



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée



MEMOIRE DE MASTER
Domaine: Sciences de la Nature et de La Vie
Filière: Sciences Biologiques
Option: Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème:

**Contribution à l'étude du potentiel biologique
d'une plante médicinale du genre
*Marrubium***

Présenté par:

ACHOURI Linda

ABBAS Sara

Devant le jury:

Dr. DJABRI Belgacem

MCA Université de Tébessa

Président

Dr. ZEGHIB Assia

MCB Université de Tébessa

Encadratrice

Dr. BOUSSIKINE Samira

MCB Université de Tébessa

Examinatrice

Date de soutenance: 31-05-2016

Note :..... Mention :.....

Résumé

Abstract

ملخص



ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الفعالية المضادة للأكسدة و المضادة للبكتيريا لمستخلصات عضوية لـ *Marrubium vulgare* وهي نبتة طبية تنتمي لعائلة *Lamiacées* المعروفة بإسم "المروبية" وهي منتشرة بكثرة في كل الجزائر. التي تم التحصل عليها بالنقع وذلك باستخدام أربع مذيبات عضوية: البترول الأثيري، ثنائي كلور الميثان، أسيتات الاثيل و الميثانول التي تظهر مردودات 1,4-1-4-7,6% على التوالي. الفحص الكيميائي النباتي للجزء الهوائي يبين وجود مركبات الفلافونويدية، الطينينات الكاتشيكية، الصابونين، التربينات و الستيرولات و الانتوسيانين. المحتوى الكلي من المركبات الفينولية، تم تحديده بكاشف Folin –ciocalteu وقدرت القيم ب 30,3-31,7-34-10,9 µg EAG/mg d'extract في مستخلصات البيترول الأثيري، ثنائي كلور الميثان، أسيتات الاثيل و الميثانول على التوالي. الفعالية المضادة للأكسدة تم تقييمها باستخدام الجذر الحر DPPH الذي يبين أن المستخلص الميثانولي هو الأكثر ضد تأكسدي بنسبة 33,7%. الفعالية المضادة للبكتيريا تم تحديدها حسب طريقة الإنتشار في الجيلوز على كل من *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 أظهر حساسيات مختلفة مع المستخلصات الأربعة لـ *Marrubium vulgare*. بالنسبة لـ *P. aeruginosa* الفغل التثبيطي كان مشابه لي الجنتاميسين و الاميسيلين و السيفتازيديم، و افضل بكثير من تأثير الكولستين. اما بالنسبة لـ *S. aureus* فتأثير الاربع مستخلصات مشابه للتأثير التثبيطي لكل من تيكاسلين و الرفنيسين.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium vulgare*، لمستخلصات عضوية، الفعالية المضادة للأكسدة، الفعالية المضادة للبكتيريا.

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer les activités antioxydante et antibactérienne de *Marrubium vulgare*. C'est une plante médicinale appartenant à la famille des *Lamiacées* cette espèce connue sous le nom de «*Marroubia*». Elle est très répandue dans toute l'Algérie. Les extraits organiques obtenus par macération, en utilisant quatre solvants : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol, présentent des rendements de 1,4- 4- 1- 7,6%, respectivement. Le screening phytochimique de la partie aérienne, montre la présence des flavonoïdes, tannins catéchiques, saponines, terpènes et stérols, et anthocyanes. La teneur totale en composés phénoliques, déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, est de 10,9- 34,0- 31,7 et 30,3 µgEAG/mg d'extrait, dans les extraits éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol, respectivement. L'activité antioxydante évaluée par l'utilisation de la méthode de la réduction du radical libre DPPH, indique que l'extrait méthanolique est le plus antiradicalaire avec un pourcentage d'inhibition de 33,7%. L'activité antibactérienne a été déterminée selon la méthode de diffusion sur gélose, sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui ont présenté des sensibilités différentes vis-à-vis des quatre extraits de *M. vulgare*. L'effet antibactérien de ces extraits vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853, est le même effet inhibiteur que la gentamycine, l'ampicilline et la ceftazidime. Qui est plus meilleur que celui de la colistine, Pour *S. aureus* ATCC 25923, l'antibiogramme montre que les quatre extraits de *M. Vulgare* ont le même effet inhibiteur, que la ticaracilline et rifampicine.

Mots clé : *Marrubium vulgare*, extraits organiques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of *Marrubium vulgare*. Which is medicinal plant belonging to the *Lamiaceae* family this species known as the "Marroubia». It is widespread throughout Algeria. The organic extracts obtained by maceration, using four solvents: petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate and methanol, have yields of 1.4-4-1- 7.6%, respectively. The phytochemical screening Part air shows the presence of flavonoids, tannins catéchique, saponins, terpenes and sterols, and anthocyanins.

The total content of phenolic compounds, determined using the Folin-Ciocalteu, is 10.9-34.0 to 31.7 and 30.3 $\mu\text{gEAG} / \text{mg}$ of extract, in petroleum ether extract, dichloromethane, acetate diethyl and methanol respectively. Antioxidant activity was evaluated by using the method of reducing free radical DPPH, indicates that the methanolic extract is most antiradical with a percent inhibition of 33.7%. The antibacterial activity was determined using the agar diffusion method on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 which presented different sensitivities toward the four extracts. The Antibacterial effect of *M. vulgare* toward the four extracts on *P. aeruginosa* ATCC 27853, is the same inhibitory effect as gentamycin, ampicillin and ceftazidime. Which is better than that of the colistin. For *S. aureus* ATCC 25923, antibiotic sensitivity shows that the four extracts of *M. vulgare* are the same inhibitory effect, that the ticaracilline and rifampicin.

Key words: *Marrubium vulgare*, the organic extracts, the phytochemical screening, the antioxidant activity, antibacterial activity.

Dédicaces

À mes chers parents :

Mon père que Dieu le tout-puissant lui accorde sa sainte miséricorde et l'accueil en son vaste Paradis ;

Ma mère, la femme combattante que sans elle je n'est pas pu être ce que je suis, en reconnaissance de son effort, son amour et son encouragement durant toutes mes années d'études ;

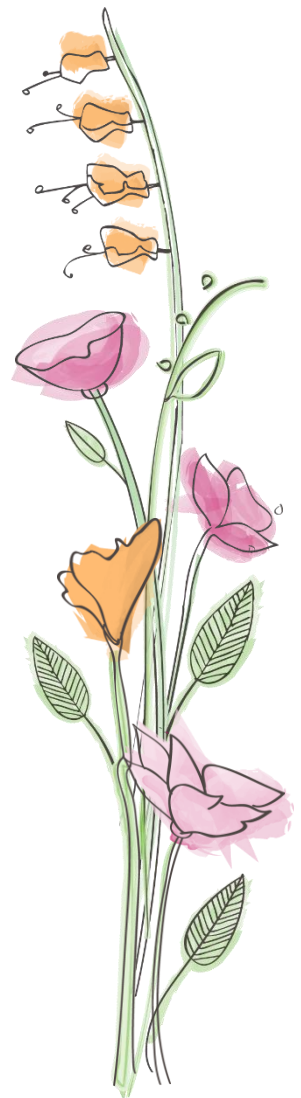
À mes sœurs : Ouafa, Leila, Narimane, Hinda, son enfant et son époux ;

À toute ma famille ;

À mes amis et mes collègues ;

À tous ceux qui aiment la Science.

Linda



Dédicace

Merci Allah de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire " Ya Kayoum".

Je dédie ce modeste travail

À mon père qui n'a cessé de déployer des efforts pour m'épanouir et mener à bien mon chemin de vie ;

À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère ;

Que Dieu les garde et les protège pour moi ;

À mes sœurs ;

À mes frères ;

À toute ma famille ;

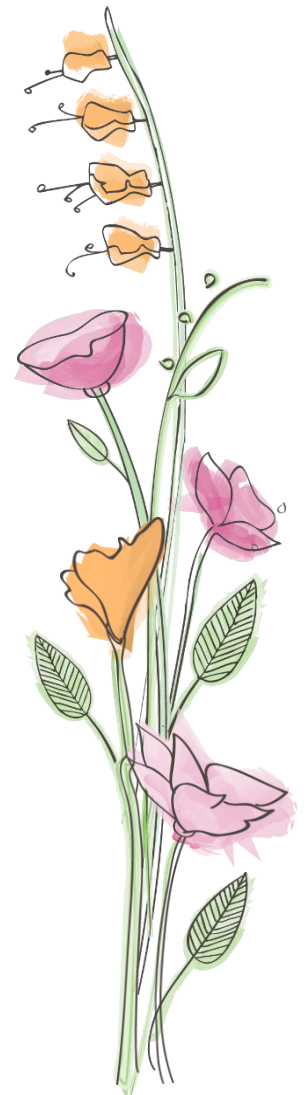
À tous ceux qui me sont chères ;

À tous ceux qui m'aiment ;

À tous ceux que j'aime ;

À ma sœur Linda

À tous mes collègues de Biochimie qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.



Sarra.

REMERCIEMENTS

Nous remercions, du plus profond de notre cœur, Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous remercions, très chaleureusement madame Dr. ZEGHIB Assia notre encadrice

Merci pour votre encadrement efficace, votre disponibilité

Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous m'avaient témoigné tout au long de cette étude. Malgré vos importantes obligations, vous aviez toujours été présent pour recadrer mes recherches dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de cette thèse.

Soyez assurées de ma profonde gratitude.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à notre enseignant Dr. DJABRI Belgacem, pour son intérêt à notre étude, pour nous avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire des molécules bioactives et applications qu'il dirige et pour avoir accepté de présider le jury de notre mémoire de Master.

Grand et respectueux remerciement va à Dr. Boussikine Samira d'avoir accepté d'examiner ce travail. Nous vous remercions surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions.

Mes sincères remerciements s'adressent plus spécialement à monsieur Boussitta sadek et Rabhi salah qui m'aident à la collecte de plante, et ma maman qui me aide durant le rinçage et le séchage de plante

Nous remercions Mme FENGHOUR Hind et Mr MENASRIA Taha pour ces conseils

Nous adressons nos vifs remerciements à tout le personnel de laboratoire de recherche de chimie Organique, spécialement Dr. bouthiba enseignante de chimie et son étudiant de master Bediare hattem

Merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire des Sciences de la Terre, HLAIMIA

Hacène et Ilham pour leurs aides.

Mes sincères remerciements vont également à Dr.hayoun Soraya le botaniste qui nous aide à l'identification botanique

Nous n'oublions pas de remercier vivement les membres de l'équipe des laboratoires de la biologie appliquée, en particulier : Ben Zaim karima, AOUN Souad : Mesbah linda

Mes remerciements vont aussi aux mes collègues de laboratoire de recherche surtout Fradj khouloude,moussauï amelet aussi mes amis de de microbiologie :

Diabe chahra

Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce

Travail.

Un grand merci à tous

Figure	Titres	Pages
Figure 01	Arkogélules Marrube blanc.	10
Figure 02	<i>Marrubium vulgare</i>	18
Figure 03	La carte géographique d'Ouenza	19
Figure 04	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).	27
Figure 05	La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant	28
Figure 06	Protocole de l'activité antibactérienne.	32
Figure 07	Rendements des quatre extraits de <i>M.vulgare</i>	35
Figure 08	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	38
Figure 09	Teneur des polyphénols totaux (en mg EAG/ml d'extrait) des quatre extraits de <i>M. vulgare</i> .	38
Figure 10	Résultats du test CCM-DPPH des 4 extraits de <i>M. vulgare</i>	39
Figure 11	Pourcentage d'inhibition pour l'activité antioxydant du <i>M. Vulgare</i>	40
Figure 12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 sous microscope optique.	42
Figure 13	Effet inhibiteur des quatre extraits de <i>M. vulgare</i> sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 au bout de 24h d'incubation à 37°C.	44
Figure 14	Effet inhibiteur des quatre extraits de <i>M. Vulgare</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 au bout de 24h d'incubation à 37°C.	45
Figure 15	Effet inhibiteur des quatre extraits de <i>M. vulgare</i> sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 au bout de 48h d'incubation à 37°C.	46
Figure 16	Effet inhibiteur des quatre extraits de <i>M. vulgare</i> sur <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 au bout de 5 jours d'incubation à 37°C.	47
Figure 17	Effet inhibiteur des antibiotiques sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	49
Figure 18	Effet inhibiteur des antibiotiques sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Répartition et distribution du genre <i>Marrubium</i> en Algérie	06
Tableau 02	Classification botanique de <i>Marrubium vulgare</i>	06
Tableau 03	Verreries, appareillages, petits matériels, réactifs, solvant et solutés.	20-21
Tableau 04	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition	31
Tableau 05	Les propriétés des extraits obtenus EP, DM, AE et ME	35
Tableau 06	Les résultats expérimentaux de la mise en évidence des métabolites secondaires	36
Tableau 07	Les caractères morphologiques des deux bactéries ATCC	41
Tableau 08	Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) de quatre extraits du <i>Marrubium vulgare</i> pour l'activité antibactérienne	43
Tableau 09	Antibiogramme du <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 aux extraits d'étude, étudiées en présence des différents antibiotiques	50
Tableau 10	Antibiogramme du <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 aux extraits d'étude, étudiées en présence des différents antibiotiques.	50

Abs: Absorbance.

AE: Acétate d'éthyle.

