séchées à l'étuve (1 heure à 37°C) avant d'être colorées.

#### **✓ Coloration**

Une coloration biochimique à l'Hémalun-éosine a été effectuée, après déparaffinage au toluène, et réhydratation progressive de la coupe tissulaire (bains d'alcools à 100°, 95° et eau), Les coupes ont été plongées pendant 2 minutes dans une solution d'Hémalun de Mayer puis rincées à l'eau courante pendant 5 minutes. Une deuxième coloration ensuit réalisée dans une solution d'Eosine jaunâtre –Erythrosine aqueuse à 2% pendant 30 secondes. Elles ont enfin rapidement été rincées à l'eau courante puis déshydratées par passage dans des alcools.

## **Annexe 7 : Limites de l'expérimentation animale**

### ✓ **Le principe de règle des 3 R :**

L'éthique est l'ensemble des "règles de conduite définies par la morale". Elle se base sur "La règle des 3 R" ; Une des principales bases éthiques appliquées à l'expérimentation animale qui a été fixée en 1959 dans l'article : « The Principles of humane experimental technique » où les biologistes britanniques Russel et Burch publiaient la règle des 3 R :

Remplacement, Réduction, Raffinement.

- **Le Remplacement** : c'est le remplacement des espèces sensibles par des espèces non sensibles, ou par des modèles non vivants (modèles mathématiques, tests in vitro...), par l'utilisation des modèles informatiques ou de vidéos pour l'enseignement ; de culture de cellules ou d'une espèce moins évoluée (insectes, mollusques...)
- **La Réduction** : en cas d'absence du complet remplacement, les chercheurs doivent limiter l'utilisation des animaux aux seules expériences considérées comme essentielles, réduire leur nombre au strict minimum pour obtenir des résultats scientifiques valides (utiliser un nombre définis des animaux), et éviter les répétitions expérimentales inutiles par la mise en place de bases de données facilement accessibles
- **Le Raffinement** : la souffrance de l'animal lorsque cette souffrance n'est pas l'objet même de l'expérimentation doit être évité au maximum. Il consiste à optimiser les conditions dans lesquelles les animaux sont hébergés, soignés et utilisés, à limiter le stress et la souffrance, à supprimer l'inconfort, la douleur, la détresse et l'angoisse subis par les animaux expérimentaux par le développement le recours aux anesthésiques et analgésiques.

Déterminer des points limites dans les protocoles longs et douloureux (études sur le cancer), en préférant des méthodes d'investigations non invasives (échographie, télémétrie...) et des techniques de contention adaptées... (utilisation d'imagerie par résonance magnétique, développement de meilleures procédures d'anesthésie et d'analgésie, utilisation de la télémétrie pour l'enregistrement de la température, la pression sanguine et la fréquence cardiaque à distance, par ondes-radio...)

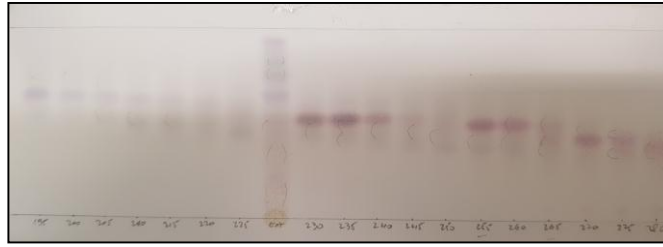
### ✓ **La responsabilité**

Elle s'applique aux chercheurs/enseignants habilités qui décident des expérimentations et des protocoles, mais aussi à toute personne impliquée dans l'expérimentation : animalier, techniciens de l'animalerie, étudiants, vétérinaire ....

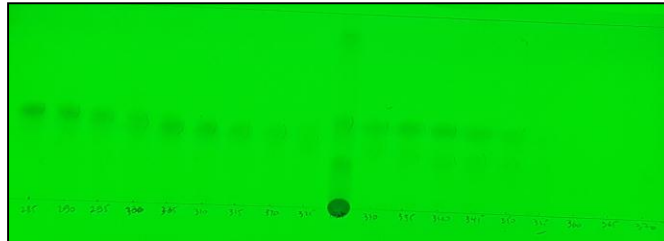
## Annexe 8 : Chromatographie sur couche mince

### Plaque CCM

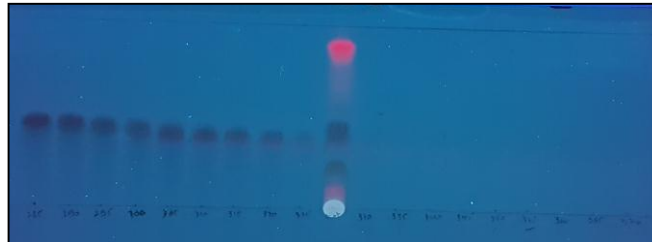
**Observation à  
l'œil nu**



**Observation  
sous UV  
à 254 nm**



**Observation  
sous UV  
à 366 nm**





# Teucrium polium - wound healing potential, toxicity and polyphenolic profile



Sarra Chabane<sup>a,2,\*</sup>, Amel Boudjelal<sup>b</sup>, Morris Keller<sup>c</sup>, Sara Doubakh<sup>b</sup>, Olivier Potterat<sup>c,1,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Life and Nature Science, Faculty of Sciences, Mohamed Boudiaf University, 28000 M'Sila, Algeria

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Sciences, Mohamed Boudiaf University, 28000 M'Sila, Algeria

<sup>c</sup> Division of Pharmaceutical Biology, University of Basel, Klingelbergstrasse 50, CH-4056 Basel, Switzerland

## ARTICLE INFO

### Article History:

Received 11 May 2020

Revised 1 October 2020

Accepted 19 October 2020

Available online xxx

Edited by M Marrelli

### Keywords:

*Teucrium polium*

Polyphenolic profile

Wound healing

Acute dermal and oral toxicity

## ABSTRACT

The wound healing properties of *Teucrium polium* L., a plant used in the Algerian traditional medicine for the treatment of wounds, have been investigated using an excision wound model in rabbits. An ointment was prepared with two concentrations (5 and 10%) of a methanolic extract of the aerial parts. Both preparations showed significant effect on the wound contraction when compared to the control and the group treated with petroleum jelly. In addition, acute dermal and oral toxicity was assessed in animal models. The absence of signs of toxicity on the skin of rabbits indicated the safety of the ointment. After oral administration in mice at doses of 1000 and 2000 mg/kg b.wt, no signs of liver and kidney toxicity were detected by analysis of biochemical parameters and by histological examination. The composition of the methanolic extract was investigated by HPLC-PDA-MS analysis, and a comprehensive profile of phenolic compounds was established, with 14 flavonoids and phenylethanoid glycosides identified as the main polyphenolic constituents. Overall, the data support the use of *T. polium* as a wound healing agent in the Algerian traditional medicine.

© 2020 The Author(s). Published by Elsevier B.V. on behalf of SAAB. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

## 1. Introduction

The genus *Teucrium* (family Lamiaceae) comprises approximately 300 species and is mainly distributed in Europe, North Africa and in the temperate parts of Asia (Bahramikia and Yazdanparast, 2012; Dehshiri and Azadbakht, 2012). Several species including *T. chamaedrys*, *T. montanum*, and *T. polium* are used in traditional medicinal systems (Stankovic et al., 2011). *T. polium* L., known popularly as felty germander (jâada or khayatit-lajrah in Arabic), is a deciduous shrub native to the western Mediterranean region abundantly growing in rocky places of the hills and deserts of Mediterranean countries up to South Western Asia (Bahramikia and Yazdanparast, 2012). The plant which includes many subspecies and varieties is very common in Algeria where it grows particularly in the Algerian and Oranian high plateaus and in the Oranian Saharian Atlas (Quézel and Santa, 1963). In Algerian traditional medicine, the aerial parts of the plant are used for the treatment of diabetes, hypertension and, in the form of a powder mixed with petroleum jelly or beeswax, as a wound healing agent (Boudjelal et al., 2013).

Extracts of *T. polium* have been shown to possess various biological activities including antioxidant, antibacterial, antiviral, antifungal, cytotoxic, antimutagenic, antiinflammatory, analgesic, antispasmodic, hypolipidemic, hypoglycemic, hepatoprotective, antiulcer, and anticonvulsant effects (Jaradat, 2015). Wound healing properties have been investigated in mice (Ansari et al., 2013) and rats (Meguellati et al., 2019; Huseini et al., 2020).

Flavonoids, phenylethanoid glycosides, and various terpenoids including neoclerodane diterpenes, sterols, and iridoids, have been isolated from the plant which also contains an essential oil rich in sesquiterpenes (Bahramikia and Yazdanparast, 2012; Basudan and Abu-Gabal, 2018; Elmasri et al., 2015).

The aim of the present study was to determine the polyphenolic composition of a methanolic extract of *T. polium* and to investigate its wound healing properties for the first time in rabbits. Furthermore, the acute cutaneous and oral toxicity were assessed. Wound excision was selected as a representative model to study the traditional use of the plant in the treatment of open wounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and extraction

The flowering aerial parts of *Teucrium polium* (Subsp. *capitatum*) were collected in May 2018, in M'sila, Algeria, at 35° 12' 36.97" N

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [sarra.chabane@univ-msila.dz](mailto:sarra.chabane@univ-msila.dz) (S. Chabane), [olivier.potterat@unibas.ch](mailto:olivier.potterat@unibas.ch) (O. Potterat).

<sup>2</sup> [Orcid.org/0000-0002-2519-4900](https://orcid.org/0000-0002-2519-4900)

<sup>1</sup> [Orcid.org/0000-0001-5962-6516](https://orcid.org/0000-0001-5962-6516)

latitude and 4° 10' 46.08" E longitude. The plant was authenticated by Dr. Sarri Dj., Department SNV/M'sila University, and a specimen (AB-92) was deposited at the herbarium of the Department. The plant material was rinsed and dried in the shade at room temperature and finely ground into a powder with a grinder (sieve pore size 200  $\mu\text{m}$ ).

The methanolic extract was obtained with a Soxhlet extractor. The vegetable powder (50 g) was extracted with 500 ml of methanol for 6 h. The extract was filtered and evaporated under reduced pressure to yield an oily residue (17.5%).

## 2.2. General experimental procedures

Medium pressure liquid chromatography (MPLC) was performed on a Premium Flash-Prep LC system PuriFlash® 4100 (Interchim, Montluçon, France). The sample was prepared as a dry load and adsorbed on 25 g silica gel 60. Preparative HPLC was carried out on a Preparative LC/MSD System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) consisting of a quaternary pump (1200 Series, 1290 Infinity II 1260 Prep Bin Pump), a PDA detector (1100 Series), and a 6120 Quadrupole LC/MS. A SunFire Prep C18 OBD column (5  $\mu\text{m}$ , 30  $\times$  150 mm i.d., Waters, Milford, MA, USA), equipped with a C18 Prep Guard Cartridge (10  $\times$  30 mm i.d.) was used. The flow rate was 20 ml/min. Data acquisition and processing was performed using ChemStation software (Agilent Technologies). For injection a 1290 Infinity II 1290 Valve Drive manual injection system (Agilent Technologies) was used. Semi-preparative HPLC was carried out on an Agilent 1100 Series instrument equipped with a PDA detector. Separations were carried out on a SunFire C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 150  $\times$  10 mm i.d., Waters) equipped with a guard column (10  $\times$  10 mm i.d.). A flow rate of 4 ml/min was applied. Data acquisition and processing was performed using ChemStation software. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III spectrometer (Rheinstetten, Germany) operating at 500.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  NMR and 2D NMR spectra were measured in DMSO- $d_6$  or  $\text{CDCl}_3$  (ARMAR Chemicals) with a 1 mm TXI probe at 23 °C. Data were analyzed using Topspin (Bruker) and Spectrus Processor (ACD/Lab, Toronto, Canada) softwares.

Silica gel 60 (0.040–0.063 mm) used for MPLC was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). TLC was performed on silica gel 60 F254 precoated plates (ALUGRAM Xtra Nano-SIL G, Macherey-Nagel, Düren, Germany); detection under UV 254 nm and after spraying with vanillin-sulfuric acid reagent followed by heating at 100 °C. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). HPLC-grade acetonitrile was purchased from Avantor Performance Materials (Radnor Township, PA, USA). Methanol for extraction was from Honeywell (Offenbach, Germany). Solvents used for liquid/liquid partition and column chromatography were from Scharlau (Barcelona, Spain). Diosmin (Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), luteolin (AdipoGen, San Diego, CA, USA), hyperoside (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), isoquercitrin (Carl Roth), and luteolin 7-O-glucoside (Extrasynthèse, Gernay, France) were used as chromatographic reference substances.

## 2.3. Total phenolic and flavonoid contents

Total Phenolic Content (TPC) of the extract was determined using the Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Singleton and Rossi (Singleton and Rossi, 1965), with gallic acid as a standard. 200  $\mu\text{l}$  of each sample dissolved in methanol was added to 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent (1:10 dilution in distilled water). The mixture was shaken and, after 4 min, 800 ml of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 mg/ml) solution were added. The mixture was kept for 2 h at room temperature and the absorbance measured at 760 nm. Total phenolic content was expressed in mg gallic acid equivalents per gram dry extract (mg GAE/g DE) using a calibration curve with gallic acid. All measurements were performed in triplicate.

Total Flavonoid Content (TFC) of the extract was measured according to the aluminum chloride colorimetric method based on the formation of a flavonoid-aluminum complex (Carocho et al., 2014) using a quercetin calibration curve: 1 ml of methanol extract was mixed with 1 ml of 2%  $\text{AlCl}_3$  methanol solution. After 10 min, the absorbance was determined at 430 nm. The results were expressed as mg quercetin equivalent per gram of dry extract (mg QE/g DE). All measurements were performed in triplicate.

## 2.4. HPLC-PDA-MS analysis

HPLC-PDA-MS analysis was performed on a chromatographic system consisting of a degasser, quaternary pump (LC-20AD), a column oven (CTO-20AC), a PDA detector (SPD-M20A), and a triple quadrupole mass spectrometer (LCMS-8030) (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation was carried out on a SunFire C18 column (3.5  $\mu\text{m}$ , 3.0  $\times$  150 mm i.d., Waters) equipped with a guard column (3.0  $\times$  10 mm). The mobile phase consisted of water + 0.1% formic acid (A) and acetonitrile + 0.1% formic acid (B). A gradient of 5–80% B in 30 min followed by 80–100% B in 5 min was applied. The flow rate was 0.4 ml/min. The extract was dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml and 10  $\mu\text{l}$  were injected. The LabSolutions software (Shimadzu) was used for data acquisition and processing.

## 2.5. Compound isolation

The methanolic extract of *T. polium* (32 g) was suspended in 500 ml water and then successively partitioned with EtOAc (3  $\times$  500 ml) and *n*-BuOH saturated with  $\text{H}_2\text{O}$  (4  $\times$  500 ml) to provide a EtOAc-soluble fraction (8.2 g), a *n*-BuOH-soluble fraction (10.8 g), and the  $\text{H}_2\text{O}$ -soluble fraction (12.6 g). The EtOAc-soluble fraction was fractionated by MPLC on a silica column (47  $\times$  5 cm, i.d.) with a *n*-hexane/EtOAc/MeOH gradient [*n*-hexane/EtOAc 98:2 (0–10 min), *n*-hexane/EtOAc 2–70% EtOAc (10–420 min), *n*-hexane/EtOAc 70–100% EtOAc (420–480 min), EtOAc/MeOH 0–20% MeOH (480–540 min), 100% MeOH (540–600 min)] at a flow rate of 20 ml/min. In total, 540 fractions were collected, which were combined based on TLC analysis into 22 fractions (Fr.1-Fr.22).

Fr. 11 (85 mg) afforded **14** (1.3 mg,  $t_{\text{R}}$  = 29.3 min) after preparative HPLC with a gradient of 5–80% acetonitrile in water (both containing 0.1% formic acid) in 30 min. Compounds **10** (12.5 mg,  $t_{\text{R}}$  = 11.9 min), **11** (2.0 mg,  $t_{\text{R}}$  = 12.6 min), and **13** (16.9 mg,  $t_{\text{R}}$  = 19.3 min) were isolated from Fr. 14 (327 mg) by preparative HPLC with a gradient of 45–60% acetonitrile in water (both containing 0.1% formic acid) in 30 min. Separation of Fr. 21 (247 mg) by preparative HPLC with a gradient of 5–80% acetonitrile in water (both containing 0.1% formic acid) in 30 min afforded **9** (6.1 mg,  $t_{\text{R}}$  = 20.8 min) and **12** (3.0 mg,  $t_{\text{R}}$  = 23.9 min). Separation of Fr. 22 by preparative HPLC with a gradient of 15–50% acetonitrile in water (both containing 0.1% formic acid) in 30 min gave compound **2** (11.4 mg,  $t_{\text{R}}$  = 11.3 min) and a fraction (25.6 mg) which was further purified by semi-preparative HPLC with 16% aq. acetonitrile containing 0.1% formic acid to provide **3** (3.5 mg,  $t_{\text{R}}$  = 21.4 min), a mixture of **4** and **5** (4.8 mg,  $t_{\text{R}}$  = 23.4 min), and **6** (3.3 mg,  $t_{\text{R}}$  = 29.8 min). A portion (1.0 g) of the *n*-BuOH-soluble fraction was separated by preparative HPLC with a gradient of 5–80% acetonitrile in water (both containing 0.1% formic acid) in 30 min to give **1** (373 mg,  $t_{\text{R}}$  = 11.6 min).

## 2.6. Animals

All animals (Swiss albino mice weighing 31–33 g and New Zealand albino rabbits weighing 1.9–2.1 kg) were obtained from Pasteur Institute of Algiers. They were fed *ad libitum* with water and kibble diet.

All experimental protocols were in accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC) and approved by the

National Committee for Evaluation and Programming of University Research of Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (Registration N°: DO1N01UN280120150001).

## 2.7. Preparation of the ointment

The methanolic extract of *T. polium* was mixed with petroleum jelly (PJ) (Unilever, France) at a concentration of 5% and 10% to obtain the methanolic extract ointments OME 5% and OME 10%, respectively. Cicatryl-Bio (CIC) (Pierre Fabre, Paris, France) was used as reference drug.

## 2.8. Acute dermal irritation

The acute dermal irritation assay was carried out on New Zealand albino rabbits. The study was conducted according to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines 404 (OECD 2002a). OME 5% and 10% were applied topically on the back of the animals at an amount of 0.5 g per rabbit. The animals were observed for mortality and any toxic or deleterious effects with special attention given to the first 4 hrs and then once daily for a period of 14 days following the topical application. At the application sites, the skin was observed for signs of erythema, edema and local injury. The body weight and food intake were also recorded.

## 2.9. Acute oral toxicity

The acute oral toxicity was assessed in healthy young adult female Swiss albino mice, nulliparous and non-pregnant. The study was conducted according to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines 423 (OECD 2002b).

Twelve Swiss albino mice were divided into four groups of three animals and treated orally with different doses of *T. polium* extract for 14 days: Group I, control, received distilled water; Group II received 1000 mg/kg b.wt; Group III received 2000 mg/kg b.wt and Group IV received 5000 mg/kg b.wt as suspension by gavage. The treated mice were observed individually. The main observations and evaluations were external physical aspects (appearance and hair loss), behavioral changes (posture, scraping, aggressiveness, sensitivity to noise and light, hypersalivation) and measurable clinical signs (changes in heart and respiratory rhythms, abdominal contraction, diarrhea) (Hussain Mir et al., 2013).

At the end of the experiment, mice were sacrificed. Blood samples were collected to explore biochemical parameters (transaminases, alkaline phosphatase, serum total protein, creatinine, urea and uric acid). The parameters were measured by enzymatic colorimetric methods using commercially available kits (Spinreact, Girona, Spain). The livers and kidneys were excised from all experimental mice for histopathological examinations (Gandhare et al., 2013).

## 2.10. Evaluation of wound healing activity

An area of 500 mm<sup>2</sup> on the back of the New Zealand albino rabbit was shaved with an electric razor. The animals were left in their cages 24 h to verify the absence of irritation of the shaved zone (Hwisa et al., 2013). The animals were randomly divided into 5 groups of 4 rabbits as follows: first group was untreated (UT), second group treated with the reference drug (CIC), third group with OME 5%, fourth group with OME 10%, and fifth group with petroleum jelly (PJ).

### 2.10.1. Wound healing assay

Animals were anaesthetized using intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg)-xylazine (10 mg/kg) (Mashreghi et al., 2013). A circle of 2.5 cm in diameter was drawn on the skin of the lumbar region which was then excised.

Excisional wounds were immediately treated after surgical operation and the animals placed in individual cages with clean litters. Preparations (CIC, OME 5%, OME 10% and PJ) were applied topically at an amount of 0.5 g per rabbit once per day till complete healing (Pipelzadeh et al., 2003).

The dimensions of excision wounds were measured every 4 days during the trial period by tracing the wounds on a transparent paper and measuring through the graph paper. The percentage of the evolution of wound contraction was calculated using the following formula (Tamri et al., 2014):

%wound contraction

$$= \frac{\text{Initial wound size} - \text{Specific day wound size}}{\text{Initial wound size}} \times 100$$

### 2.10.2. Histological sections

At the end of the experiment, the animals were sacrificed. The tissue slices (scarred skin and 0.5 cm of healthy skin) were fixed in formalin (10%) for 72 h. The samples were dehydrated by passing them through three successive baths of ethanol. Then they were thinned in two baths of xylene and embedded in paraffin by two successive baths at 60 °C each one. The paraffin blocks obtained were then cut with a microtome, rehydrated and stained with haematoxylin-eosin (Marck, 2010).

### 2.10.3. Statistical analysis

The data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) for determining the significant difference (GraphPad, version 7). The results are presented as means ± SEM. The inter group significance was analyzed using by Dunnett's or Tukey test whenever applicable and differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Polyphenolic profile

The methanolic extract of *T. polium* aerial parts had a total phenolic content of 86.63 ± 0.03 mg GAE/g DE, and a total flavonoid content of 24.43 ± 0.01 mg QE/g DE.

The polyphenolic profile of the extract was investigated by HPLC-UV-MS (Fig. 1), and revealed the presence of several peaks corresponding to flavonoids and caffeic acid derivatives. Compounds **7** and **8** were identified from their UV and MS data, and by chromatographic comparison with commercial reference samples as diosmin (Al Bahtiti, 2012) and luteolin (D'Abrosca et al., 2013; Elmasri et al., 2015), respectively. Further compounds were identified by <sup>1</sup>H and 2D NMR analysis after isolation. They included poliumoside (**1**) (De Marino et al., 2012; Oganeyan et al., 1991), acteoside (**2**) (Elmasri et al., 2015), hyperoside (**3**) (Rudakova et al., 2014), isoquercitrin (**4**) (Shammas and Verykokidou-Vitsaropoulou, 1987), luteolin 7-O-β-D-glucopyranoside (**5**) (D'Abrosca et al., 2013; De Marino et al., 2012), luteolin 7-O-(5-O-syringoyl-β-D-apiofuranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranoside (**6**) (D'Abrosca et al., 2013), cirsiol (**9**), cirsimaritin (**10**) (Elmasri et al., 2015; Stefkov et al., 2011; Verykokidou-Vitsaropoulou and Vajias, 1986), cirsilineol (**11**) (Stefkov et al., 2011), eupatorin (**12**) (Verykokidou-Vitsaropoulou and Vajias, 1986), 5-desmethylinensetin (**13**) (Alwahsh et al., 2015; Harborne et al., 1986; Kisiel et al., 2001; Topcu et al., 1996), and salvigenin (**14**) (Elmasri et al., 2014) (Fig. 2). All compounds had been previously reported in *T. polium* except flavonoid **13**. The latter compound had been previously described in other species of the genus *Teucrium*. To our knowledge, this study represents the first report of a detailed polyphenolic profile of *T. polium*.