AMI: Amikacine.

AMP: Ampicilline.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATM: Aztreonam.

AUG: Amoxiciline.

CAZ : Ceftazidime 30 µg.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CS : Colistine.

CTX: Ceftaxime.

DM : dichlorométhane.

DPPH : 2, 2-diphényl-1- picrylhydrazyl.

E : Extrait.

E. coli: Escherichia coli.

EP: Ether du petrol.

GNT : Gentamycine.

LDL : Lipoprotéines à basse densité.

M. vulgare: *Marrubium vulgare.*

ME: Methanol.

MH: Muller-Hinton.

PEB : Poids de l'extrait brut.

PMV : Poids de matière végétale.

PP : Photos personnelles.

R : Rendement.

RIF: Rifampicine.

SD: Ecart type.

TC: Ticaracilline.

TCC: Ticaracilline + acide clavulanique.

UV: Ultra-Violet.

µg EAG/mg d'extrait: Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait.

Titre	Page
ملخص	
Abstract	
Résumé	
Dédicaces	
Remerciements	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Abréviations	

<u>Table des matières</u>	
<u>Introduction</u>	
<u>Étude bibliographique</u>	
I. La plante <i>Marrubium vulgare</i>	05
I.1 Famille des lamiacées	05
I.2 Genre Marrubium	05
I.2.1. Aspect botanique	05
I.2.2. Aspect phytochimique	06
I.3 Espèce <i>Marrubium vulgare</i>	06
I.3.1. Classification botanique	06
I.3.2. Description botanique	07
I.3.3. Localisation et répartition	07
I.3.4. Composition chimique	07
I.3.5. Utilisations traditionnelles	08
I.3.6. Utilisations actuelles	09
I.3.6.1. Formes pharmaceutiques et posologies	09
I.3.6.1.1. Gélules	09
I.3.6.1.2. Infusions	10
I.3.6.1.3. Teinture mère	10
I.3.6.1.4. Extrait fluide	10

I.3.7. Contre-indications et effets indésirables	11
I.3.8. Autres usages	11
II. Les composés phénoliques	11
II .1. Définition	11
II.2. Localisation	12
II.3 Les type des polyphénols	12
II.4. Les propriétés biologiques des polyphénols	13
II.4.1. propriété antioxydante	13
II.4.2. Propriété antibactérienne	14
II.4.3. Autres propriétés biologiques des polyphénols	14
II.4.3.1. Polyphénols et cancer	14
II.4.3.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires	15
II.4.3.3. Polyphénols et inflammation	15
II.4.3.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives	15
<u>Matériels et Méthodes</u>	
I. Matériels	18
I.1. Matériel végétal	18
I.1.1. Lieu de collecte	18
I.1.2. Séchage	19
I.2. Verreries, appareillages, petits matériels, réactifs, solvant et solutés	20
I.3. Souches bactériennes ATCC	22
II. Méthodes	22
II.1. Extraction par des solvants de polarité croissante	22
II.1.1. Protocole d'extraction	22
II.1.2. Détermination des rendements des extraits	22
II.2. Screening phytochimique	23
II.2.1. Recherche des quinones	23
II.2.2. Recherche de saponines	24
II.2.3. Recherche des tannins	24
II.2.4. Recherche de Les Stérols et terpènes (réaction de Lieberman-Burchard)	24
II.2.5. Recherche des alcaloïdes	24
II.2.6. Recherche des anthocyanes	24

II.2.7. Recherche leucoantocyane	25
II.2.8. Recherche des cardinolides	25
II.2.9. Recherche des flavonoïdes	25
II.3. Dosage des composés phénoliques	25
1. Principe	25
2. Mode opératoire	26
3. Méthode de calcul	26
II.4. Tests d'activités biologiques	26
II.4.1. Détermination de l'activité antioxydante (test d'activité anti DPPH)	26
1. Le radical stable DPPH	26
2. Test d'activité anti-DPPH par CCM (Chromatographie sur couche mince)	27
3. Estimation du pouvoir anti radicalaire par la méthode au DPPH (Spectrophotométrie UV-visible)	27
3.1. Principe	27
3.2. Mode opératoire	28
3.3. Méthode de calcul	28
II.4.2. Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé)	28
1. Principe	28
2. Bactéries d'étude	29
2.1. Description des bactéries étudiées	29
3. Mode opératoire	30
3.1. Préparation de l'inoculum	30
3.1.1 Enrichissement :	30
3.1.2 Coloration de Gram	30
3.1.3 Préparation de la suspension bactérienne	30
3.2 Test antibactérien	30
II.4.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	32
1. Principe	32
2. Mode opératoire	32
<u>Résultats et discussion</u>	
I. Taux d'humidité.	35

TABLE DES MATIERES

II.	Rendements des extraits	35
III.	Screening phytochimique	36
IV.	Teneur en polyphénols totaux	37
V.	Etude de l'activité anti oxydante	39
	• Test CCM-DPPH	39
	• Activité antiradicalaire contre le DPPH	40
VI.	Etude de l'activité antibactérienne	41
VI.1	La coloration de Gram	41
VI.2	Test de sensibilité aux extraits d'étude	42
VI.3	Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	49
<u>Conclusion</u>		
<u>Références bibliographiques</u>		
<u>Annexe</u>		

Introduction



Introduction

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens, pour guérir certaines pathologies, souvent mortelles, sans savoir à quoi étaient dûes leurs actions bénéfiques. Actuellement, l'ethnopharmacologie s'emploie à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. Sur les 300000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (**Verpoorte, 2002**), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

La recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue, d'ailleurs, un des axes prioritaires de l'industrie pharmaceutique Algérienne. Les médecins et les chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle. Pour notre part, notre choix s'est porté sur le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* qui est une source très riche en tannins et flavonoïdes que l'on rencontre dans les feuilles.

Marrubium vulgare est largement utilisé dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Il est employé par les tradipraticiens contre plusieurs maladies. Des études récentes réalisées chez des animaux, portant sur les principes actifs contenus dans cette plante, ont apporté la preuve que le Marrube blanc peut présenter un intérêt certain dans la prévention du risque cardiovasculaire. Or, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde (environ 30% des décès) et les récentes innovations en matière de thérapeutique médicamenteuse se sont révélées insuffisantes pour faire reculer ce chiffre. De plus, si les propriétés antioxydante, antihypertensives, antimicrobiennes, antihépatoprotectrices et anticancéreuses de *Marrubium vulgare* se confirment chez l'Homme dans les années à venir, cette plante pourrait constituer une alternative de première intention dans la prise en charge des facteurs de risque de maladies graves à l'officine (**Sahpaz et al., 2002**).

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

notre travail en trois parties : Etude bibliographiques, Matériels et Méthodes, Résultat et Discussion et se termine par Conclusion et Perspective.

L'étude bibliographique présente un aperçu, d'une part, sur la plante d'étude (*Marrubium vulgare*) et d'autre part, sur les composés phénoliques.

Dans la partie Matériels et Méthodes, nous décrivons les méthodes utilisés lors du travail expérimental. La troisième partie traite et discute les résultats obtenues concernant l'évaluation des activités antioxydants et antibactérienne du *Marrubium vulgare*.

Étude

Bibliographique



I. La plante *Marrubium vulgare*

I.1. Famille des lamiacées

La famille des *Lamiacées* est composée de près de 258 genres et 6970 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres, à tige quadrangulaire et à inflorescences verticillées. Les feuilles sont généralement opposées ou verticillées, simples ou très rarement pennatiséquées ; il n'y a pas de stipule. Les fleurs sont bisexuées et zygomorphes, les inflorescences sont en cymes bipares puis unipares (par manque de place). Le calice est synsépale, typiquement 5-mère, parfois bilabié et porte 5 à 15 nervures protubérantes. La corolle est sympétale et typiquement bilabiée, avec deux lobes formant une lèvre supérieure et trois lobes formant la lèvre inférieure. L'androcée peut consister soit en quatre étamines didynames, soit en seulement deux étamines soudées au tube de la corolle ou à la zone périgyne et alternant avec les lobes (Quezel et Santa, 1963, Guignard, 2001).

I.2. Genre *Marrubium*

I.2.1. Aspect botanique

Le genre *Marrubium* comporte quelques 40 espèces, répandues principalement le long de la Méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine (Meyre, 2005 ; Rigano, 2006). Le genre *Marrubium* est muni d'un calice à 10 dents, dont les 5 commissurales plus courtes, toutes terminées en pointe épineuse. C'est un arbuste à tiges et face inférieure des feuilles blanches tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aigues. Les fleurs sont blanches. En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomel et *Marrubium deserti de Noé* (Quezel et Santa, 1963).

Tableau 01 : Répartition et distribution du genre *Marrubium* en Algérie (Quezel, 1963).

Espèces	Abondance	Distribution en Algérie	Répartition
<i>M. vulgare</i>	Très commun	Dans toute l'Algérie	Cosmopolite
<i>M. supinum</i>	Rare	Atlas Saharien oranais et Algérois, hauts plateaux Algérois et Oranais	Ibéro-Mauritanien
<i>M. peregrinum</i>	Très rare	Atlas Tellien	Euro-Méditerranéen
<i>M. alysson</i>	Très commun	Partout sauf sur le littoral Algéro-constantinois	Ibéro-Mauritanien
<i>M. alyssoidesn pomel</i>	Rare	Plaines littoral et Atlas Tellien	Endémique
<i>M. deserti de Noé</i>	Commun	Sahara septentrionale et Centrale	Sahara

I.2.2. Aspect phytochimique

Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* (Ashkenazyet *al.*, 1983) au regard des données bibliographiques, ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tannins, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes.

I.3. Espèce *Marrubium vulgare*

I.3.1. Classification botanique

Le tableau 02 ci-après présente la classification botanique de *Marrubium vulgare*.

Tableau 02 : classification botanique Selon Judd *et al.*, (2002).

Règne	Végétale
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>Marrubium vulgare</i> L

I.3.2. Description botanique

Plante herbacée, vivace. Plante à odeur de thym, au froissement toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre (qui irrite les organes du goût et de l'odorat) et amère, couverte d'un duvet blanc, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles. Hauteur de 40 à 60 cm. Feuilles ovales arrondies, souvent un peu cordées à la base, gaufrées et crénelées, feutrées à la face intérieure. C'est une plante à reproduction entomophile. Petites fleurs blanches (12-15 mm de long), corolle à 2 lèvres, l'inférieure trilobée, la supérieure à 2 lobes. Calice à 10 dents courtes, crochues. Placées en verticilles denses à l'aisselle des feuilles supérieures. 4 étamines sont cachées dans le tube de la corolle. Fruits : 4 petits akènes cachés à la base du calice persistant (une des particularités de la Famille des *Lamiacées*) (Schlempher *et al.*, 1996).

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom *Marriouth* (Quezel et Santa, 1963), *Merrîwt* au Maroc (Bellakhdar, 1997), *Marroubia* en Tunisie (Boukef, 1986). En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. Selon (Bonnier, 1909), le Marrube est composé de deux mots hébreux : Mar, rob, suc amer.

I.3.3. Localisation et répartition

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord et presque dans toute l'Europe, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries. Elle est naturalisée dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud (Bonnier, 1909).

C'est une plante qui se cultive facilement, plus particulièrement sur un sol pauvre et sec. Elle nécessite une forte exposition au soleil. La propagation peut se faire par semis au printemps, bouturage ou en divisant les racines (c'est la méthode qui est la plus utilisée). Les feuilles et les sommités fleuries sont récoltées entre Juin et Septembre.

I.3.4. Composition chimique

On y trouve des diterpènes amers de la série des furanolabdanes et surtout des composés de lactones : marrubiine, principalement, et son précurseur préfuranique, la prémarrubiine, mais aussi du pérégrinol, du vulgrol, du marrubénol et du marrubiol. Il y a également des hétérosides flavoniques du quercétol, de la lurtéoline ou de l'apigénine, mais aussi des lactoylflavones et quelques dérivés de l'acide ursolique. En outre, il y a des tannins spécifiques des Lamiacées et

dérivés de l'acide hydroxycinnamique (juste à 7%) (Acides chlorogénique, caféique, caféylquinique, mais absence d'acide rosmarinique). Toutefois, la présence d'une faible quantité d'huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques (moins de 1% : α -pinène, camphène, lomonène) (**Wichtl et Anton, 2003**).

I.3.5. Utilisations traditionnelles

Le marrube blanc est très utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique et antidiabétique. Il est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité. Plusieurs de ces utilisations traditionnelles ont été confirmées par des essais scientifiques (**Masoodi, 2008**).

Dans l'Égypte de la haute Antiquité, le Marrube blanc était déjà reconnu pour ses propriétés apaisantes contre la toux. En médecine ayurvédique (Inde), chez les aborigènes d'Australie et les Amérindiens d'Amérique du Nord, le Marrube servait à traiter les infections des voies respiratoires. (**Novaes et al., 2001**).