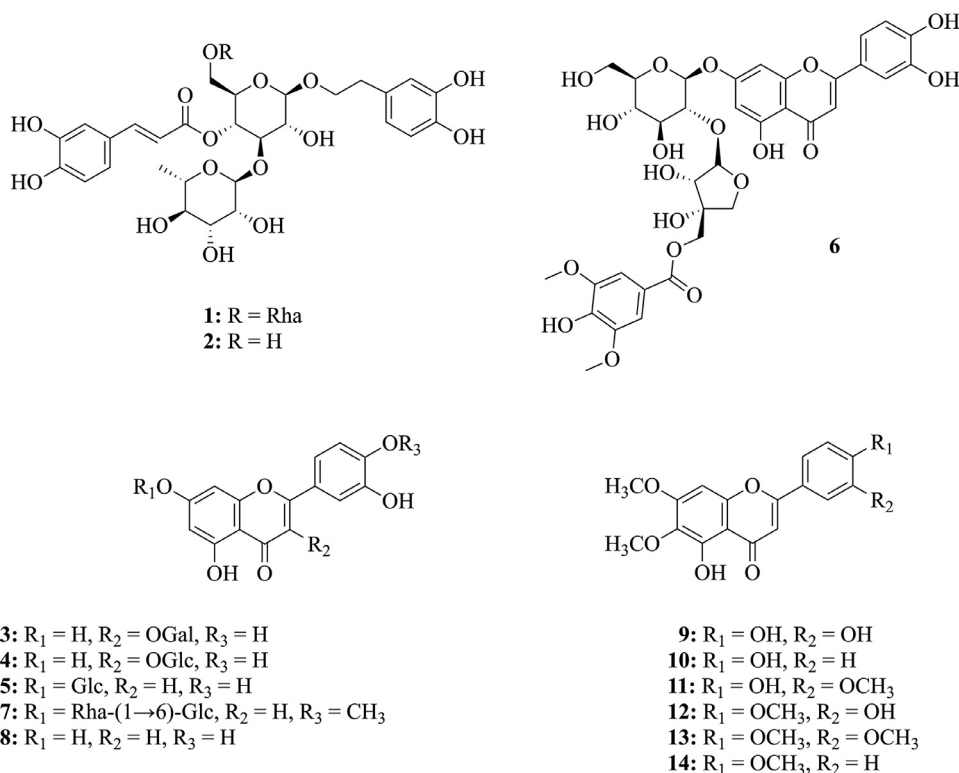


Fig. 1. Structures of the compounds identified in the methanolic extract of *T. polium*.

### 3.2. Acute oral toxicity

Acute oral toxicity was tested in mice at doses of 1000 to 5000 mg/kg b.wt. Even at the highest dose no mortality or specific signs of toxicity were observed after oral administration of the extract. In addition, there were no respiratory, nervous, cutaneous or gastrointestinal symptoms. According to the toxicity scale of Hodge and Sterner (1949) for mice and rats, the extract of *T. polium* can be classified as a “practically nontoxic” substance ( $LD_{50} > 5000$  mg/kg) (Lu, 1992).

As to the biochemical parameters (Table 1), the mice treated with the three doses showed non-significant differences compared to the control group. The extract appeared to be well tolerated, as it did not affect liver parameters and had no effect on transaminase protein levels. The extract did not induce any significant changes in the renal parameters (urea, uric acid and creatinine concentrations) in the treated mice compared to the control group.

The different histological sections of liver and kidney from the treated mice were compared to the section of the normal control (Fig 3). The extract did not induce any changes, and the observations revealed a typical normal kidney and hepatic lobule for all treated mice. Slight dilation of the portal vein was observed with the doses of 2000 and 5000 mg/kg b.wt. While the reasons for this histological peculiarity remain unclear, this should not be considered as a sign of toxicity in the absence of any other abnormalities.

### 3.3. Acute dermal irritation

The animals were observed frequently during the 14 days following the topical application of 0.5 g of OME 5% or OME 10%. No signs of toxicity or mortality were seen. The rabbits were normal and did not show any critical changes in behavior and breathing, or any disability in feeding and water utilization, or postural irregularities and loss of hair. There were no signs of cutaneous irritation, no erythema, eschar, edema, or any other reactions on the skin of all animals after topical application.

### 3.4. Wound healing

#### 3.4.1. Evolution of the wound healing process

During the healing period, the wounds were measured every 4 days. The evolution of the surface of each wound excision was assessed in the treated and untreated animals. The results are presented in Table 2. The photographic documentation of the wound healing process is included as Supplementary Material. All treated animals (CIC, OME 5% and OME 10%) showed very significant and significant reduction in wound area when compared to untreated and PJ groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$ , respectively). There was no significant difference between groups treated with the ointment prepared with the two concentrations (5 and 10%) of the extract and the reference drug Cicatryl-Bio. The OME 10% ointment proved its effectiveness in the healing process with  $92.00 \pm 0.14\%$  of contraction of excision wounds in rabbits, which was better than  $85.25 \pm 0.18\%$  obtained with the reference drug Cicatryl-Bio.

The daily visual observations indicated the presence of signs of inflammation (redness and fever) around the wound in rabbits of the different groups the first days after the excision of the skin. These signs disappeared quickly in the treated groups (CIC, OME 5% and OME 10%) and persisted in the rest of the groups for a few days (UT and PJ).

#### 3.4.2. Histological sections

Histopathological examination was performed at the end of the experiment. Cicatricial zones of rabbits (treated or not treated) were compared to a healthy zone on the same histological cut of the same sample (Fig. 4).

The histological sections showed better healing and complete re-epithelialization in animals treated with the reference drug (Cicatryl-Bio), OME 5% and OME 10% compared to the untreated group and the group treated with petroleum jelly. The healed skin showed normal epithelialization, with thick mature epidermis and granulation tissue, and also higher collagen deposition in treated groups with CIC, OME 5%, and OME 10%.

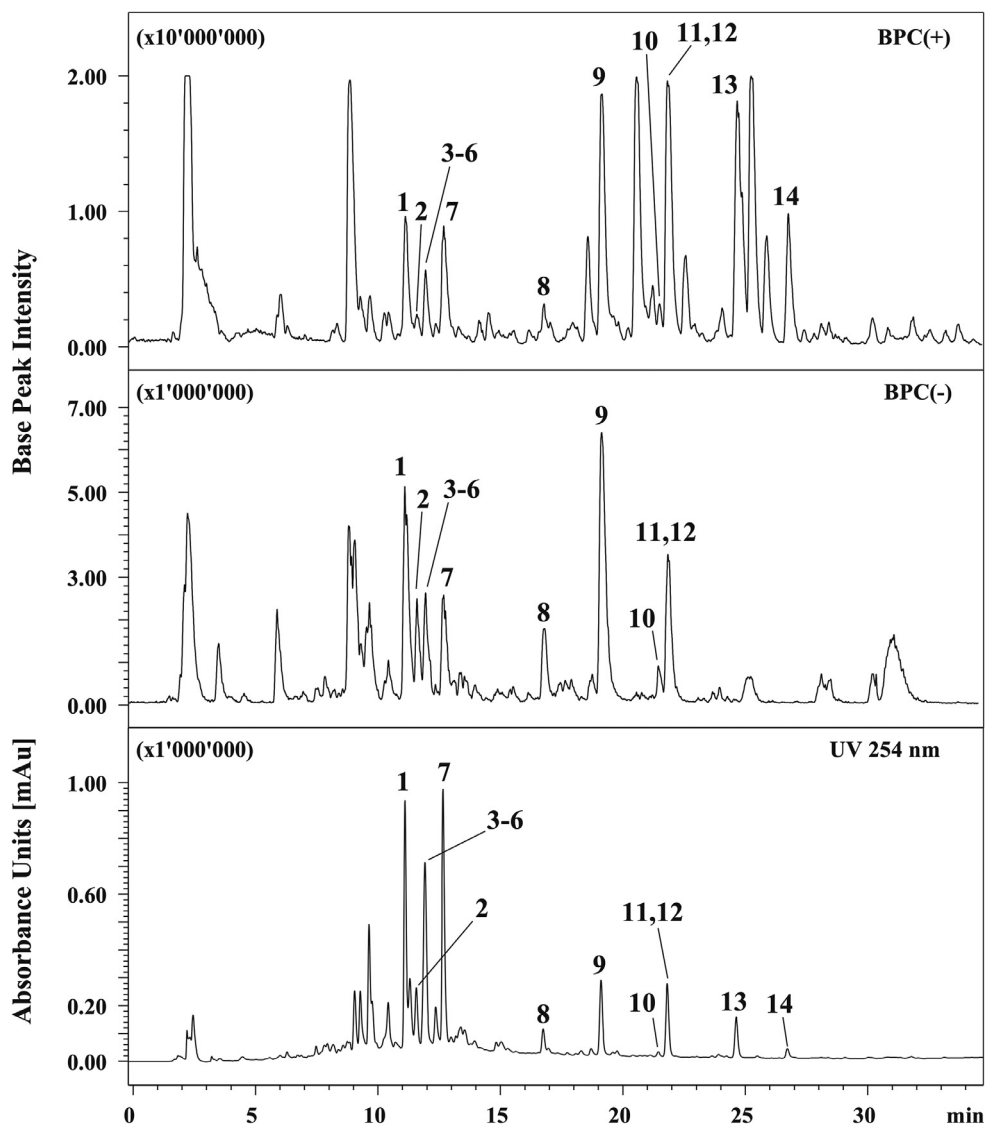


Fig. 2. HPLC-UV-MS analysis of the methanolic extract of *T. polium*. BPC: base peak chromatogram. Peak numbers refer to the identified compounds (Fig. 1).

Table 1

Biochemical parameters of the mice treated with the methanolic extract of *T. polium* at different doses.