John Gerard, herboriste élisabéthain du XVI^e siècle, le recommandait contre les sifflements respiratoires. **Nicholas Culpepper**, médecin herboriste anglais du XVII^e siècle, le disait souverain pour traiter la coqueluche. Jusqu'en 1900, la pharmacopée des États-Unis reconnaissait l'usage du Marrube pour traiter les infections des voies respiratoires. Comme elles sont, désormais, traitées à l'aide d'antibiotiques, cet usage du Marrube est tombé en désuétude, du moins en Amérique du Nord. La Food and Drug Administration (FDA) américaine a interdit l'usage de la plante comme ingrédient dans les remèdes contre la toux en raison de l'absence d'essais cliniques sur les humains. Cependant, en Europe, la plante est toujours inscrite dans les pharmacopées nationales : on y fabrique des sirops et de pastilles qui en renferment. Ces produits se retrouvent, d'ailleurs, sur les étagères des pharmacies et des magasins de produits naturels aux États-Unis et au Canada. Selon la commission allemande, elle est utilisée dans le traitement des dyspepsies et la perte d'appétit. Selon la commission européenne elle est efficace dans le cas de bronchite (**Herrera et al., 2004**).

Selon les populations anciennes, le Marrube aurait une action hypoglycémiante (**Roman et al., 1992 ; Novaes et al., 2001**). Cependant, les résultats d'un essai conduit, récemment, au Mexique sur 43 sujets diabétiques qui résistaient au traitement classique, révèlent que le Marrube n'a pas eu d'effet significatif sur la glycémie (**Herrera et al., 2004**). La prudence

s'impose tout de même pour l'heure. Il n'y a pas eu sur le Marrube d'essais cliniques en double aveugle. Ses usages sont des usages traditionnels bien établis et des études pharmacologiques sur l'animal.

En médecine traditionnelle Tunisienne, on reconnaît au Marrube un certain nombre de propriétés : le décocté préparé à partir de la plante entière est utilisé dans l'hypertension, les hémorroïdes et aussi il est antirhumatismal, analeptique cardiaque, antiseptique pulmonaire. Il est réputé pour purifier le lait des femmes qui allaitent. Il est utilisé en bain de bouche et en usage externe dans le traitement des brûlures (**Boukef, 2006**).

La plante a une arythmie cardiaque : les principes actifs responsables sont l'acide caféique, l'acide chlorogénique mais, aussi, d'autres composants non identifiés (**Vigneau, 1985**). La plante est présentée pour avoir des effets chronotrope négatif, bathmotrope négatif et des propriétés parasympatholytiques (**Duffy et Vita, 2003**)

I.3.6. Utilisations actuelles

Actuellement, l'utilisation de *Marrubium vulgare* L n'est pas très répandue. Il existe, toutefois, quelques spécialités qui peuvent être utilisées dans le traitement de la toux, des affections bronchiques aiguës bénignes et pour faciliter le confort respiratoire. On peut également trouver des conditionnements renfermant des sommités fleuries en vrac afin de réaliser des infusions.

I.3.6.1. Formes pharmaceutiques et posologies

I.3.6.1.1. Gélules

Il s'agit de gélules contenant une poudre de sommité fleurie de *Marrubium vulgare* L. Le dosage est de 290 mg par gélule. La posologie usuelle chez l'adulte est d'une gélule matin, midi et soir à prendre avant le repas avec un grand verre d'eau (**Guier Antony, 2011**)

Spécialités : Arkogélules Marrube blanc[®] (boîte de 45 gélules).

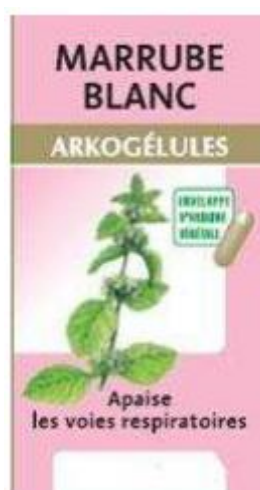


Figure 01 : Arkogélules Marrube blanc (Guiet, 2011).

I.3.6.1.2. Infusions

Les sommités fleuries peuvent être utilisées sous la forme d'infusions. Le principe consiste à verser de l'eau bouillante sur 1 à 2 cuillères à café de sommités fleuries séchées et finement coupées, et à laisser infuser pendant 5 à 15 minutes, avant de filtrer. Il est possible d'en boire une tasse plusieurs fois par jour (Guiet, 2011).

Spécialités : Marrube blanc COOPER® boîte de 30g, Marrube blanc FLORINA® boîte de 100g.

I.3.6.1.3. Teinture mère

La teinture mère de Marrubium vulgare L. peut être utilisée dans les bronchites et dans l'asthme. La posologie habituelle pour un adulte de corpulence moyenne (environ 70 kg) est de 160 gouttes à répartir en deux prises matin et soir avec un grand verre d'eau (Guiet, 2011).

Spécialités : Ferrier Marrubium vulgare® flacon de 125 mL, Lehning Marrubium vulgare® flacon de 30 mL.

I.3.6.1.4. Extrait fluide

L'extrait fluide est principalement utilisé pour réaliser des préparations magistrales. Spécialités : Phytoest Marrube blanc® flacon de 100 mL (Guiet, 2011).

I.3.7. Contre-indications et effets indésirables

On recommande généralement aux femmes enceintes d'éviter le Marrube blanc parce que, selon la Commission Européenne, la plante stimulerait l'utérus et pourrait avoir une action abortive. Selon la même source (Commission Européenne), le Marrube ne possède jusqu'à présent aucun effet indésirable.

Selon les résultats d'essais sur des lapins, le Marrube aurait une action hypoglycémiante. On recommande donc la prudence dans le cas de diabétiques sous médication (Weel *et al.*, 1999).

I.3.8. Autres usages

- insectifuge et comme antidote contre plusieurs poisons.
- Les Grecs de l'Antiquité l'utilisaient contre les morsures de chiens enragés.
- Les feuilles sont utilisées dans des toniques, liqueurs, bières, bonbons.
- Tonique du foie.
- Détruit les vers intestinaux.
- En usage externe et interne contre eczéma et zona.
- L'infusion chaude aide à faire tomber la fièvre, lorsque la quinine est inefficace, elle est proposée contre la malaria.
- Les Navajo administraient une décoction de racine aux mères avant et après l'accouchement.
- Employé pour combattre la cellulite et l'obésité (Dellile, 2007).

II. Les composés phénoliques

II.1. Définition

Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (Bruneton, 1999). La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique, et elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stibène, xanthones, etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans les plantes et dans les aliments d'origine.

II.2. Localisation

À l'échelle de la cellule, les composés phénoliques sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, les polyphénols sont conjugués, avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons (**Bénard, 2009**).

Au niveau tissulaire, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein même des feuilles, la répartition des composés est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Au niveau de la plante entière, il faut noter que certains composés ne sont accumulés que dans des organes bien définis. Chez la pomme par exemple, les composés phénoliques interviennent au niveau de la coloration de la peau via les anthocyanes, et dans la qualité organoleptique de la chair, notamment pour l'amertume ou l'astringence (**Bénard, 2009**).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans le métabolisme de la plante mais, aussi, peuvent réagir dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV). Toutes les catégories de composés phénoliques sont impliquées dans les mécanismes de résistance (**Dicko, et al., 2006**). Ils assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux (**Robert et Catesson, 2000**).

II.3. Type de polyphénols

- **Les flavonoïdes** : Ce sont des substances naturelles présentes dans tout le règne végétal. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer, le cuivre ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène comme la xanthine oxydase (**Lahouel et al., 2006**)

- **Les tannins** : Les tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides.
- **Les coumarines** : Ils sont capables de piéger les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes, importants dans la prévention de la peroxydation des lipides membranaires et ils ont une activité antiperoxydante (**Diallo, 2005**).

II.4 Les propriétés biologiques des polyphénols

II.4.1. Propriété antioxydante

La principale caractéristique des polyphénols c'est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres bon-mauvais, comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (**Akroum, 2010**). L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exercer sur les transporteurs des lipides du sang et tout particulièrement sur le « mauvais » transporteur du cholestérol (les LDL ou les lipoprotéines de faible densité). Les polyphénols empêchent ainsi la formation des LDL oxydés, formation qui prend place lors d'états pathologiques variés caractérisés par un stress oxydatif (**Descheemaeker, 2003**). Ils aident à combattre l'inflammation et réduisent la fragilité des capillaires, ils réduisent les effets du diabète et protègent la peau contre les rayons ultraviolets en diminuant les dommages causés par les rayons solaires (**Spiller, 2007**). De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque des maladies chroniques (**Nève, 2002**).

II.4.2. Propriété antibactérienne

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* sont focalisées pour l'évaluation des propriétés antibactériennes et antifongiques des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. **Moroh *et al.*, (2008)**, ont démontré l'effet antibactérien des extraits acétiques riches en alcaloïdes et en flavonoïdes de *Morinda morindoides*, sur 8 souches d'*Escherichia coli*, germes bactériens rencontrés communément dans la diarrhée des nourrissons et des enfants jusqu'à l'âge de 5 ans.

L'action inhibitrice des flavonoïdes sur la croissance bactérienne, était étudiée par **Katarzyna** et ses collaborateurs (2007). Ils ont démontré que de nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempférol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à gram négatif (*Escherichia coli*) et gram positif (*Staphylococcus aureus*) (**El Ajjouri *et al.*, 2008**).

Le mécanisme d'action des polyphénols sur ces agents pathogènes n'est pas bien connu. Les études exploitées par **Dominico *et al.*, (2005)**, ont mené à conclure que l'effet antimicrobien des produits poly phénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte (fuite) de ses organites intracellulaires, en plus des caractéristiques physico-chimiques des composés poly phénoliques (la solubilité dans l'eau et la lipophilie) peuvent influencer cet effet antibactérien.

II.4.3. Autres propriétés biologiques des polyphénols

II.4.3.1. Polyphénols et cancer

De nombreuses études ont montré que trois types de cancers (sein, prostate et digestif) peuvent être fortement influencés par l'alimentation, notamment, l'apport en lipides et en antioxydants et que l'huile d'argan pourrait grâce à sa teneur en polyphénols, contribuer à la prévention de certains cancers tels que le cancer de la prostate (**Bennani *et al.*, 2009**). Des recherches plus récentes ont décrit les activités anti-cancérogènes de la curcumine, le resvératrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) pour le traitement du cancer du col de l'utérus (**Di Domenico *et al.*, 2012**).

II.4.3.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires (**Visioli et al., 2000 ; Arts et al., 2005**). Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi, en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (**Akroum, 2010**).

II.4.3.3. Polyphénols et inflammation

La plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer. Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques, ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation. De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'Homme sain, ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma, et que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes (**Lenoir, 2011**).

II.4.3.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer représentent un problème croissant lié aux pathologies du vieillissement cérébral, principalement car il y a une augmentation de la prévalence de la maladie d'Alzheimer à la fois et la maladie de Parkinson avec l'âge. Par ailleurs, l'apport alimentaire régulier d'aliments riches en flavonoïdes et / ou de boissons a été associée à une réduction de 50% du risque de démence, une préservation des performances cognitives avec l'âge, un retard dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer et une réduction du risque de développer la maladie de Parkinson. Les flavonoïdes peuvent agir pour protéger le cerveau dans un certain nombre de

façons, y compris par la protection des neurones vulnérables, le renforcement de la fonction neuronale existante ou en stimulant la régénération neuronale (**Vauzour, 2010**).

Matériels et Méthodes



I. Matériel

I.1. Matériel végétal

Le choix de plante a été guidé par une enquête ethnobotanique dans le cadre de la médecine traditionnelle, par la consultation des herboristes, des tradipraticiens (des femmes guérisseuses).

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est une espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées : *Marrubium vulgare* (**Figure 02**). Seule la partie aérienne (tiges et feuilles) a été utilisée puisque à ce niveau sont trouvés la majorité des principes actifs responsables des activités biologiques.



Figure 02 : *Marrubium vulgare* (PP).

I.1.1. Lieu de collecte

Notre plante d'étude a été collectée au mois d'Octobre 2015 dans la région d'Ouenza qui est caractérisée par un climat sec (**Figure 03**).

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département des êtres vivants, Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Larbi Tébessi – Tébessa- par M^{me} Hayoune Soraya (MAA).

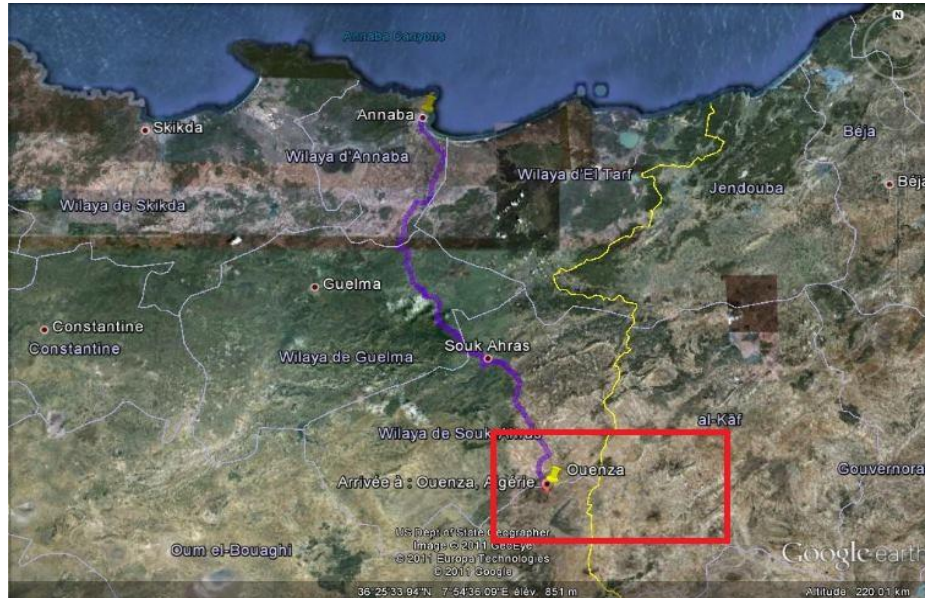


Figure 03: La carte géographique d'Ouenza (Map.com).

I.1.2. Séchage

Après la récolte, le matériel végétal (parties aériennes) a été nettoyé des poussières et des insectes sous l'eau de robinet, puis étalé et séché à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante pendant presque 15 jours. Le taux d'humidité a été déterminé selon l'équation suivante : $(PF-PS) \times 100 / PF$.

PF : poids frais

PS : poids sec

Après séchage, il a été broyé par un broyeur électrique et conservé dans des sacs en papier jusqu'à son utilisation.

I.2. Verrerie, appareillage, petits matériels, réactifs, solvants et solutés

Le tableau ci-après représente tout ce qui nécessaire pour la réalisation de nos expérimentation.

Tableau 03 : Verrerie, appareillage, petits matériels, réactifs, solvants et solutés nécessaire aux expérimentations.

Méthodes	Verreries et autres	Appareillage et petits matériels	Réactifs et solutés Et solvants
Extraction	-Ampoule à décanté 1000 mL -Bécher 500 mL -Entonnoir -Éprouvettes graduées 500 mL -Des flacons en verres -Pisettes -Support pour ampoule à décanter -Papier filtre /coton	-Balance analytique (OHAUS, Scout SE) -Etuve -Sèche-cheveux -Rota-vapeur (BUCHI R210) - Balance de précision (ALS 220.4N)	-Éther de pétrole -Dichlorométhane -Acétate d'éthyle -Méthanol -Éthanol -Eau distillé
Screening phytochimique	-Tube à vis de 16mm D×160mm h -Becher 100 mL -Entonnoir -Portoir -Verre de montre -Pipette en verre 1 – 10 mL -Flacons en verre propre -Embouts bleus	-Plaque chauffante -Balance (OHAUS, Scout SE) -Micropipette 1000 µL -Bain de sable (WiTEG, CATD 78113)	-Les produits chimiques sont cité chacun dans les protocoles.
Dosage des composés phénoliques	-Tubes à hémolyse de 5 mL -Portoir en plastique -Spatule -Éprouvette graduée de 50 mL -Aiguille en inox -Embouts bleus -Pisettes	-Balance de précision (ALS 220.4N) -Vortex (W3.VW.R) -Spectrophotomètre (UV-1700 SHIMADZU) (Laboratoire des Sciences de la Terre).	- Acide gallique - Réactif de Folin-Ciocalteu -Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) - Méthanol - Éthanol -Eau distillée stérile

MATÉRIEL ET MÉTHODES

		-Micropipette 1000µL	
Activité anti bactérienne	-Boîtes de pétri -Éprouvette graduée de 5mL et 20mL -Tube à vis de 16mm D×160mm h -Embouts bleus et jaunes -Anse de platine -Portoir métallique -Erlen Meyer -Pipettes pasteur -Barreaux magnétique -Règle, crayon, écouvillons -Flacons en verre -Entonnoir -Pissettes, les lames	-Bec Benzène -Vortex (W3.VW.R) -Etuve -Bain-marie agitatif (GFL type 1083) -Balance de précision (KERN ALS 220-4N) -Microscope optique (OPTIKA XIOM2000). -Micropipettes : 10- 100µL et 100-1000 µL. -Cocote minute -Lampe UV germicide -Réfrigérateur -Plaque chauffante agitative	- Milieu solide de Mueller-Hinton - Bouillon nutritif - Lugol (1 %) - Bleu de gentiane - Fushine - Éthanol - Eau de javel -Eau distillé stérile -Eau physiologique stérile
Activité anti oxydante	-Vaporisateur -Verre à montre -Flacons en verre -Capillaires -Tubes à hémolyse de 5 mL	-Plaque CCM -Sèche-cheveux -Lampe à UV -Spectrophotomètre UV-1700 SHIMADZU -Vortex	-Ethanol -Méthanol -Eau distillée -DPPH (2,2- diphényl-1- picrylhydrazyle)

I.3. Souches bactériennes ATCC

Les souches bactériennes utilisées sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). L'une a été fournie par le laboratoire de Microbiologie, Université Badji Mokhtar, ANNABA, il s'agit de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et, l'autre, a été gracieusement fournie par monsieur Menasria Taha, laboratoire de Microbiologie, université de Batna, il s'agit de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les deux souches bactériennes ont été conservées à 4 C° dans des tubes à vis contenant de la gélose nutritive inclinée.

II. Méthodes

II.1. Extraction par des solvants de polarité croissante

II.1.1. Protocole d'extraction

La méthode d'extraction employée est la macération continue et successive du matériel végétal par cinq solvants organiques de polarité croissante : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol et eau distillée.

Les filtrats sont évaporés sous pression réduite à l'aide d'un rota-vapeur permettant d'obtenir des résidus, qui ont été récupérés, ultérieurement, dans des flacons de verres et laisser sécher à l'air libre. Nous avons obtenu une série de quatre extraits secs (EP, DM, AE, ME) qui sont pesés afin de déterminer les rendements.

Remarque : Du fait de la contamination du filtrat aqueux (obtenu avec l'eau distillée), l'extrait aqueux est exclu de notre étude.

II.1.2. Détermination des rendements des extraits

La masse de l'extrait est déterminée après évaporation du solvant. Ce qui permet de calculer le rendement correspondant par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Nous avons calculé le rendement de chaque extrait selon la relation suivante :

$$R\% = \frac{PEB}{PMV} \times 100$$

R : Rendement %

PEB : Poids de l'extrait brut (g)

PMV : Poids de la matière végétale (g)

II.2. Screening phytochimique

Un screening phytochimique ayant pour but la mise en évidence des différents métabolites secondaires : saponines, tannins, anthocyanes, leuco-anthocyanes, flavonoïdes, alcaloïdes, terpènes et stérols ainsi que cardinolides, a été réalisé selon des méthodes standardisées de **Bouquet (1972)**, **Solfo (1973)** et **Dohou *et al.* (2003)**.

II.2.1. Recherche des quinones

1. Principe

En présence de Na OH à 10%, les solutions des quinones présentent une caractéristique rouge violet.

2. Mode opératoire

L'ajout du 5 g de matériel végétal et les humecter de quelques gouttes de HCl concentrer. Mettre à macération ce matériel végétal pendant une heure ou 24 heures dans un Erlen Meyer ou un bécher contenant 10 mL d'éther de pétrole. Après filtration, 2 mL de filtrat sont agités avec 2 mL de Na OH à 10%. La coloration rouge virant au violet apparaît en présence des quinones (**Dohou *et al.*, 2003, légèrement modifié**).

II.2.2. Recherche de saponines

1. Principe

Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparaît dans la solution de saponines.

2. Mode opératoire

Cinq g de matériel végétal trituré sont mis dans Erlen Meyer dans lequel on y ajoute 50 mL d'eau distillée pour réaliser une décoction pendant 30 minutes. Après refroidissement, filtrer et prélever 5 mL de décocté et les introduire dans un tube à essai après agitation. L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

Cependant, en cas d'une faible mousse, le décocté est testé avec un mélange à volume égale de H₂ SO₄ 1N et K₂CrO₃ à 10% (chrome de potassium) (Dohou *et al*, 2003).

II.2.3. Recherche des tannins

1. Principe

En présence de chlorure ferrique à 1%, les extraits aqueux tanniques donnent des colorations bleu-vert, bleu-sombre et vertes ou des précipités.

2. Mode opératoire

Cinq g de matériel végétal sont infusés dans 50 mL d'eau bouillante contenue dans un Erlen Meyer pendant 30 minutes ; 2 mL de l'infusé sont prélevés et mis dans un tube à essai auquel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 1%. L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité indique la présence des tannins catéchiques.

II.2.4. Recherche de stérols et terpènes (réaction de Lieberman-Burchard)

Elle se fait sur une macération de 24h à 5% dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec 1 mL de l'anhydride acétique puis 1 mL de chloroforme. Déposer au fond du tube, contenant l'extrait, de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive, il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageant étant verte ou violette (Diallo, 2005).

II.2.5. Recherche des alcaloïdes

Après macération de 5g de feuilles séchées et broyées dans 50 mL d'HCl à 1 %, on filtre la solution obtenue et on lui ajoute quelques gouttes de réactif du Mayer qui donne un précipité blanc, indiquant la présence des alcaloïdes (Bouquet, 1972).

II.2.6. Recherche des anthocyanes

La recherche des anthocyanes repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10 % avec le changement de pH : On ajoute quelques gouttes d'HCl, puis quelques gouttes d'ammoniac (NH₄OH). Le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes (Solfo, 1973).

II.2.7. Recherche des leucoantocyanes

Un volume de 5 mL de l'infusé est mélangé à 4 mL d'alcool chlorhydrique (Éthanol/HCl 3/1). Après chauffage au bain marie à 50°C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco anthocyanes (**Solfo, 1973**).

II.2.8. Recherche des cardinolides

On réalise la macération de la drogue pulvérisée (1g) dans de l'eau distillée (20 mL), pendant 3h. Après filtration du macérât, on prélève 10 mL auxquels on ajoute 10 mL du mélange de la solution (chloroforme (CHCl₃), éthanol (C₂H₅OH)). L'évaporation de la phase organique dans un bain de sable à une température 90°C. Le précipité est ensuite dissout dans 3 mL de l'acide acétique glacial (CH₃COOH). Enfin, on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique (FeCl₃) puis 1 mL d'H₂SO₄ concentré sur les parois de tube. L'apparition d'une couleur verte bleue dans la phase acide indique la présence des cardinolides (**Bouquet, 1972 et Solfo, 1973**).

II.2.9. Recherche des flavonoïdes

La recherche des flavonoïdes débute par une macération de 10g de drogue pulvérisée dans 150 mL d'acide chlorhydrique (HCl 1 %) pendant 24h. Après filtration, on récupère 10 mL du filtrat auquel on ajoute une solution basique de (NH₄OH). Si après 3h, il y a apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube, ceci indique la présence de flavonoïdes (**Bouquet, 1972**).

II.3. Dosage des composés phénoliques

1. Principe

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue, constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés. (**Boizot et Charpentier, 2006**).

2. Mode opératoire

Cette étude a été effectuée sur les quatre extraits (EP, DM, AE, et ME). Un volume de 200 μL des solutions d'extraits (0,5 mg/mL) est ajouté à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Après 4 mn, 800 μL de carbonates de sodium (75 g de Na_2CO_3 dans 1 litre d'eau distillée) sont additionnés. Après agitation, l'ensemble est incubé à l'ombre pendant 2 heures, puis la lecture est faite à 765 nm par un spectrophotomètre UV.

Nous avons réalisé une gamme étalon en milieu aqueux avec un polyphénol témoin, l'acide gallique (00-167 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Répéter les opérations en triplicata pour deux expériences.

3. Méthode de calcul

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0,0095x - 0,0103$). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg d'extrait}$) et selon la moyenne des valeurs obtenues \pm l'écart type (SD).

II.4. Tests d'activités biologiques

II.4.1. Détermination de l'activité antioxydante (test d'activité anti DPPH)

1. Le radical stable DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle est un radical libre de couleur violacée qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517nm. (**Wootton-Beard *et al*, 2011**). Il fût l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (**Osman, 2011 ; Floegel et Kim, 2011**). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Figure 04**). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le radical DPPH reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire (**Popovici *et al.*, 2009**).

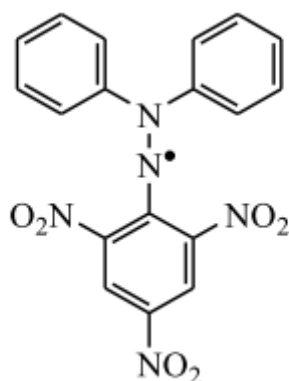


Figure 04 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (Popovici *et al.*, 2009).

2. Test d'activité anti-DPPH par CCM (Chromatographie sur couche mince)

Il s'agit de déposer des extraits (solubilisé dans des solvants appropriés), sur la plaque CCM de gel de silice en aluminium. Après séchage à l'aide d'un séchoir, les plaques CCM sont giclées avec une solution méthanoïque à 2 mg/ml de DPPH. Des activités anti radicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet (Cavin, 1999). Ce test vise à nous guider quel est l'extrait le plus antioxydant pour tester son pouvoir antiradicalaire par spectrophotométrie UV-visible.

3. Estimation du pouvoir anti radicalaire par la méthode au DPPH (Spectrophotométrie UV-visible)

3.1. Principe

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant, peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm, provoquée par la présence des extraits (Wu, 2007). Le DPPH, initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des extraits à piéger ces radicaux libres, indépendamment de toutes activités enzymatiques (Hadbaoui, 2012). Dans ce test, le substrat est un radical stable qui, en réagissant avec une molécule antioxydante, se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) avec perte de son absorbance caractéristique à 517 nm (Figure 05). Les réactions ont lieu à température ambiante et en milieu éthanolique, qui permet une bonne solubilisation de la

plupart des antioxydants. Ce test est très utilisé, car il est rapide, facile et non couteux (Hadbaoui, 2012).