Parameters	Treatment (mg/kg b.wt)			
	Control	1000	2000	5000
Urea (mg/l)	0.88 ± 0.02	0.91 ± 0.07	0.92 ± 0.03	0.93 ± 0.01
Creatinine (mg/l)	4.09 ± 0.15	5.43 ± 0.36	4.29 ± 0.47	4.05 ± 0.15
Uric Acid (mg/dl)	41.90 ± 4.49	42.32 ± 3.80	51.89 ± 7.63	25.98 ± 0.74
AST (IU/l)	40.66 ± 3.97	39.16 ± 3.83	43.16 ± 8.77	40.00 ± 2.31
ALT (IU/l)	11.00 ± 0.61	16.00 ± 1.00	15.66 ± 2.55	14.67 ± 1.02
ALP (IU/l)	54.67 ± 3.57	42.83 ± 3.51	53.20 ± 2.94	49.00 ± 1.29
Total Protein (g/dl)	60.00 ± 1.61	70.50 ± 3.43	72.00 ± 1.53	70.60 ± 2.50

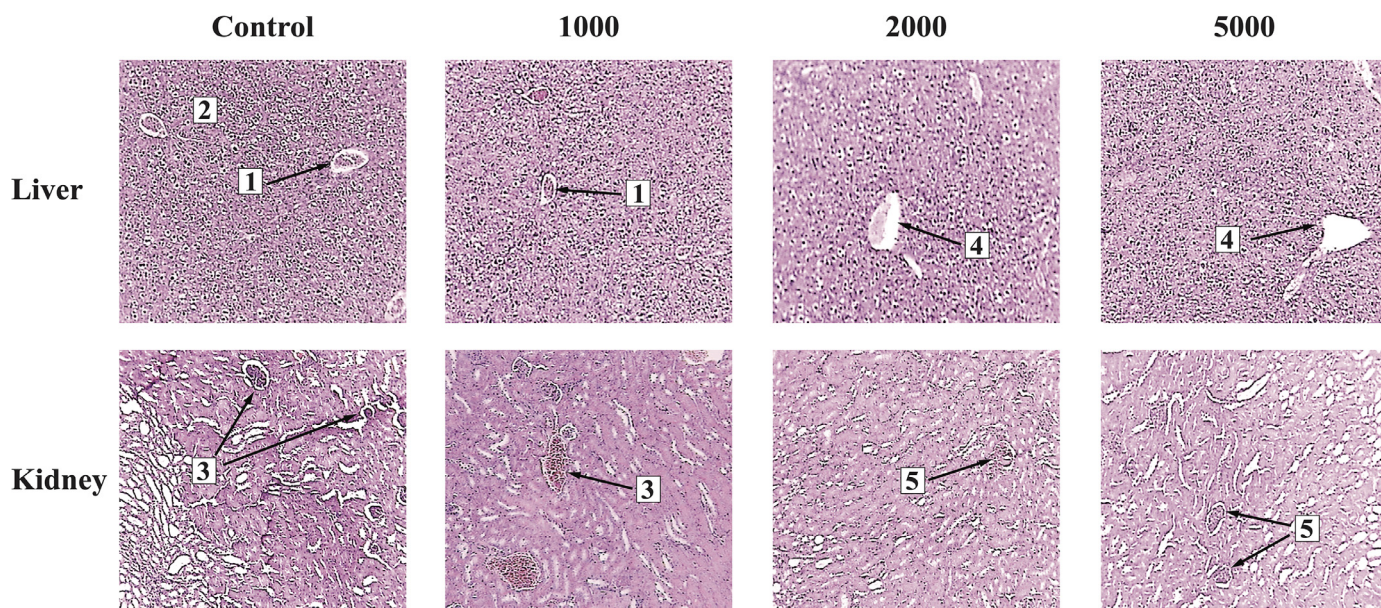
Values are expressed as means ± SEM (n = 3).

The histological sections of the UT and PJ groups showed the presence of fleshy bud with more inflammatory cells, less collagen deposition and incomplete maturation of the dermis or epidermis. This indicates that, despite the contraction of the wound, petroleum jelly does not have therapeutic properties. Indeed, during the healing process, petroleum jelly is capable of inhibiting the evaporation of water from the wound. The formation of a wet physiological environment in the wound promotes skin repair and regeneration of damaged

tissue. However, therapy with petroleum jelly can cause alteration and tissue maceration (Djerrou et al., 2011).

#### 4. Discussion

Acute dermal toxicity corresponds to the adverse effects occurring within a short time of dermal application of a single dose of a test substance (OECD, 2017). Assessment of a single dermal dose toxicity



**Fig. 3.** Histopathological changes in liver and kidney of animals treated with *T. polium* methanolic extract at different doses (magnification x 10). 1: central vein; 2: surrounding hepatocytes; 3: glomerulus; 4: dilation of the portal vein; 5: tubular.

**Table 2**

Effect of different treatments on the evolution of the percentage of excision wound contraction in New Zealand albino rabbits.

Groups	Wound contraction (%)			
	Number of days			
	4	8	12	16
UT	15.73 ± 0.37	23.93 ± 0.24	25.57 ± 0.50	42.62 ± 0.38
CIC	19.87 ± 0.13	29.48 ± 0.28	58.33 ± 0.24**	85.25 ± 0.18***
OME 5%	11.33 ± 0.31	36.33 ± 0.64*	61.33 ± 0.70***	78.00 ± 0.95***
OME 10%	15.63 ± 0.85	38.18 ± 0.64*	81.81 ± 0.47***	92.00 ± 0.14***
PJ	17.91 ± 0.25	26.86 ± 0.17	32.83 ± 0.47*	65.16 ± 0.32**

Values are expressed as mean ± SEM, (n = 4), \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 when treated groups are compared to the UT group. UT: untreated group; CIC: group treated with Cicatryl-Bio; OME 5% / 10%: groups treated with methanolic extract ointment; PJ: group treated with petroleum jelly.

is an important part of any toxicology program for new pharmaceutical or cosmetic products to be applied on the skin (Vinardell and Mitjans, 2008). In our study, no signs of dermal toxicity were observed after application of the *T. polium* ointment. As to the oral acute toxicity, the methanolic extract of *T. polium* did not produce any signs of toxicity in mice even at the highest dose (5000 mg/kg b.wt), and none of the animals died after 14 days of observation. Also, no significant changes were observed in biochemical parameters or histological sections of liver or kidney except a slight dilation of the portal vein. Similar observations have been reported in the study of Meguellati et al. (2019). At the same time, it should be mentioned that hepatotoxic and nephrotoxic effects of *T. polium* have been shown in many case reports and experimental studies where vacuolization, destruction and degeneration of liver and kidney were the most frequently described events (Aktürk Esen et al., 2019; Rafeian-Kopaei and Baradaran, 2013). The absence of toxicity observed in our study may be explained by the relatively short duration of administration (2 weeks). Indeed, the toxic effects of *T. polium* have been related to the dose and duration of use (Bachtarzi et al., 2016; Dağ et al., 2014). Based on our data, short-term treatment with a *T. polium* extract appears safe.

The 5% and 10% ointments (OME 5% and OME 10%) prepared from the methanolic extract of *T. polium* significantly improved the wound healing process after excision in albino rabbits. On histological

examination, the treated groups (Cicatryl-Bio, OME 5%, and OME 10%) showed higher collagen deposition and complete re-epithelialization. The best results were obtained with OME 10%. Cicatryl-Bio contains allantoin as active ingredient. In an open wound model, allantoin was able to ameliorate and accelerate the repair of the skin. The wound healing effect of allantoin occurred via the regulation of inflammatory response and stimulation of fibroblastic proliferation and extracellular matrix synthesis (Araújo et al., 2010). The treatment with the ointment produced a similar effect that the control drug and had a strong impact on the granulation and epithelialization of wounds, accelerated tissue repair and reduced the duration of this process. This may be due to the combined effects of the polyphenolic constituents, mainly flavonoids and caffeic acid derivatives. For example, the flavonoid fraction from *Ginkgo biloba* has been shown to enhance proliferation of normal human skin fibroblasts *in vitro* (Kim et al., 1997). Fibroblasts are responsible for the synthesis of collagen fibers and healing activity. The caffeic acid derivative acteoside (2) has been recently reported to increase the activation of promatrix metalloproteinase-2 and the expression of membrane type-1-matrix metalloproteinase, thereby possibly facilitating a remodeling of extracellular matrices (Si et al., 2018).

Our data confirm results obtained in previous studies performed in other animal models. Meguellati et al. (2019) reported that the treatment with an extract from callus tissue derived from *T. polium*



**Fig. 4.** Histological evaluation of wound skin sections stained with hematoxylin and eosin (10 and 40 x magnification) of various groups (CIC, OEM 5%, OEM 10%, PJ, and UT). UT: untreated group; CIC: group treated with Cicatryl-Bio; OEM 5% / 10%: groups treated with methanolic extract ointment; PJ: group treated with petroleum jelly. 1: thick mature dermis; 2: collagen; 3: granulosa cells; 4: epidermis; 5: fleshy bud; 6: angiogenesis 7: incomplete epidermis.

had a strong impact on the granulation and epithelialization of wounds, accelerated tissue repair, and reduced the duration of wound healing process in an excision wound model in rats. Huseini et al., 2020 found that a 10% *T. polium* ointment accelerated the wound healing process in diabetic rats. Ansari et al. (2013) also demonstrated the effectiveness of a 2% *T. polium* extract with 91.5% of wound contraction against 75.3% for the reference drug silver sulfadiazine cream on experimental second degree burns in mice.

## 5. Conclusion

The 10% ointment obtained from the extract of *T. polium* showed significant wound healing properties in our wound excision model on rabbits, which were superior to those of the reference drug Cicatryl-Bio.

Moreover, acute oral toxicity studies in albino mice, and acute dermal toxicity assessment in albino rabbits indicated that the aerial

parts of *T. polium* are potentially safe over a two-week treatment period corresponding to a typical application time in the therapy of open wounds. Overall, our data confirm the potential of *T. polium* extract for the treatment of wounds and support the traditional use of this plant as a wound healing agent. Further investigations with *in vitro* models such as scratch assays are warranted to identify the active constituents and unravel the mechanism of action. In addition, the potential of *T. polium* for the treatment of other types of wounds such as closed wounds and diabetic ulcer wounds could also be explored.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgments

Prof. M. Hamburger (Division of Pharmaceutical Biology, University of Basel) is acknowledged for providing the infrastructure used for the analytical characterization, and for the critical proofreading of the manuscript.

#### Source of funding

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research through the National Committee for Evaluation and Programming of University Research (DOI10.1016/j.sajb.2020.10.017).

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi: [10.1016/j.sajb.2020.10.017](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.017).

#### References

- Akturk Esen, S., Kahvecioglu, S., Gil, C.B., Aktas, N., Esen, J., 2019. Toxic effects of herbal medicines: *Teucrium polium* and acute kidney injury. *Eur. Research J.* 5, 1028–1030.
- Al Bahtiti, N.H., 2012. " *Teucrium polium* " Extracts Jordanian J. *Asian J. Agricult. Sci.* 4, 379–382.
- Alwahsh, M.A.A., Khairuddean, M., Chong, W.K., 2015. Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. *Records Natural Prod.* 9, 159–163.
- Ansari, R., Sahinfard, N., Namjou, A., Ra eian, M., Shirzad, H., Ra eian-kopaei, M., 2013. Ameliorative property of *Teucrium polium* on second degree burn. *J. HerbMed Pharmacol.* 2, 9–11.
- Araujo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C.F., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M., 2010. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cirurgica Brasileira* 25 (5) doi.org/10.1590/S0102-86502010000500014.
- Bachtarzi, K., Hilmi, S., Laouar, H., Belkheiri, A., Pacha, Y.H., 2016. The chronic toxic effect of *Teucrium polium* aqueous extract on some blood parameters in rat. *Der Pharma Chemica* 8, 384–387.
- Bahramikia, S., Yazdanparast, R., 2012. Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytother. Res.* 26, 1581–1593.
- Basudan, N., Abu-Gabal, N.S., 2018. Phytochemistry and biological properties investigation of *Teucrium polium* L. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 8, 660–670.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M 'Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey. *J. Ethnopharmacol.* 148, 395–402.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 377–399.
- D'Abrosca, B., Pacico, S., Scognamiglio, M., D'Angelo, G., Galasso, S., Monaco, P., Fiorentino, A., 2013. A new acylated flavone glycoside with antioxidant and radical scavenging activities from *Teucrium polium* leaves. *Nat. Prod. Res.* 27, 356–363.
- Dag, M., Ozturk, Z., Aydinli, M., Koruk, I., Kadayifçi, A., 2014. Postpartum hepatotoxicity due to herbal medicine *Teucrium polium*. *Ann. Saudi Med.* 34, 541–543.
- Dehshiri, M.M., Azadbakht, M., 2012. Anatomy of Iranian species *Teucrium polium* (Lamiaceae). *J. Biol. Today's World* 1, 48–52.
- De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Incollingo, F., Raimo, G., Evangelista, G., Iorizzi, M., 2012. Antioxidant activity of phenolic and phenylethanoid glycosides from *Teucrium polium* L. *Food Chem.* 133, 21–28.