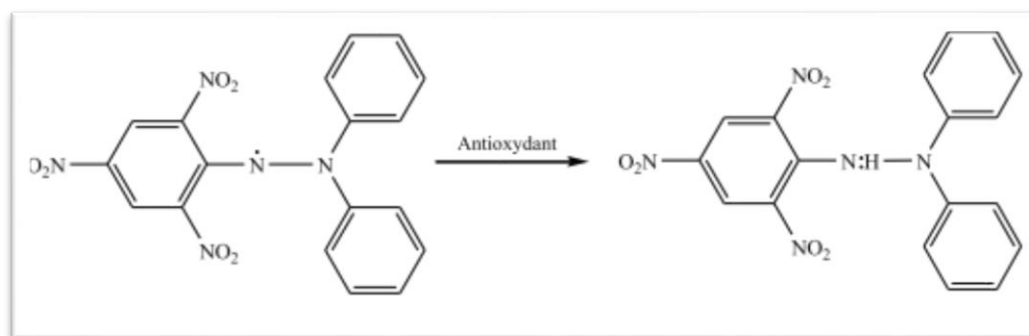


Figure 05 : Réduction du radical DPPH[•] (Hadbaoui, 2012).

3.2. Mode opératoire

Une solution de DPPH a été solubilisée dans le méthanol à (0,0037mg/mL). Dans un tube à essai aux 3mL de DPPH sont ajoutés 100 µL de l'extrait à étudiés (5mg /mL), puis le mélange a subit une agitation pendant 30s à l'aide du vortex. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurés à 517 nm contre le blanc qui est le méthanol pour ajuster le zéro. Le contrôle correspond aux 3mL de DPPH et 100 µL de méthanol. Les résultats sont la moyenne de 2 expériences menées en parallèle, où l'extrait d'étude est testé en duplicata.

3.3. Méthode de calcul

L'évaluation de l'activité antiradicalaire a été faite selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait} / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Abs contrôle : absorbance du contrôle

Abs extrait : absorbance de l'extrait

II.4.2.Détermination de l'activité antibactérienne (diffusion en milieu gélosé)

1. Principe

C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche microbienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits. L'extrait à tester

est placé dans un puits creusé dans le milieu Muller-Hinton préalablement inoculé avec la souche. L'extrait diffuse radialement du puits dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration. Après un temps de latence ou incubation à 37°C, si la molécule est toxique pour l'espèce microbienne, il se forme une zone ou un halo autour du puits. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible. Cette zone claire ou halo montre l'inhibition voire même la destruction du germe et évalue l'efficacité du produit testé (**Perez et al., 1990 ; Nair et Chanda, 2005**).

2. Bactéries d'étude

Nous avons utilisé deux souches bactériennes ATCC (l'American Type Culture Collection) : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.1. Description des bactéries étudiées

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 µm de long et 0.5 à 0.8 µm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire mono triche, ce type de bactéries possède un aspect de « vol moucheron ». *P. aeruginosa* ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3ème rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3ème rang pour les infections urinaires (**Richard et Kiredjian, 1995**).

➤ *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0,8 à 1 µm. Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés et habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (**Patrick et al., 1988**). *S. aureus* est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée (**Steven et al., 2004**).

3. Mode opératoire

3.1. Préparation de l'inoculum

3.1.1. Enrichissement

Cette étape désigne la revivication des souches bactériennes. Elle consiste à mettre 2 ou 3 colonies, à l'aide d'une anse de platine, dans 5mL de bouillon nutritif (25 g de BN dans un litre d'eau distillée stérile) contenus dans un tube à vis puis incubé pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve. Pour chaque bactérie préparer trois tubes à vis.

3.1.2. Coloration de Gram

La pureté des bactéries d'étude a été confirmée par la coloration de Gram. La préparation est recouverte de colorant (bleu de gentiane) et laissée en contact avec ce dernier pendant 1 mn. Après rinçage à l'eau de robinet, la lame est recouverte d'une solution de lugol (1 %) pendant 1 mn, puis décolorée avec de l'éthanol durant 1 mn. Après rinçage à l'eau de robinet, la lame est recolorée par la fushine pendant 1 mn. La préparation est de nouveau lavée à l'eau de robinet, puis séchée entre deux couches de papier buvard, puis elle est finalement recouverte d'une goutte d'huile d'immersion et observée sous microscope optique au grossissement x 100.

- Les microorganismes Gram (+) apparaissent violets.
- Les microorganismes Gram (-) apparaissent roses.

3.1.3. Préparation de la suspension bactérienne

Cinq cent µL ont été prélevés à partir du tube à vis contenant la suspension bactérienne la plus dense et sont ajoutés à 5 mL de l'eau physiologique stérile contenue dans un tube à vis. Homogénéiser la suspension bactérienne par une faible agitation manuelle.

3.2. Test antibactérien

Nous avons trempé un écouvillon dans la suspension bactérienne et nous avons étalé la surface entière de la gélose Mueller Hinton (13mL dans chaque boîte pétri), sous forme de stries serrées. Nous avons tourné la boîte de pétri dans les quatre sens en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, nous avons écouvillonné la bordure de la surface

de la gélose. Par la suite nous avons fait une inondation par l'ajout de 1mL de la suspension bactérienne. Après 15 mn nous avons éliminé l'excès.

Trois puits de 6 mm sont creusés dans chaque boîte pétri à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (partie arrière). 15 μ L de chaque extrait à (10mg/mL) sont déposés dans le puits et laisser diffuser 30 mn à température ambiante. Les boîtes de pétri ont été incubées pendant 24 heures jusqu'à 5jours à 37°C dans l'étuve.

Les essais ont été effectués en triplicata pour chaque extraits, pour deux expériences.

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant, à l'aide d'une règle, le diamètre de la zone d'inhibition qui apparait sous forme d'un halo claire autour des puits (à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée) (**Figure 06**).

Les résultats obtenus sont exprimés en millimètre. Les bactéries ont été classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes : résistance, sensibilité limitée, sensibilité moyenne et très sensible (**Duraffourd et Lapraz, 2002**) comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 04 : Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition (**Duraffourd et Lapraz, 2002**).

Diamètre du halo d'inhibition (X)	Degré de sensibilité des germes	Résultat
$X \leq 8$ mm	Résistante	-
$8 \text{ mm} < X < 14$ mm	Sensibilité limitée	+
$14 \text{ mm} < X < 20$ mm	Sensibilité moyenne	++
$X \geq 20$ mm	Très sensible	+++

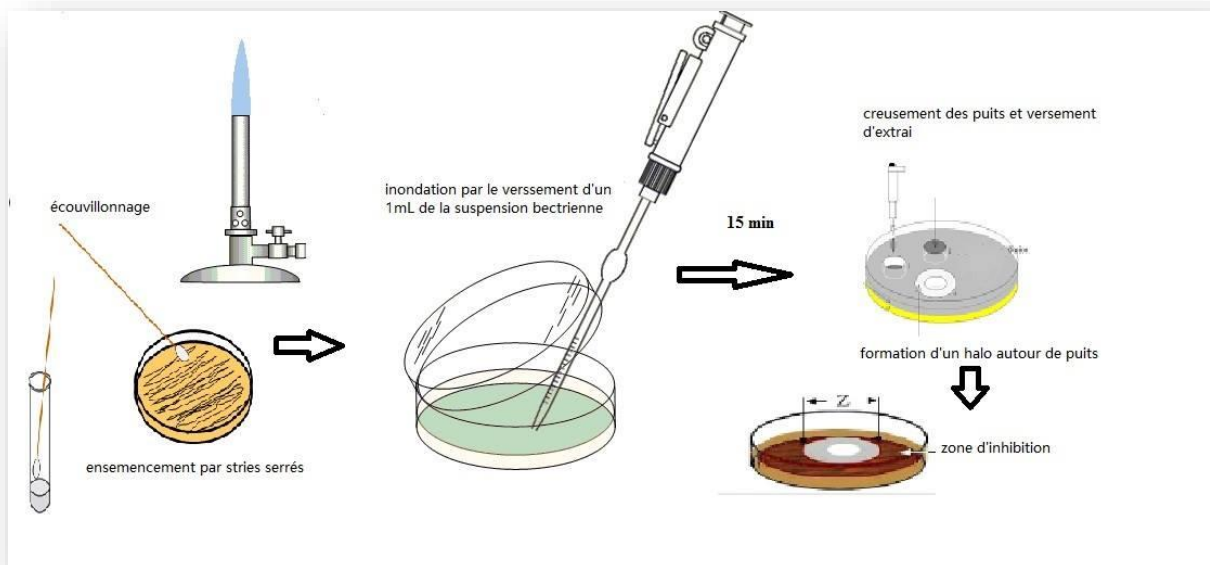


Figure 06 : Protocole de l'activité antibactérienne.

Remarque :

La manipulation de cette activité s'effectue toujours autour d'un bec bunsen, dans des conditions de stérilisation très élevés.

II.4.3. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

1. Principe

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard de souches utilisées et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

2. Mode opératoire

Il consiste à déposer les disques d'antibiotiques dans des boîtes de pétri contenant 13 mL de milieu de MH gélosé, ensemencée avec la bactérie d'étude. Incuber pendant 18-24 h à 37°C dans l'étuve.

Les antibiotiques utilisés pour *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 sont : Ticarcilline + acide clavulanique 85 µg, Ceftazidime 30 µg, Gentamycine 10 µg, Amikacine 30 µg, Colistine 10 µg, Aztreonam 30 µg, Ampicilline 10 µg et Ceftaxime 30 µg.

Les antibiotiques utilisés pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont :

Gentamycine 10 μ g, Amoxicilline 30 μ g, Ticarcilline 75 μ g, Amikacine 30 μ g, Ceftaxime 30 μ g et Rifampicine 5 μ g.

Résultats et Discussion



I. Taux d'humidité

Le taux d'humidité a été déterminé selon l'équation citée dans matériels et méthodes $(PF-PS)/PF \times 100$. Ainsi, *M. vulgare* un taux d'humidité de 39,5%.

II. Rendements, aspects et couleurs

L'extraction de *M.vulgare* par des solvants de polarités croissantes, a permis d'obtenir quatre extraits (E) bruts : l'extrait E.EP, E.DM, E.AE et E.ME. Dont les rendements correspondants sont exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche. Le rendement le plus élevé a été observé avec E.ME (7,6 %), suivi par E.DM (4%), puis E.EP (1,4 %) et en dernier E.AE (1%) (**Figure 07**).

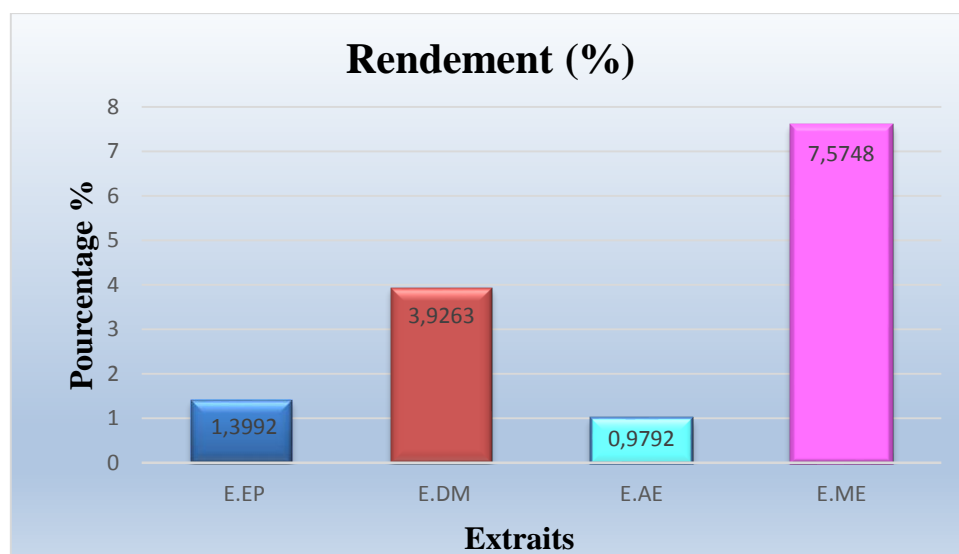


Figure 07: Rendements des quatre extraits de *M.vulgare*.

Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 05 : Aspect et couleur des quatre extraits obtenus de *M.vulgare*.

Extrait	E.EP	E.DM	E.AE	E.ME
Couleur	Vert jaunâtre	Noire	Vert foncé	Marron foncé
Aspect	Cire	Solide	Cire	Cire

Le rendement de l'extrait méthanolique de la présente étude (7,6%) est, d'une part, supérieur à celui (4%) de l'extrait hydrométhanolique obtenu de la macération des sommités fleuries de *M. vulgare* (Berrougui *et al.*, 2006) et, d'autre part, il est inférieure de à celui (16%) de l'extrait aqueux obtenu de la décoction, des sommités fleuries de *M.vulgare* (El Bardai *et al.*, 2001).

Les teneurs en extraits secs varient, non seulement, d'une plante à une autre de la même famille mais, également, en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant. En plus de ces aspects quantitatifs, quelque soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité d'extrait, autrement dit de la bioactivité de ses principes actifs.

III. Screening phytochimique

Les résultats expérimentaux de la mise en évidence des métabolites secondaires de *M.vulgare* sont mentionnés dans le tableau ci-après (Annexe).

Tableau 06: Screening phytochimique.

Métabolites secondaires	Résultat
Les polyphénols	
• les flavonoïdes	++
• les tannins catéchiques	+++
• les tannins galliques	-
• les anthocyanes	+
• les leuco-anthocyanes	-
• les saponines	++
Les alcaloïdes	-
Les terpènes et stérols	++
Les cardinolides	-
Les quinones	-

(+) Présence (-) Absence

Le tableau ci-dessus montre la composition globale de la partie arienne de *M. vulgare* qui renferme cinq composés du métabolisme secondaire : les tannins catéchiques, les flavonoïdes, les saponines, les terpènes et stérols ainsi que les anthocyanes.

Le screening phytochimique réalisé a montré, également, l'absence de quatre principes actifs dont l'importance en phytothérapie est non négligeable tels que les alcaloïdes, les tannins galliques, les cardinolides, les leuco-anthocyanes et les quinones.

Nos résultats sont similaires à une étude effectuée sur les feuilles de marrube blanc (**Djahra, 2010**) qui a suivi le même protocole de screening phytochimique. Une autre étude indique la richesse de cette plante en tannins, coumarines, composés réducteurs, alcaloïdes, terpénoïdes, stérols et des triterpènes dans les infusions/décoctions ainsi que les macérats issus de l'extraction solide / liquide de cette plante (**Bensalah, 2014**).

Les travaux de **Azzi et al., (2014)** ont révélé la présence des tannins, des alcaloïdes, des coumarines, des sucres réducteurs, des flavonoïdes et des saponines. Ce qui est en accord avec les résultats d'**Ashkennazy (1983)** qui a isolé un grand nombre de métabolites secondaires du genre *Marrubium* tels que les flavonoïdes, les diterpènes, les triterpènes et les tannins.

IV. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux des quatre extraits de *M. vulgare*, a été estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique, à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en μg équivalent en acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait). La courbe d'étalonnage est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,996$ (**Figure 07**).

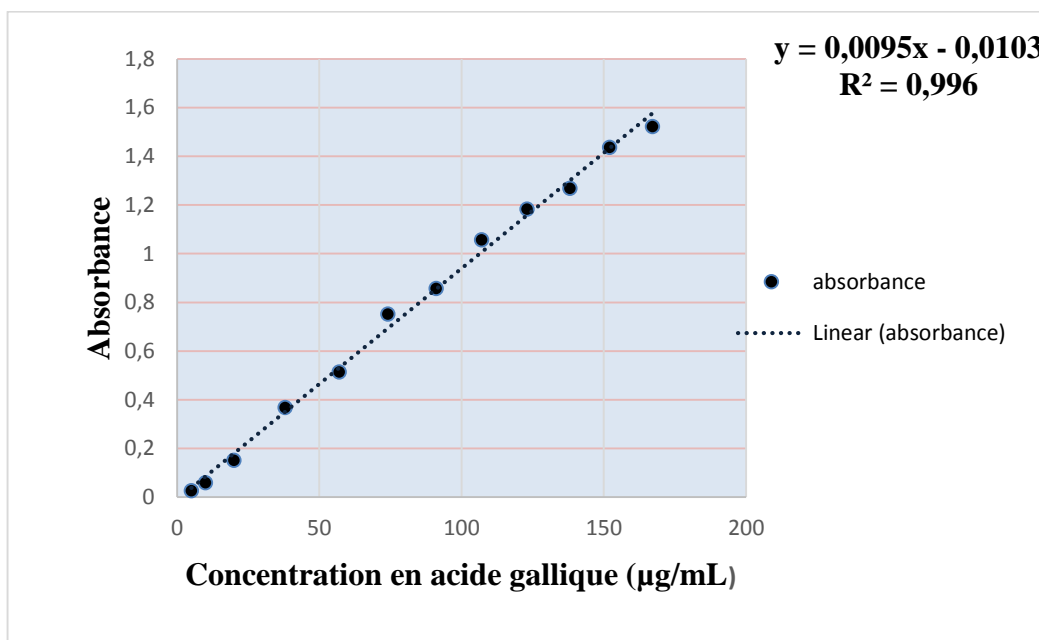


Figure 08 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

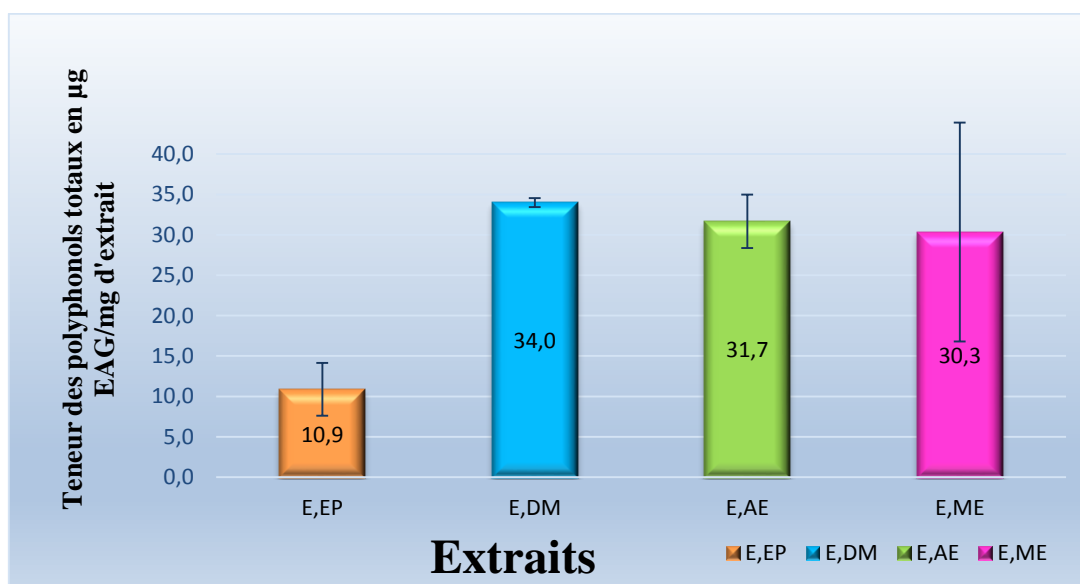


Figure 09 : Teneur des polyphénols totaux (en µgEAG/mg d'extrait) des quatre extraits de *M. vulgare*

Nos résultats montrent que les extraits DM, AE et ME de *M. vulgare* présentent des teneurs proches de composés phénoliques totaux ($34 \pm 0,5$; $31,7 \pm 3,3$; $30,3 \pm 13,5$ µg EAG/mg d'extrait, respectivement). Par comparaison au trois extraits sus-cités, l'extrait EP de *M. vulgare*

présente à peu près le un tiers de leur teneur en polyphénols totaux ($10,9 \pm 3,3 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait).

Pour ce qui est de la teneur en polyphénols du *M. vulgare*, des résultats différents ont été obtenus à partir d'organes végétatifs de la même espèce. Un taux de 18, 21 mg EAG/mL d'extrait a été avancé par **Boudjelal (2012)**. Une teneur extrêmement importante en composés phénoliques totaux de *M. vulgare* a été notée lors d'une étude menée par **Matkowski et Piotrowska (2006)**. Cette variabilité dans les résultats pourrait être liée aux conditions climatiques du biotope de l'espèce ou aux différentes méthodes suivies lors de l'extraction.

Toutefois, les résultats du dosage des composés phénoliques, n'indiquent pas les valeurs exactes des teneurs en polyphénols puisque, malgré sa grande sensibilité, la méthode de Folin-Ciocalteu peut présenter des problèmes d'interférence. En effet, le réactif Folin-Ciocalteu peut réagir avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane), les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (**Vuorela, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006 ; Gomez-Caravaca et al., 2006 ; Tawaha et al., 2007**).

V. Etude de l'activité anti oxydante

- Test CCM-DPPH

Les résultats des deux tests CCM-DPPH sont illustrés dans la figure ci-après.

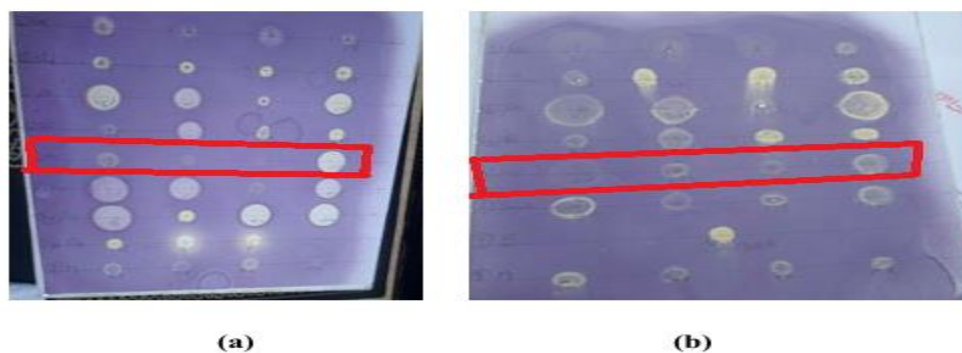


Figure 10 : Résultats du test CCM-DPPH des 4 extraits de *M. vulgare*.

(a) : Concentration d'extraits et de spots non déterminés. **(b)** : Concentration de (1mg/mL) d'extrait et spots de 250 μL .

Dans le test préliminaire, où les concentrations d'extraits et de spots sont non déterminés, nos résultats montrent que les extraits à potentiel antioxydant sont, par ordre décroissant : ME > EP > DM > AE, les deux derniers ont été non actifs. Quant au deuxième test, où les quatre extraits d'étude sont à une concentration de (1mg/mL) et déposés sur CCM à un volume spot de 250 μ L, révèle que seuls les extraits ME et DM présentent un potentiel antioxydant. Ainsi, nous avons déterminé l'activité antiradicalaire contre le DPPH de ces deux extraits (ME et DM), par i UV-Visible.

- **Activité antiradicalaire contre le DPPH**

A une concentration de solution mère de 5 mg/mL, les extraits DM et ME de *M.vulgare* présentent des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH de 8,5 % \pm 0,9 et 33,7% \pm 1,7, respectivement (**Figure 11**).

Ainsi, l'extrait ME est 4 fois plus actif que l'extrait DM mais sans atteindre un pourcentage d'inhibition de 50%, à la concentration-test prise dans la présente étude.

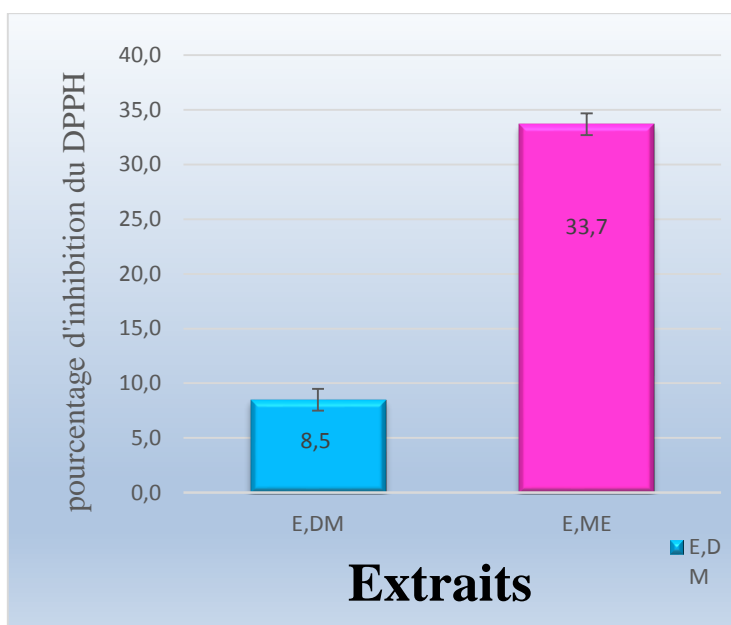


Figure 11 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par les extraits DM et ME de *M.vulgare*.

Nos résultats sont en concordance avec ceux de **Djahara (2010)** et **Boudjellal (2012)** qui ont montré que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* présentait une activité antioxydante élevée. Contrairement, les travaux réalisés par **Orhan et al., (2010)**, affirment que l'extrait méthanolique est moins actif que l'extrait acétonique de *M. vulgare*.

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (**Javanovic et al., 1994**). L'effet scavenger des flavonoïdes, est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libres, par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle (**Siddhuraju et Becker, 2007**). En outre, dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables sur l'effet antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable. De plus, **Amič et al. (2003)** ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

VI. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des quatre extraits de *M. vulgare*, a été testée vis-à-vis de deux souches bactériennes, via la méthode de diffusion sur gélose.

VI.1 La coloration de Gram

La pureté des bactéries qui ont servi pour ces expériences, a été vérifiée par la coloration de Gram. Leurs caractères morphologiques sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 07: Caractères morphologiques des deux bactéries utilisées comme germes-tests.

Nom des bactéries	Morphologie	Couleur	Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacille	Rose	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci	Violet	+

Selon les résultats obtenus, les deux bactéries-test sont pures et ne présentent ni mutation, ni contamination. *P. aeruginosa* ATCC 27853 est bacille Gram négatif, alors que *S. aureus* ATCC 25923 est cocci Gram positif (**Figure 12**).