- Djerrou, Z., Hamdi-Pacha, Y., Belkhir, A.M., Djaalab, H., Riachi, F., Serakta, M., Boukeloua, A., Maameri, Z., 2011. Evaluation of *Pistacia lentiscus* fatty oil effects on glycemic index, liver functions and kidney functions of New Zealand rabbits. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 8, 214 –219.
- Elmasri, W.A., Hegazy, M.-E.F., Aziz, M., Koksai, E., Amor, W., Mechref, Y., Hamood, A.N., Cordes, D.B., Pare, P.W., 2014. Biomimetic synthesis of iridoid glycosides from *Teucrium polium*. *Phytochemistry* 103, 107 –113.
- Elmasri, W.A., Yang, T., Tran, P., Hegazy, M.-E.F., Hamood, A.N., Mechref, Y., Pare, P.W., 2015. *Teucrium polium* phenylethanol and iridoid glycoside characterization and avonoid inhibition of biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* 78, 2–9.
- Gandhare, B., Kavimani, S., Raj Kapoor, B., 2013. Acute and subacute toxicity study of methanolic extract of *Celastrus pentandra* (Linn.) Gaertn. on rats. *J. Sci. Res.* 5, 315–324.
- Harborne, J.B., Tomas-Barberan, F.A., Williams, C.A., Gil, M.I., 1986. A chemotaxonomic study of flavonoids from European *Teucrium* species. *Phytochemistry* 25, 2811 –2816.
- Huseini, H.F., Abdolghaffari, A.H., Ahwazi, M., Jasemi, E., Yaghoobi, M., Ziaee, M., 2020. Topical application of *Teucrium polium* can improve wound healing in diabetic rats. *Int. J. Low Extrem. Wounds* 19, 132 –138.
- Hussain Mir, A., Sexena, M., Malla, M.Y., 2013. An acute oral toxicity study of methanolic extract from *Tridax procumbens* Sprague Dawley's rats as per OECD guidelines 423. *Asian J. Plant Sci. Res.* 3, 1620.
- Hwisa, N.T., Katakam, P., Chandu, B.R., Abadi, E.G., Shefha, E.M., 2013. Comparative vivo evaluation of three types of honey on topical wound healing activity in rabbits. *J. Appl. Pharmaceut. Sci.* 3, 139–143.
- Jaradat, N.A., 2015. Review of the taxonomy, ethnobotany, phytochemistry, phytotherapy and phytotoxicity of germander plant (*Teucrium polium* L.). *Asian J. Pharmaceut. Clin. Res.* 8, 13–19.
- Kim, S.J., Lim, M.H., Chun, I.K., Won, Y.H., 1997. Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast. *Skin Pharmacol. Physiol.* 10, 200–205.
- Kisiel, W., Stojakowska, A., Piozzi, F., Rosselli, S., 2001. Flavonoids from *Teucrium fruticosum* L. *Acta Soc. Botanicorum Poloniae* 70, 199–201.
- Lu, F.C., 1992. Toxicologie : données Générales, Procédures d'Evaluation, Organes Cibles, Toxicologie : Données Générales, Procédures d'Evaluation, Organes Cibles, Evaluation du Risque. 1st ed. Elsevier Masson, Paris.
- Reck, V., 2010. *Manuel De* –

## Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil

Sarra Chabane , Amel Boudjelal , Edoardo Napoli , Abderrahim Benkhaled & Giuseppe Ruberto

To cite this article: Sarra Chabane , Amel Boudjelal , Edoardo Napoli , Abderrahim Benkhaled & Giuseppe Ruberto (2020): Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil, Journal of Essential Oil Research, DOI: [10.1080/10412905.2020.1842260](https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1842260)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1842260>



Published online: 23 Nov 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

---



## Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil

Sarra Chabane<sup>a</sup>, Amel Boudjelal<sup>b</sup>, Edoardo Napoli<sup>c</sup>, Abderrahim Benkhaled<sup>b</sup> and Giuseppe Ruberto<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Department of Life and Nature Science, Faculty of Science, Mohamed Boudiaf University, M'sila, Algérie; <sup>b</sup>Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Sciences, Université Mohamed Boudiaf, M'sila, Algérie; <sup>c</sup>Istituto di Chimica Biomolecolare, CNR, Catania, Italy

### ABSTRACT

*Teucrium polium* is widely used in Algerian folk medicine as to treat wounds. The aim of this study was to evaluate the chemical composition, antioxidant and wound healing properties of *Teucrium polium* essential oil. The composition was obtained by a combination of GC-FID and GC-MS analyses. The antioxidant activity was evaluated by *in vitro* assays (total antioxidant capacity, DPPH and bleaching of  $\beta$ -carotene). The *in vivo* wound healing potential of an ointment containing 10% of *T. polium* essential oil was investigated. The main components were in this order:  $\beta$ -pinene, germacrene,  $\alpha$ -pinene, myrcene, limonene, bicyclogermacrene, *trans*- $\beta$ -guaiene, spathulenol and  $\beta$ -bourbonene. *Teucrium polium* essential oil displayed a moderate antioxidant activity. The *in vivo* experiments showed that 10% OEO accelerated the wound healing process in comparison with controls. This study provides a scientific rationale for the use of *Teucrium polium* essential oil in the treatments of wounds.

### ARTICLE HISTORY

Received 13 July 2020  
Accepted 21 October 2020

### KEYWORDS

*Teucrium polium*; essential oil; chemical composition; antioxidant; wound healing

## Introduction

Lamiaceae is one of the largest families of flowering plants comprising about 250 genera and over 7,000 species. Most of the plants of this family are aromatic and therefore important source of essential oils (EOs); Lamiaceae are widely used as culinary herbs and reported as medicinal plants in several folk traditions (1). *Teucrium* genus comprising more than 300 species is the largest of the Lamiaceae family in the Mediterranean area (2,3).

Algeria is one of the major countries in Africa with a remarkable floristic richness related to its ecosystem and landscape diversity. The number of taxa of its flora is estimated at about 4000 including 300 endemic taxa of which approximately 90% are present in the north of the country (4). Unfortunately, notwithstanding this large patrimony of Algerian flora, until now, only a few species have been studied.

In Algeria, *Teucrium polium* is represented by 12 subspecies including the most common *T. polium* L. subsp. *polium* and *T. polium* L. subsp. *capitatum* (5,6). The latter is a perennial, pubescent, aromatic plant, 20–50 cm high, white or grey hairs on stems, with green-grayish leaves and white flowers. *T. polium* is widely used in Algerian folk medicine as antidiabetic, antihypertensive and to treat wounds (7). In addition, many biological activities have been ascribed to different extracts of this plant, such as

antioxidant, hepatoprotective, anti-cancer, antimicrobial, antinociceptive, and analgesic activities (3). According to a recent review (8) which analyzed about 270 papers dealing with the chemical composition and the antimicrobial activity of *T. polium* essential oil,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, spathulenol, verbenene,  $\beta$ -myrcene were individuated as the main components. These oils showed a mosquitocidal, repellent and insecticidal activities (9,10), and antimicrobial properties (11,12).

The aim of the present study has been to report the chemical composition of the essential oil *T. polium* subsp. *capitatum* collected in Algeria, and, for the first time to establish the antioxidant and wound healing properties by *in vitro* and *in vivo* studies, as well as the safety of its dermal traditional use.

## Materials and methods

### Plant material

The flowering aerial parts of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* were collected in May 2018, from M'sila (Algeria). The plant was identified and authenticated taxonomically by Sarri D. (Department of Nature Sciences and Life, University of M'sila). A voucher specimen of the plant is deposited in the herbarium (AB-13, 2018) of the same Department.

### Essential oil isolation

One-hundred grams of air-dried aerial parts of the plant were subjected to hydrodistillation using a Clevenger apparatus according to the current European Pharmacopoeia (13) until there was no significant increase in the volume of oil collected (3 h). The oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored under N<sub>2</sub> in a sealed vial until required.

### Essential oil analysis

Gas chromatographic (GC) analyses were run on a Shimadzu gas chromatograph, Model 17-A equipped with a flame ionization detector (FID), and with an operating software Class VP Chromatography Data System version 4.3 (Shimadzu). Analytical conditions: SPB-5 capillary column (15 m x 0.10 mm x 0.15 μm), helium as carrier gas (1 mL/min). Injection in split mode (1:200), injected volume 1 μL (4% essential oil/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v), injector and detector temperature 250 e 280°C, respectively. Linear velocity in column 19 cm/sec. The oven temperature was held at 60°C for 1 minute, then, programmed as reported previously (14). Percentages of compounds were determined from their peak areas in the GC-FID profiles.

Gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was carried out in the fast mode on a Shimadzu GC-MS mod. GCMS-QP5050A, with the same column and the same operative conditions used for analytical GC-FID, operating software GCMS solution version 1.02 (Shimadzu). Ionization voltage 70 eV, electron multiplier 900 V, ion source temperature 180°C. Mass spectra data were acquired in the scan mode in *m/z* range 40–400. The same oil solutions (1 μL) were injected with the split mode (1:96).

### Identification of components of essential oils

The identity of components was based on their GC retention index (relative to C<sub>9</sub>-C<sub>22</sub> *n*-alkanes on the SPB-5column), computer matching of spectral MS data with those from NIST MS libraries (15), the comparison of the fragmentation patterns with those reported in the literature (16) and, whenever possible, co-injections with authentic samples.

### Total antioxidant capacity (TAC) assay

The TAC of *T. polium* EO was evaluated by the phosphomolybdenum method (17). An aliquot of 0.3 mL of the EO was combined with 3 mL of the reagent solution (0.6 M of sulfuric acid, 28 mM of sodium phosphate and

4 mM of ammonium molybdate). The tubes were incubated in a water bath at 95 °C for 90 min. After the samples were cooled at room temperature and the absorbance was measured at 695 nm. The total antioxidant activity was calculated by the following equation:

$$TAC (\%) = \left( \frac{[A_{sample} - A_{control}]}{A_{blank}} \right) \times 100$$

where A<sub>sample</sub> is the absorbance of the sample mixed with the reagent solution, A<sub>control</sub> is the absorbance of deionized water mixed with the sample and A<sub>blank</sub> is the absorbance of the reagent solution mixed with deionized water. The antioxidant activity was expressed in μg of Ascorbic Acid Equivalent per mg of EO (μg AAE/mg EO). All tests were carried out in triplicate.

### DPPH scavenging assay

The free radical scavenging activity of samples was measured (18). Different concentrations of EO were mixed with the freshly prepared 0.1 mM DPPH in methanol. The mixture was left to stand at room temperature in the dark for 30 min and the absorbance was recorded at 517 nm. The ability to scavenge the DPPH radical was calculated using the following equation:

$$DPPH \text{ scavenging capacity } (\%) = \left[ \frac{(A_{blank} - A_{sample})}{A_{blank}} \right] \times 100$$

where A<sub>blank</sub> is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound) and A<sub>sample</sub> is the absorbance of the test compound. The sample concentration providing 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) was calculated by plotting inhibition percentages against concentrations of the sample. BHT was used as the reference compound. All tests were carried out in triplicate.

### β-carotene/linoleic acid assay

The ability of the EO to inhibit the lipid peroxidation has been evaluated using the β-carotene/linoleic acid assay (19). The solution of β-carotene/linoleic acid mixture was prepared by dissolving 0.5 mg of β-carotene in 1 mL of chloroform with 25 μL of linoleic acid and 200 mg of tween 40. After complete evaporation of chloroform, 100 mL of distilled water saturated with oxygen (30 min) was added to the mixture under vigorous stirring. 2.5 mL of the emulsion was added to 350 μL of EO at different concentrations. BHT was used as positive control and the methanol and distilled water as negative control. The absorbance was measured at 490 nm after 24 hours of incubation at room

temperature in the dark. The antioxidant activity (AA%) was calculated, using the following equation:

$$AA\% = (AE / AE_{t_0}) \times 100$$

where AE: Absorbance in the presence of the EO after 24 h and  $AE_{t_0}$ : absorbance in the absence of the EO at 0 h. All measurements were performed in triplicate.