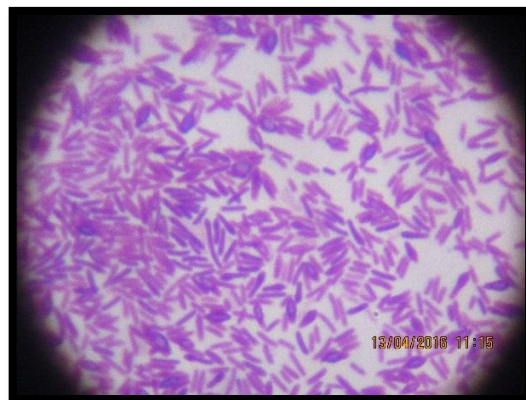


Figure 12 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sous microscope optique (PP).

La purté de *S. aureus* a été confirmé par Monsieurs Menasriya Taha.

VI.2 Test de sensibilité aux extraits d'étude

Les résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des quatre extraits de *M. vulgare*, sont représentés dans **Tableau 08**.

La lecture des résultats se fait normalement après 18 à 24 h d'incubation à 37°C. Ainsi, pour les deux bacteries tests, nous présentons les résultats d'expérimentations dont les résultats sont lus après 24 h. Dans le but de confirmer nos résultats, une deuxième experimentations dans les mêmes conditions opératoires doit être réalisée. Or, au bout de 24h d'incubation à 37°C, aucune zone d'inhibition n'est apparue pour les extraits d'étude. Pour cela, les boites de pétris sont laissées incube encore (48h) et suivre l'apparition des zones d'inhibition au terme de cette période (Essai 2 pour *P. aeruginosa*). L'essai 3 pour *P. aeruginosa*, réalisé aussi pour confirmation de l'essai 1 dans les mêmes conditions opératoires, ne présentait aucune zone d'inhibition au bout de 24h. Par inattention, les boites de petris sont oubliées dans l'étuve et après

une période de 5 jours , et par surprise, des zones d'inhibition importantes sont bien formées autour des puits (Essai 3 pour *P. aeruginosa*).

Pour *S. aureus*, un seul essai a été réalisé et ce par manque de milieu de Muller-Hinton (MH).

Tableau 08 : Détermination du diamètre de la zone d'inhibition (mm) des extraits de *M.vulgare*

	Essai	E.EP	E.DM	E.AE	E.ME
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Essai 01 (24 h)	15,7 ± 0,8 (++)	15,2 ± 1 (++)	17,9 ± 0,8 (++)	18,4 ± 1,9 (++)
	Essai 02 (48h)	28,2 ± 2,4 (+++)	31,9 ± 0,4 (+++)	18,8 ± 3 (++)	27,7 ± 2,6 (+++)
	Essai 03 (5j)	32,6 ± 7,6 (+++)	38,2 ± 6 (+++)	24,10 ± 2,6 (+++)	27,3 ± 2.0 (+++)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Essai 02 (24 h)	13,2 ± 0,2 (+)	11,90 ± 0,5 (+)	12,4 ± 0,1 (+)	13,1 ± 0,2 (+)

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ;(+++) haute sensibilité

Au terme de 24 h d'incubation à 37°C, *P. aeruginosa* ATCC 27853 présente une sensibilité moyenne vis-à-vis des quatre extraits de *M. Vulgare*, alors que *S. aureus* ATCC 25923 présente une sensibilités limités vis-à-vis des même types d'extraits (**Figure 13 et 14**).

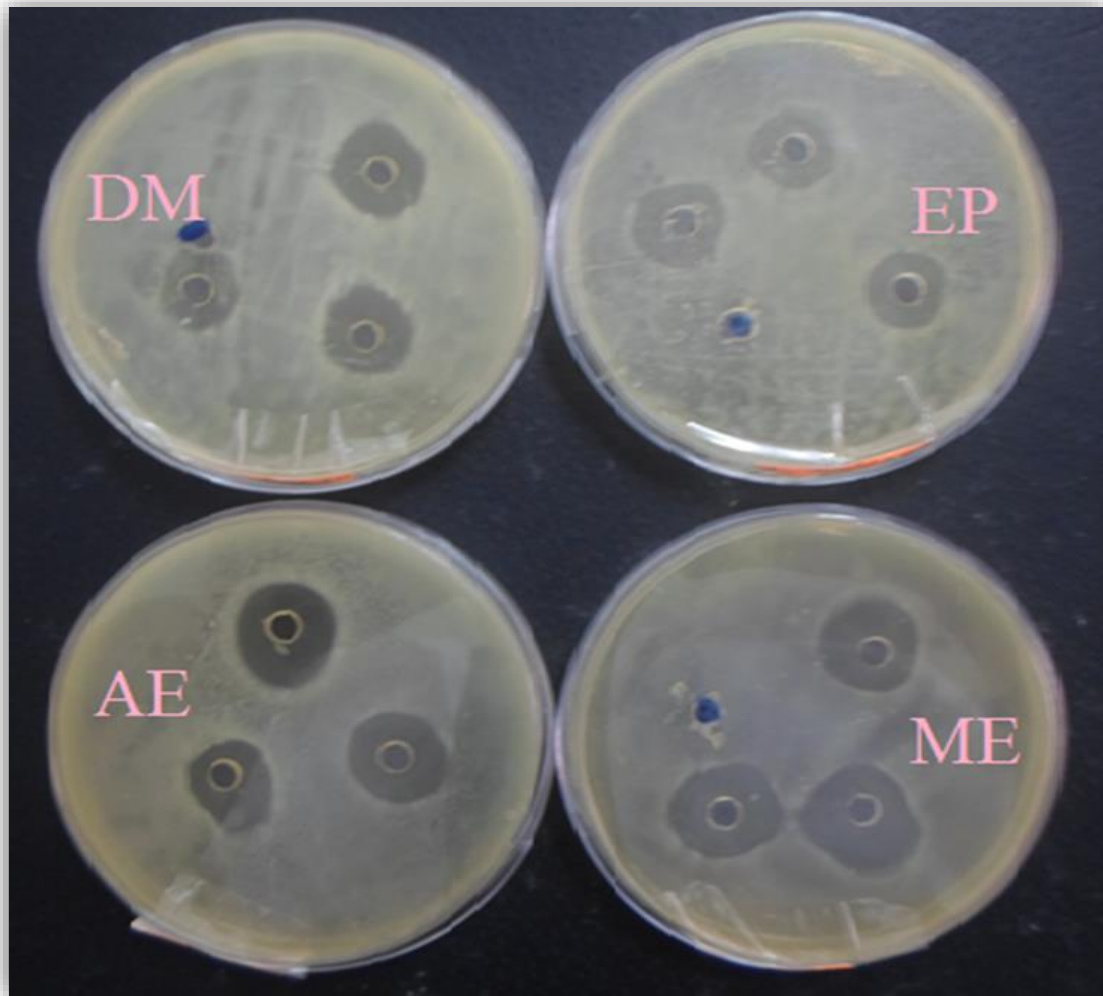


Figure 13 : Effet inhibiteur des quatre extraits de *M. vulgare* sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 au bout de 24h d'incubation à 37°C (**PP**).

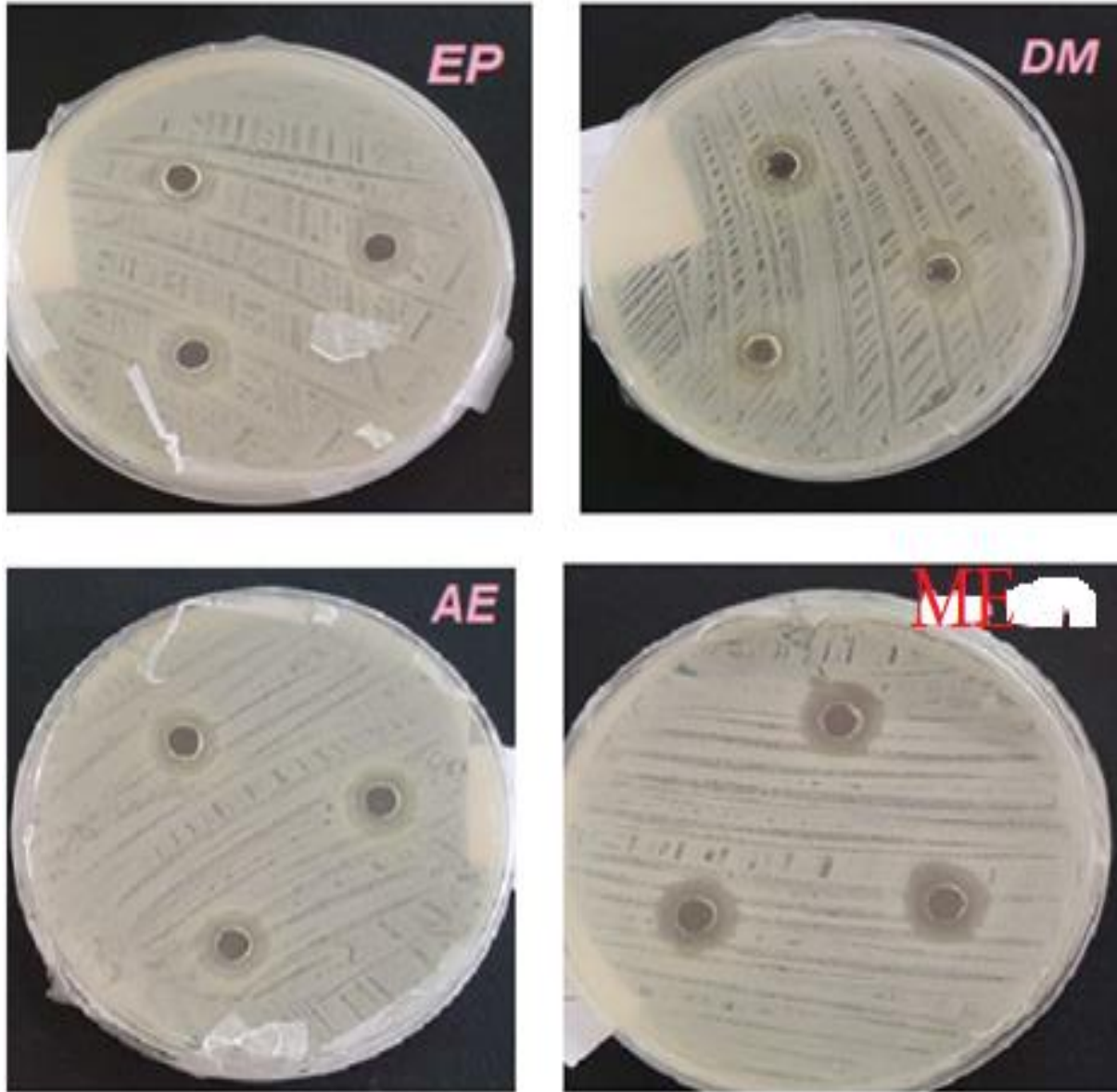


Figure 14 : Effet inhibiteur des quatre extraits de *M. vulgare* sur *S. aureus* ATCC 25923 au bout de 24h d'incubation à 37°C (PP).

Au terme de 48h d'incubation à 37°C, *P. aeruginosa* ATTC 27853 présente, d'une part, haute sensibilité vis-à-vis des extraits EP, DM et ME et, d'autre part, une sensibilité moyenne vis-à-vis de l'extrait AE (**Figure 15**).