### Animals

New Zealand albino rabbits weighing (1.9–2.1 kg) were purchased from Pasteur Institute of Algiers (Algeria), they were fed *ad libitum* with water and kibble diet. Animal studies have been authorized by the Institutional Ethics Committee (Registration N°: DO1N01UN280120150001) and all procedures were performed according to the International Council for Laboratory Animal Science (20).

Before the experimental procedure, an area on the back of the rabbits was shaved with an electric razor. The animals were left in their cages 24 hours to verify the absence of irritation of the shaved zone (21).

### Preparation of the ointment

The essential oil of *T. polium* was incorporated in petroleum jelly (PJ) (Unilever, France) at a concentration of 10% to obtain the Ointment Essential Oil OEO 10%.

Namely, 10 g of essential oil was blended with 100 g of petroleum jelly previously melted in a water bath. The formulation was manually mixed to obtain a homogeneous mixture. This is a traditional preparation used by local herbalists to treat wounds (7).

Cicatryl-Bio (CIC), an allantoin-based pharmaceutical preparation (Pierre Fabre, Paris, France) was used as a reference drug.

### Acute dermal irritation

The study was conducted according to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines 404 (22). The OEO 10% was applied topically on the back of the animals at an amount of 0.5 g per rabbit. The animals were observed for mortality and any toxic or deleterious effects with special attention given to the first 4 h and then once daily for a period of 14 days following the topical application. At the application sites, the skin was observed for signs of erythema, edema and local injury. The body weight and food intake were also recorded.

### Evaluation of wound healing activity

The rabbits were randomly divided into four groups of four rabbits as follows: the first group was untreated (UT), the second group treated with the reference drug (CIC), the third group with OEO 10% and the fourth group with petroleum jelly (PJ).

Animals were anaesthetized using intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/kg)-xylazine (10 mg/kg) (23). A circle of 2.5 cm in diameter was drawn on the skin of the lumbar region, which was then excised. Excisional wounds were immediately treated, and the animals were placed in individual cages with clean litters. Preparations (CIC, OEO 10% and PJ) were topically applied at an amount of 0.5 g per rabbit once per day for 16 days (24).

The dimensions of excision wounds were measured every 4 days during the trial period by tracing the wounds on a transparent paper and measuring through the graph paper. The percentage of the evolution of wound contraction was calculated using the following formula (25):

$$\% \text{ Wound contraction} = [(Initial \text{ wound size} - \text{Specific day wound size}) / Initial \text{ wound size}] \times 100$$

### Histological section

At the end of the experimentation, the rabbits were sacrificed. The tissue slices were fixed in formalin (10%) for 72 h. The samples were dehydrated by passing them through three successive baths of ethanol. Then, they were thinned in two baths of xylene and embedded in paraffin by two successive baths at 60°C each one. The paraffin blocks obtained were then cut with a microtome, rehydrated and stained with haematoxylin-eosin (26) and examined by Optika B-500 microscope.

### Statistical analysis

The data obtained in the studies were subjected to one way of analysis of variance (ANOVA) for determining the significant difference (GRAPH PAD). The results are presented as means  $\pm$  SD. The inter-group significance was analyzed using the Tukey test and differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## Results

### Extraction yield and chemical composition of essential oils

The hydrodistillation of the aerial parts of *T. polium* subsp. *capitatum* gave an oil with a yield of 0.53%  $\pm$  0.05% (v/w). The chemical composition was determined

by a combination of GC-FID and GC-MS analyses. Table 1 lists the 83 components identified in the oil, which have been subdivided into four classes: monoterpene hydrocarbons (MH), oxygenated monoterpenes (OM), sesquiterpenes (S) and others (O), being the last class representative of not terpenoid components.

*T. polium* subsp. *capitatum* EO was found to be rich in MH (ca. 60% and 11 compounds), S was the second class (ca. 30% of total and 27 compounds), a low content of OM (ca. 6% and 31 compounds), finally the O class with a total amount largely below 1% with 13 compounds.

The main components identified in the EO were in this order:  $\beta$ -pinene (ca. 33%), germacrene D (ca. 17%),  $\beta$ -pinene (ca. 10%), myrcene (ca. 8%), limonene (ca. 7%), bicyclogermacrene (ca. 3%), *trans*- $\beta$ -guaiene (ca. 1.7%), spathunelol (ca. 1.6%) and  $\beta$ -bourbonene (ca. 1.3%). All other compounds comprising also all oxygenated monoterpenes and the other class were below 1%. Figure 1 shows the typical GC profile of this essential oil.

### **In vitro antioxidant activity**

The *in vitro* antiradical activity of *T. polium* essential oil was evaluated by TAC, DPPH and bleaching test of  $\beta$ -carotene.

The experimental results obtained by the total antioxidant capacity test show clearly that the studied essential oil is significantly ( $p \leq 0.001$ ) less powerful antioxidant than the reference standard ( $508.91 \pm 7.56 \mu\text{g EAA/mg}$  and  $417.98 \pm 1.85 \mu\text{g of EAA/mg}$ , respectively).

In the DPPH-free radical method, the essential oil and the BHT depleted the initial DPPH concentration by 50% but at different concentrations. The  $\text{IC}_{50}$  of essential oil in compared with BHT was very significantly low ( $p \leq 0.001$ ) ( $5550.33 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$  and  $14.6 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$ , respectively).

In the case of inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching assay, the antioxidant capacity is determined by inhibiting the formation of the conjugated diene hydroperoxides arising from linoleic acid oxidation. The essential oil was not able to effectively complete inhibit the linoleic acid oxidation, and only  $53.52\% \pm 1.48$  inhibitions were achieved at 2 mg/mL concentrations, which were significantly ( $p \leq 0.001$ ) far below the positive control BHT which showed a value of  $89.10\% \pm 0.55$  at the concentration of 2 mg/mL.

### **Acute dermal irritation**

The animals were divided into the following four groups: untreated group (UT); treated with Cicatryl-Bio group (CIC); 10% essential oil ointment group (OEO 10%);

petroleum jelly group (PJ). They were observed frequently during the 14 days following the topical application of 0.5 g of OEO 10%. No poisonous signs or mortality have been observed. The rabbits did not show any critical changes in behavior and breathing, any disability in feeding and water utilization, or postural irregularities and loss of hair. There were no irritation signs, no erythema, eschar, edema, or any other reactions on the skin of all animals after topical application.

### **Evolution of the healing process of wounds**

During the healing period, and according to a specific interval of time of 4 days, the wounds were regularly measured and photographed. The assessment of the evolution of the surface of each wound excision was performed on the treated and untreated animals; the comparison between the different groups is indicated in Table 2 and Figure 2.

There was a progressive and time-dependent decrease of the wound surface area. All treated animals showed a significant reduction in wound area when compared to the untreated group ( $p < 0.05$ ). A very high significant difference ( $p < 0.001$ ) was observed between all treated groups and the untreated group at the end of the experimentation. The treated group with OEO 10% produced greater wound contraction compared with the other treated groups (CIC and PJ). There was no significant difference between the treated group with the OEO 10% and the group treated with the drug reference Cicatryl regarding the percentage of wound contraction during all the periods of healing.

### **Histological sections**

The results of histopathological examination are showed in Figure 3, which allows comparing cicatricial zones of rabbits (treated or not treated) to a healthy zone on the same histological cut of the same sample.

The histological sections belonging to the untreated and PJ treated groups showed an inflamed dermis, infiltrant epidermal and incomplete epithelization with poorly formed granulation tissue and sparse distribution of collagen fibers and a plenty of inflammatory cells. These observations were in accordance with the wound healing process delay (Figure 3(a,b)). On the contrary, animals topically treated with CIC and OEO 10% showed a better re-epithelization resulting in more regular cell layers and more epidermal ridges with abundant granulation tissue formation and higher collagen content (Figure 3(c,d)). These histopathological observations provided additional evidences of the wound healing activity of OEO-based formulation.

Table 1. Chemical composition of *Teucrium polium* essential oil<sup>a</sup>.

#	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Class/Compounds	%	SD
<b>Monoterpene Hydrocarbons (10)</b>				<b>59.7</b>	<b>0.003</b>
3	930	931	$\alpha$ -Thujene	0.1	0.000
4	939	941	$\alpha$ -Pinene	9.7	0.004
5	954	954	Camphene	0.3	0.000
6	960	959	Thuja-2,4 (9)-diene	0.1	0.000
7	979	987	$\beta$ -Pinene	32.8	0.016
8	990	996	Myrcene	7.8	0.005
9	1017	1020	$\alpha$ -Terpinene	t	0.000
10	1026	1028	<i>o</i> -Cymene	0.1	0.000
11	1029	1036	Limonene	7.3	0.005
12	1037	1041	$\beta$ -Z-Ocimene	0.2	0.000
14	1050	1052	$\beta$ -E-Ocimene	1.1	0.001
18	1088	1091	Terpinolene	0.2	0.005
<b>Oxygenated Monoterpenes 30</b>				<b>6.2</b>	<b>0.007</b>
16	1072	1078	<i>cis</i> -Linalool oxide	t	-
17	1082	1088	Camphenilone	t	-
19	1096	1101	Linalool	0.2	0.005
20	1105	1105	$\beta$ -Fenchocamphorone	0.1	0.006
22	1116	1113	endo-Fenchol	0.1	0.001
23	1126	1127	$\beta$ -Campholenal	t	-
24	1140	1142	Nopinone	0.3	0.001
25	1139	1145	<i>trans</i> -Pinocarveol	0.8	0.006
26	1142	1148	<i>trans</i> -Sabinol	0.1	0.006
27	1143	1151	<i>cis</i> -Sabinol	0.3	0.000
28	1158	1162	Nerol oxide	t	-
29	1164	1167	Pinocarvone	0.6	0.001
30	1169	1172	Borneol	0.2	0.000
31	1177	1182	Terpinen-4-ol	0.1	0.020
32	1188	1189	$\beta$ -Terpineol	t	-
33	1195	1199	Myrtenal	0.8	0.013
34	1195	1201	Myrtenol	0.6	0.016
36	1205	1214	Verbenone	0.1	0.000
37	1216	1224	<i>trans</i> -Carveol	0.1	0.001
38	1229	1233	Nerol	0.2	0.000
39	1241	1245	Cumin aldehyde	0.1	0.001
40	1243	1248	Carvone	0.1	0.000
41	1267	1275	Geranial	t	0.001
42	1271	1279	Perilla aldehyde	0.1	0.001
43	1285	1289	Bornyl acetate	0.3	0.000
44	1290	1296	Thymol	0.4	0.068
45	1298	1303	<i>trans</i> -Pinocarvyl acetate	0.1	0.000
47	1326	1330	Myrtenyl acetate	t	-
51	1361	1368	Neryl acetate	0.1	0.000
52	1381	1383	Geranyl acetate	0.1	0.047
58	1436	1452	Neryl acetone	0.1	0.0
<b>Sesquiterpenes (26)</b>				<b>30.0</b>	<b>0.170</b>
49	1338	1343	$\delta$ -Elemene	0.1	0.001
53	1388	1392	$\beta$ -Bourbonene	1.3	0.004
54	1390	1397	$\beta$ -Elemene	0.1	0.004
56	1420	1426	$\beta$ -Ylangene	0.3	0.000
57	1430	1442	$\beta$ -Copaene	t	-
59	1454	1457	$\alpha$ -Humulene	0.1	0.001
60	1466	1469	<i>allo</i> -Aromadendrane	0.5	0.000
61	1479	1475	$\gamma$ -Muurolene	0.1	0.000
62	1481	1496	Germacrene D	16.6	0.016
63	1489	1498	$\beta$ -Selinene	0.5	0.081
64	1500	1507	Bicyclogermacrene	3.2	0.205
65	1502	1513	<i>trans</i> - $\beta$ -Guaiene	1.7	0.157
66	1502	1517	$\gamma$ -Patchoulene	0.3	0.063
67	1513	1521	$\gamma$ -Cadinene	0.3	0.014
68	1523	1528	$\delta$ -Cadinene	0.5	0.177
69	1538	1540	$\alpha$ -Cadinene	0.1	0.000
70	1561	1566	Germacrene B	0.2	0.008
71	1575	1568	Germacrene D-4-ol	0.2	0.005
72	1578	1588	Spathulenol	1.6	0.006
74	1592	1609	Viridiflorol	0.1	0.004
76	1640	1631	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0.1	0.005
77	1642	1651	<i>epi</i> - $\alpha$ -Muurolol	0.4	0.001
78	1654	1665	$\alpha$ -Cadinol	0.6	0.001
79	1676	1684	Cadalene	t	-
80	1688	1697	Eudesma-4 (14)7-dien-1 $\beta$ -ol	0.2	0.001
81	1700	1704	Eudesm-7 (10)7-en-4-ol	0.6	0.001

(Continued)

Table 1. (Continued).

#	RI <sup>b</sup>	RI <sup>c</sup>	Class/Compounds	%	SD
82		1849	Perhydro farnesyl acetone <sup>d</sup>	0.4	0.001
<b>Others (12)</b>				<b>0.5</b>	<b>0.001</b>
1	855	855	2 <i>E</i> -Hexenal	0.1	0.000
2	902	923	Heptanal	t	-
13	1042	1048	Benzene acetaldehyde	t	-
15	1055	1063	Pentyl iso butanoate	0.1	0.003
21	1112	1110	1-Octen-3-yl acetate	t	-
35	1201	1207	Decanal	t	-
46	1317	1319	3 <i>E</i> -Hexenyl tiglate	t	-
48	1332	1333	Hexyl tiglate	t	-
50	1359	1363	Eugenol	0.1	0.000
55	1400	1410	Tetradecane	t	-
73	1600	1604	Hexadecane	0.1	0.002
75	1612	1620	Tetradecanal	0.1	0.004
83	1900	1866	Nonadecane	t	0.000

<sup>a</sup>The numbering refers to elution order, and values (relative peak area %  $\pm$  SD) represent averages of 3 determinations (t = trace, < 0.05%); <sup>b</sup>Literature Retention Index (RI); <sup>c</sup>Retention index (RI) relative to standard mixture of *n*-alkanes on SPB-5 column; <sup>d</sup>Tentatively identified by MS data only.

## Discussion

The yield (0.53%  $\pm$  0.05, v/w) of *T. polium* belongs to the interval of values reported in the literature ranging between 0.14% and 0.6% (6). Chromatographic data showed that *T. polium* EO is mainly constituted by monoterpene hydrocarbons and characterized by  $\beta$ -pinene (33%) as the most leading component followed by sesquiterpenes with a high amount of germacrene D (17%) and a low content of oxygenated monoterpenes. This profile is more or less similar to those previously reported (5,6,27–29), but very different from other studies reporting the preponderance of sesquiterpenes in the chemical characterization of EOs derived from other ecotypes (Jordan, France, Algeria, Serbia, the Balkans, and Iran) (8). On the basis of a literature survey, many other compounds have also been identified in *T. polium* oil including  $\delta$ -cadinene and  $\alpha$ -cadinol (30), undecane, dodecane, tridecane, lycopersene (9),  $\alpha$ -pinene, verbenol,  $\alpha$ -terpineol (31), spathulenol and epizonaren (11), germacrene D, ocimene,  $\beta$ -pinene (12), limonene and camphor (32).

The difference in the quality or quantity of the composition of volatile oils may be due to genetic, differing chemotype, drying conditions, mode of distillation and/or extraction and geographic or climatic factors (28,31).

Results obtained in this study showed that *T. polium* EO have a moderate antioxidant activity against several charged radicals with the highest efficiency in hydrogen atoms transfer-based (HAT) and mixed-mode electron transfer (ET/HAT) assays and weak efficiency in inhibition of lipid peroxidation. These results were similar to those reported by Mahmoudi and Nosratpour (28) and Bendjabeur et al. (5).

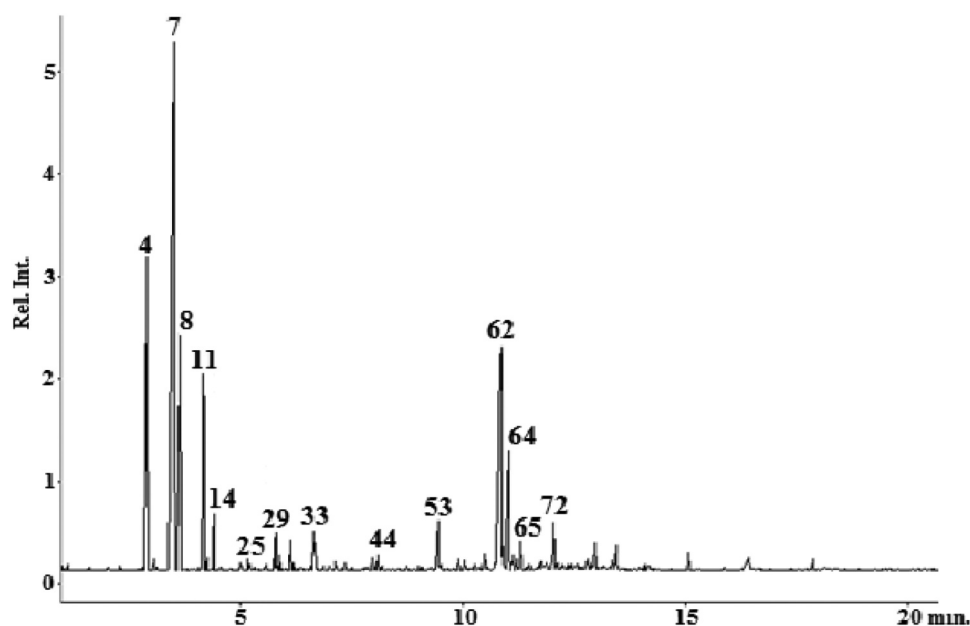


Figure 1. GC profile of *Teucrium polium* essential oil, for the peak numbering, see Table 1.

Table 2. Effect of different treatments on the evolution of the healing process of excision wounds.

Group	Wound contraction (%)			
	Number of days			
	4	8	12	16
UT	15.73 ± 0.07	23.93 ± 0.21	25.57 ± 0.50	42.62 ± 0.48
CIC	19.87 ± 0.23	29.48 ± 0.28	58.33 ± 0.24**	85.25 ± 0.02***
OEO 10%	5.63 ± 0.23	24.03 ± 0.12	62.90 ± 0.28***	89.61 ± 0.17***
PJ	17.91 ± 0.12	26.86 ± 0.21	32.83 ± 0.15*	67.16 ± 0.14**

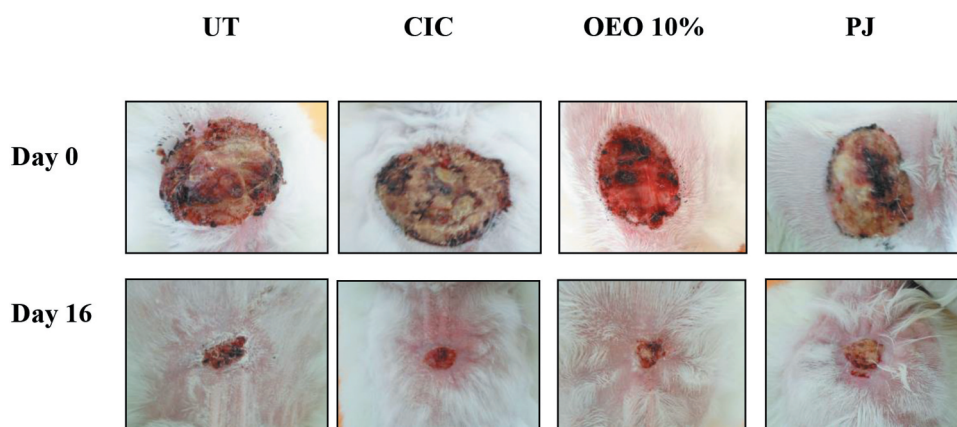
Values are expressed as mean ±SD (n = 4), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 when treated groups are compared to the UT group. UT: untreated group; CIC: group treated with Cicatryl-Bio; OEO 10%: group treated with essential oil ointment; PJ: group treated with petroleum jelly.

Several molecules, among those identified in the essential oil under examination, are endowed with various pharmacological properties such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic effects (33–35).

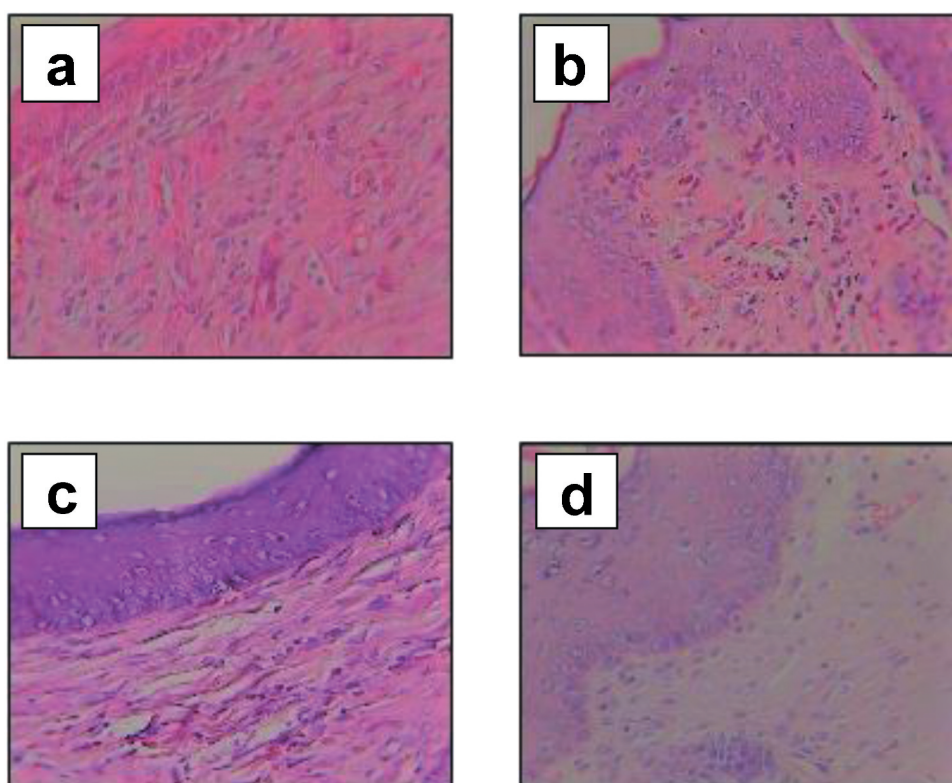
Acute dermal toxicity corresponds to the adverse effects occurring within a short time of dermal application of a single dose of a test substance (36). In our study, no signs of dermal toxicity were observed after the application of the *T. polium* ointment. Based on our data, short-term treatment with EO-based formulation appears safe. The OEO 10% significantly improved the wound healing process after excision in albino rabbits. On histological examination, the treated groups (Cicatryl-Bio, OEO 10%) showed higher collagen deposition and complete re-epithelialization. The best results were obtained with OEO 10%. The treatment with the ointment had a strong impact on the granulation and epithelialization of wounds, accelerated tissue repair and reduced the duration of this process. This may be due to the combined effects of the bioactive constituents, mainly terpenes. The dermal absorption

of EO-based substances, as these terpenes increase the percutaneous absorption of drugs and other compounds due to their lipophilic characteristics. According to Cal and Sopala (37), the maximum concentration of terpenes in the stratum corneum and epidermis was obtained within 15 min of application. This bioavailability of the active molecules stimulates the inflammatory cell production (macrophage type-2) which is a key regulation step of the wound healing process. The anti-inflammatory effect is essential to shorten the healing period as well as to reduce pain and scarring (38).

Our data confirm results obtained in previous studies performed with extracts in other animal models (39), reported that the treatment with an extract from callus tissue derived from *T. polium* had a strong impact on the granulation and epithelialization of wounds, accelerated tissue repair, and reduced the duration of the wound healing process in rats. Ansari *et al.* (40) also demonstrated the effectiveness of a 2% *T. polium* extract with 91.5% of wound contraction against 75.3% for the reference



**Figure 2.** Chronology of excision wound healing in different groups. UT: Untreated group, CIC: Cicatryl-treated group, OEO 10%: ointment essential oil 10%-treated group and PJ: petroleum jelly-treated group.



**Figure 3.** Histological evaluation of wound skin sections stained with hematoxylin and eosin (40 X magnification). **a** and **b**: UT and PJ-treatment, respectively, showing fewer collagen fibers and a plenty of inflammatory cells; **c** and **d**: animals treated with OEO 10% and CIC drug reference, respectively, showing better healing and complete re-epithelialization.

drug silver sulfadiazine cream on experimental second-degree burns in mice.

### Conclusion

Results of this study showed that the 10% ointment obtained from the essential oil of *T. polium* is significantly effective in wound healing and could accelerate

the wound-healing process in the excision model on rabbits. Moreover, acute dermal toxicity assessment in albino rabbits indicated that the ointment essential oil of *T. polium* is potentially safe over a two-week treatment period corresponding to a typical application time in the therapy of wounds. The present study corroborates scientifically the traditional claims of *T. polium* in wound healing.

## Acknowledgments

We wish to thank Mr. Antonio Greco and Ms. Tonia Strano (ICBCNR, Catania), for their skillful technical assistance and Dr. Sarri D. for the plant identification.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

## Funding

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS) [CNEPRU/DO1N01UN280120150001 Project].

## References

1. E. Napoli, L. Siracusa and G. Ruberto, *New tricks for old guys: recent developments in the chemistry, biochemistry, applications and exploitation of selected species from the Lamiaceae family*. *Chemistry & Biodiversity*, **17**(3), e1900677 (2020).
2. T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentin and D.A. Webb, *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge (1972).
3. I. Saleh, A. Abd-El Gawad, A.E.N. El Gendy, A. Abd, E. Aty, T. Mohamed, H. Kassem, F. Aldosri, A. Elshamy and M. E. Hegazy, *Phytotoxic and antimicrobial activities of Teucrium polium and Thymus decussatus essential oils extracted using hydrodistillation and microwave-assisted techniques*. *Plants*, **9** (716), 1–15 (2020). doi:10.3390/plants9060716
4. A. Sassoui, N. Hendel, D. Sarri, M. Maggi, F. Maggi, M. Bruno, D. Romano, A. Canale, R. Pavela and G. Benelli, *Essential oils from three Algerian medicinal plants (Artemisia campestris, Pulicaria arabica, and Saccocalyx satureioides) as new botanical insecticides?* *Environmental Science and Pollution Research*, **27**, 26594–26604 (2020). doi:10.1007/s11356-020-09064-w
5. S. Bendjabeur, O. Benchabane, C. Bensouici, M. Hazzit, A. Baaliouamer and A. Bitam, *Antioxidant and anticholinesterase activity of essential oils and ethanol extracts of Thymus algeriensis and Teucrium polium from Algeria*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **12** (4), 2278–2288 (2018). doi:10.1007/s11694-018-9845-x
6. H. Bendif, M. Lazali, N. Souilah, M.D. Miara, R. Kazernavičiūtė and R. Baranauskienė, *Supercritical CO<sub>2</sub> extracts and essential oils from Teucrium polium L. growing in Algeria: chemical composition and antioxidant activity*. *Journal Essential Oil Research*, **30**(6), 488–497 (2018).
7. A. Boudjelal, C. Henchiri, M. Sari, D. Sarri, N. Hendel, A. Benkhaled and G. Ruberto, *Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): an ethnopharmacology survey*. *Journal of Ethnopharmacology*, **148**, 395–402 (2013). doi:10.1016/j.jep.2013.03.082
8. R. Mahmoudi, M. Kazemini and A. Kaboudari, *Review on composition and antimicrobial effects of Teucrium (Teucrium polium L.) grown in Iran and a comparison with around the world*. *Journal of Babol University of Medical Sciences*, **19**, 54–64 (2017).
9. A. Ebadollahi and E. Taghinezhad, *Modeling and optimization of insecticidal effects of Teucrium polium L. essential oil against red four beetle (Tribolium castaneum Herbst) using response surface methodology*. *Information Processing in Agriculture*, **7**, 286–293 (2020). doi:10.1016/j.inpa.2019.08.004
10. M. Shahriari, N. Sahebzadeh and A. Zibae, *Effect of Teucrium polium L. (Lamiaceae) essential oil and  $\alpha$ -pinene on detoxifying- and intermediary engaged enzymes of Ephestia kuehniella Zeller, 1879 (Lep.: pyralidae)*. *Acta Agriculturae Slovenica*, **113**, 251–261 (2019). doi:10.14720/aas.2019.113.2.6
11. N. Sadrizadeh, S. Khezri, P. Dehghan and R. Mahmoudi, *Antibacterial effect of Teucrium polium essential oil and Lactobacillus casei probiotic on Escherichia coli O157:H7 in Kishk*. *Applied Food Biotechnology*, **5**, 131–140 (2018).
12. N. Fertout-Mouri, A. Latreche, Z. Mehdadi, F. Toumi-Bénali and M.B. Khaled, *Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de Teucrium polium L. du mont de Tessala (Algérie occidentale)*. *Phytothérapie*, **15**, 346–353 (2017). doi:10.1007/s10298-016-1048-1
13. European Pharmacopoeia 8.0, *Determination of essential oils in herbal drugs*, 2.8. 12, 251–252 (2008).
14. F. Baali, S. Boumerfeg, E. Napoli, A. Boudjelal, R. Nadjat, A. Deghima, A. Baghiani and G. Ruberto, *Chemical composition and biological activities of essential oils from two wild medicinal Algerian plants: mentha pulegium L. and Lavandula stoechas L.* *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, **22**, 821–837 (2019). doi:10.1080/0972060X.2019.1642800
15. NIST National Institute of Standard and Technology, *Mass Spectral Library* (1998).
16. R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry*, 4th edn. Allured Publishing Co., Carol Stream, Illinois (2007).
17. P. Prieto, M. Pineda and M. Aguilar, *Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E*. *Analytical Biochemistry*, **269**, 337–341 (1999).
18. B. Tepe, D. Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen and M. Polissiou, *Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)*. *Food Chemistry*, **90**(3), 333–340 (2005). doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.013
19. H. Li, Z. Hao, X. Wang, L. Huang and J. Li, *Antioxidant activities of extracts and fractions from Lysimachia foenum-graecum Hance*. *Bioresources Technology*, **100**, 970–974 (2009). doi:10.1016/j.biortech.2008.07.021
20. International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). <http://iclas.org> (April 2020).
21. N.A. Hwisa, P. Katakam, B.R. Chandu, E.G. Abadi and E. M. Shefha, *Comparative in vivo evaluation of three types of honey on topical wound healing activity in rabbits*. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, **3**, 139–143 (2013).
22. The Organization of Economic Co-Operation and Development (OECD), *Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion*. Guideline for testing of chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris (2015).

23. M. Mashreghi, M.R. Bazaz, N.M. Shahri, A. Asoodeh, M. Mashreghi, M.B. Rasouli and S. Golmoham madzadeh, *Topical effects of frog "Rana ridibunda" skin secretions on wound healing and reduction of wound microbial load*. Journal of Ethnopharmacology, **145**, 793–797 (2013). doi:10.1016/j.jep.2012.12.016
24. M.H. Pipelzadeh, M.R. Pipelzadeh and P. Husseinzadeh, *A study on the effects of modulation of intracellular calcium on excisional wound healing in rabbit*. Iranian Biomedical Journal, **7**, 161–166 (2003).
25. P. Tamri, A. Hemmati and M.G. Boroujerdnia, *Wound healing properties of quince seed mucilage: in vivo evaluation in rabbit full-thickness wound model*. International Journal of Surgery, **12**, 843–847 (2014). doi:10.1016/j.ijssu.2014.06.016
26. V. Marque, *Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologique*. Paris: Elsevier Masson (2010).
27. L. Kerbouche, M. Hazzit, M.A. Ferhat, A. Baaliouamer and M.G. Miguel, *Biological activities of essential oils and ethanol extracts of Teucrium polium subsp. capitatum (L.) Briq. and Origanum floribundum Munby*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, **18**(5), 1197–1208 (2015). doi:10.1080/0972060X.2014.935065
28. R. Mahmoudi and S. Nosratpour, *Teucrium polium L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties*. International Food Research Journal, **20**(4), 1697–1701 (2013).
29. A. Kabouche, Z. Kabouche, A. Ghannadi and S.E. Sajjadi, *Analysis of the essential oil of Teucrium polium ssp. aurasiacum from Algeria*. Journal of Essential Oil Research, **19** (1), 44–46 (2007). doi:10.1080/10412905.2007.9699227
30. H. Nikpour, M. Mousavi and H. Asadollahzadeh, *Qualitative and quantitative analysis of Teucrium polium essential oil components by GC-MS coupled with MCR and PARAFAC methods*. Phytochemical Analysis, **29**, 590–600 (2018). doi:10.1002/pca.2772
31. Y. Maizi, B. Meddah, A.T.T. Meddah and J.A. G. Hernandez, *Seasonal variation in essential oil content, chemical composition and antioxidant activity of Teucrium polium L. growing in Mascara (North West of Algeria)*. Journal of Applied Biotechnology Reports, **6**, 151–157 (2019). doi:10.29252/JABR.06.04.04
32. B. Salehi, S. Upadhyay, I.E. Orhan, A.K. Jugran, S.L. D. Jayaweera, D.A. Dias, F. Sharopov, Y. Taheri, N. Martins, N. Baghalpour, W.C. Cho and J. Sharifi-Rad, *Therapeutic potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene: a miracle gift of Nature*. Biomolecules, **9**(738), 1–35 (2019). doi:10.3390/biom9110738
33. R. Komakech, M.G. Matsabisa and Y. Kang, *The wound healing potential of Aspilia africana (Pers.) C. D. Adams (Asteraceae)*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1–12 (2019). doi:10.1155/2019/7957860
34. N. Primadina, A. Basori and D.S. Perdanakusuma, *Phytochemical screening and gas chromatography-mass spectrometry analysis of bioactive compounds present in karo traditional oil, an Indonesian traditional herbal medicine*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, **13**(2), 204–208 (2020). doi:10.22159/ajpcr.2020.v13i2.36736
35. The Organization of Economic Co-Operation and Development (OECD), *The OECD Guideline for Testing of Acute Dermal Toxicity 402*. OECD, Paris (2017).
36. K. Cal and M. Sopala, *Ex-vivo skin absorption of terpenes from Vicks VapoRub ointment*. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, **14**, 19–23 (2008).
37. I. Tümena, E.K. Akkolc, H. Taştand, I. Süntarc and M. Kurtcab, *Research on the antioxidant, wound healing, and anti-inflammatory activities and the phytochemical composition of maritime pine (Pinus pinaster Ait.)*. Journal of Ethnopharmacology, **211**, 235–246 (2018). doi:10.1016/j.jep.2017.09.009
38. H. Meguellati, S. Ouafi, S. Saad and N. Djemouai, *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 (2019). doi:10.1016/j.sajb.2019.08.023
39. R. Ansari, N. Sahinfard, A. Namjou, M. Rafeian, H. Shirzad and M. Rafeian-Kopaei, *Ameliorative property of Teucrium polium on second degree burn*. Journal of Herbmed Pharmacology, **2**, 9–11 (2013).