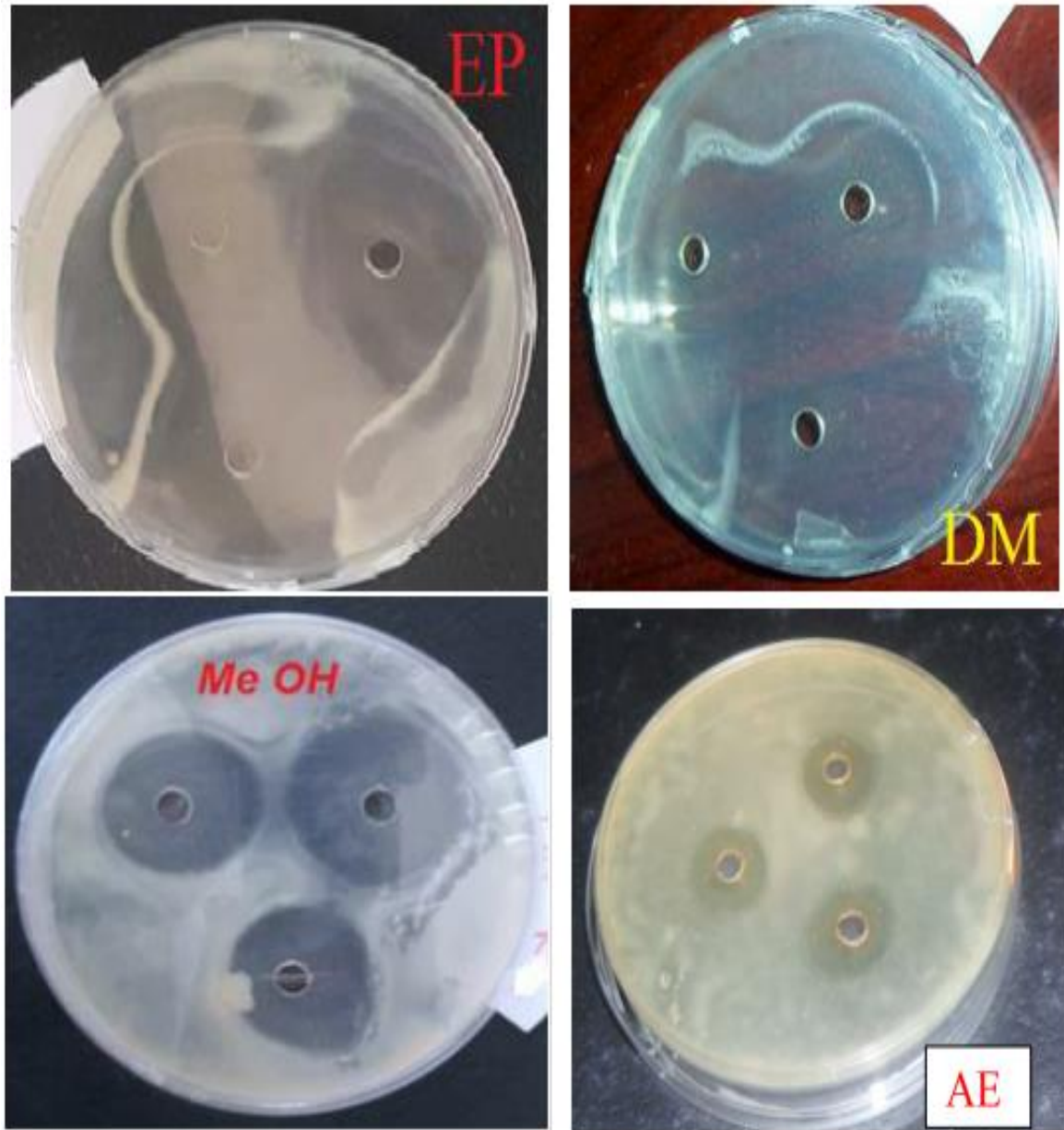


Figure 15 : Effet inhibiteur des quatre extraits de *M. vulgare* sur *P. aeruginosa* ATTC 27853 au bout de 48h d'incubation à 37°C (**PP**).

Au terme de 5 jours d'incubation à 37°C, *P. aeruginosa* ATTC 27853 présente une haute sensibilité vis-à-vis des quatre extraits de *M. vulgare* (**Figure 16**).

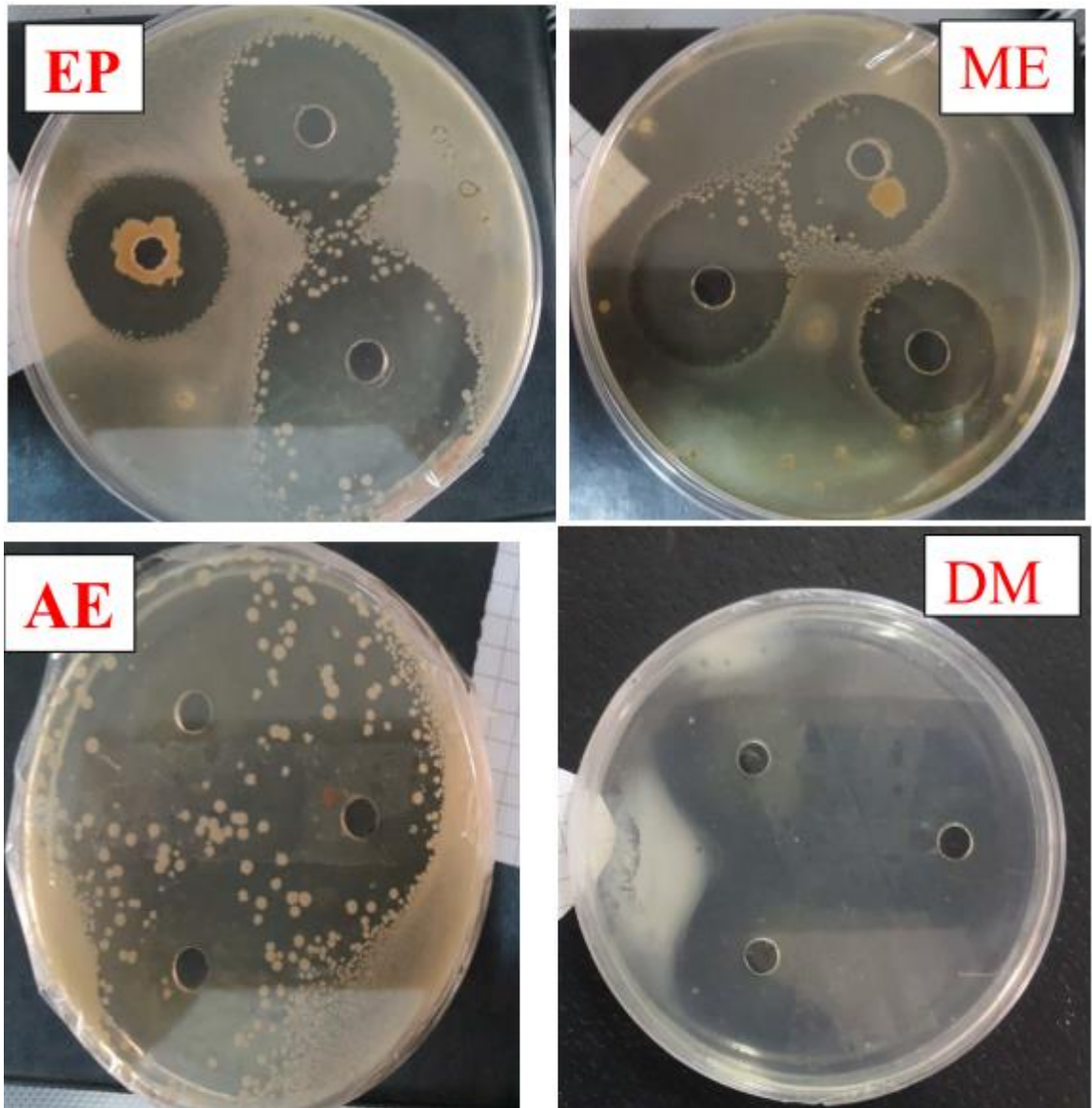


Figure 16 : Effet inhibiteur des quatre extraits de *M. vulgare* sur *P. aeruginosa* ATTC 27853 au bout de 5 jours d'incubation à 37°C (**PP**).

Nos résultats montrent que les quatre extraits de *M. vulgare* sont moyennement actifs sur *P. aeruginosa* ATTC 27853. Nous notons, en termes de valeurs de diamètres de zones d'inhibition, que les extraits ME et AE ($18,4 \pm 1,9$ et $17,9 \pm 0,8$ mm, respectivement) sont moyennement plus actifs que les extraits EP et DM ($15,7 \pm 0,8$ et $15,2 \pm 1$ mm, respectivement).

Quant à *S. aureus* ATCC 25923, les quatre extraits de *M. vulgare* présentent une activité limitée sur cette bactérie. En terme de valeurs de diamètres de zones d'inhibition, les quatre extraits de *M. vulgare* sont au même niveau d'activité sur *S. aureus* ATCC 25923 (effets proches).

D'après **Dorman (2000)**, les composants de structure phénolique sont fortement actifs contre les micro-organismes et agissent comme des agents dénaturants les protéines. Ces composés phénoliques sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques **Ozawa et al.,(1987)**.

Contrairement à nos résultats, les travaux de **Boudjellal (2012)** montrent que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* présente, d'une part, une activité limitée sur *P. aeruginosa* ATTC 27853 ($9 \pm 0,1$ mm) et, d'autre part, une activité moyenne sur *S. aureus* ATCC 25923 ($16 \pm 0,7$ mm). Cette discordance de résultat serait dûe aux protocoles d'extraction différents et, par conséquent, aux types de composés trouvés dans chaque extrait.

VI.3 Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité de *P. aeruginosa* ATTC 27853 et *S. aureus* ATCC 25923 vis-à-vis des antibiotiques (**Photos 10 et 11**).



Figure 17: Effet inhibiteur des antibiotiques sur *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Abidat et Mebarki, 2015) (PP).

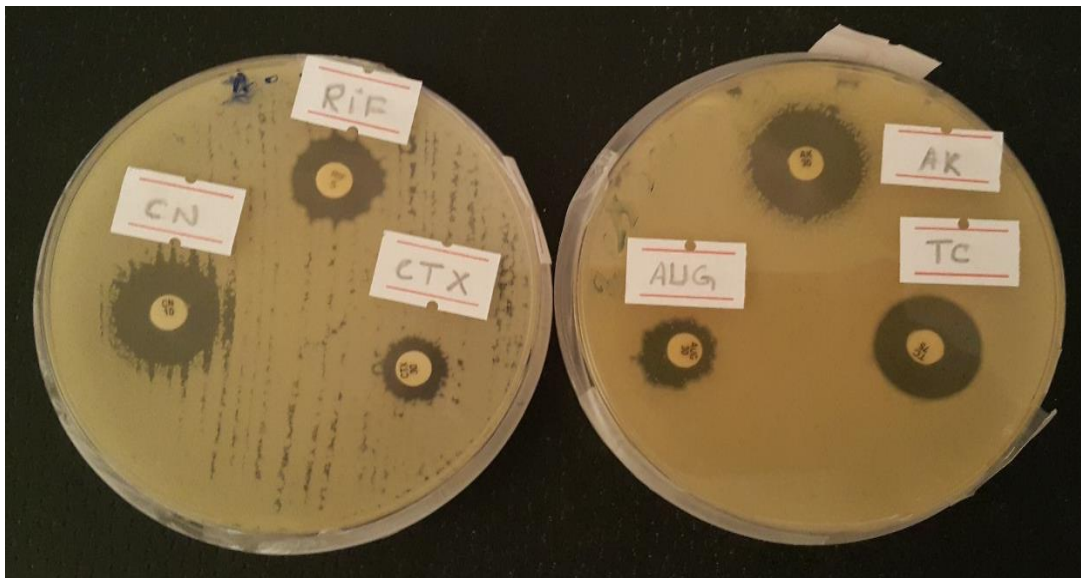


Figure 18 : Effet inhibiteur des antibiotiques sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (PP).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les tableaux ci-dessous reportent les valeurs (mm) des diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques rapportés sensibles pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *S. aureus* ATCC 25923.

Tableau 09: Antibiogramme de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Abidat et Mebarki, 2015).

	Zones d'inhibition (mm)							
	GNT	AMI	TCC	CS	ATM	AMP	CTX	CAZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15 ± 0.00 (++)	22.25 ± 0.35 (+++)	27.5 ± 0.35 (+++)	13 ± 0.00 (+)	30 ± 0.00 (+++)	15.13 ± 0.18 (++)	30 ± 0.00 (+++)	24 ± 0.00 (++)

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ;(+++) haute sensibilité

GNT : Gentamycine 10 µg, **AMI** : Amikacine 30 µg, **TCC** : Ticaracilline + acide clavulanique 85 µg, **CAZ** : Ceftazidime 30 µg, **CS** : Colistine 10 µg, **ATM** : Aztreonam 30 µg, **AMP** : Ampicilline 10 µg et **CTX** : Ceftaxime 30 µg.

Tableau 10 : Antibiogramme de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sensibles aux extraits.

	Zones d'inhibition (mm)					
	GNT	AUG	TC	AMI	CTX	RIF
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20.75 ± 1.06 (+++)	16.29 ± 0.77 (++)	10.7 ± 0.42 (+)	20.9 ± 0.14 (+++)	20.06 ± 1.5 (+++)	12.37 ± 0.05 (+)

(+) : Sensibilité limitée ; (++) : Sensibilité moyenne ;(+++) haute sensibilité

GNT : Gentamycine 10 µg, **AUG** : Amoxiciline, **TC** : Ticaracilline, **AMI** : Amikacine 30 µg, , **CTX** : Ceftaxime 30 µg, **RIF**: Rifampicine

Les résultats de l'antibiogramme vis-à-vis de *P. aeruginosa* ATCC 27853 montrent que les quatre extraits de *M. vulgare* ont le même effet inhibiteur que la gentamycine, l'ampicilline et la ceftazidime. Cet effet est plus meilleur que celui de la colistine, mais reste inférieur à celui de l'amikacine, la ticaracilline.

Les résultats de l'antibiogramme vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923, montrent que les quatre extraits de *M. Vulgare* ont le même effet inhibiteur, que la ticaracilline et rifampicine. Cet effet reste inférieur à celui de la gentamicine, de l'amoxicilline, de l'amikacine et de la ceftaxime.

Conclusion



Conclusion

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude des activités antioxydante et antibactérienne de quatre extraits de *M. vulgare*, après avoir déterminé leurs teneurs en composés phénoliques totaux.

La première étape qui consiste à l'extraction des extraits bruts de *M. vulgare* par macération à froid utilisant des solvants de polarités croissantes, nous a permis de calculer leurs rendements correspondants ME>DM>EP>AE. Le screening phytochimique du matériel végétal sec et broyé de *M. vulgare*, a révélé la présence de nombreux composés tels que les flavonoïdes, tannins catéchiqes, anthocyanes, saponines, terpènes et stérols.

La quantification des polyphénols totaux montre des taux presque similaires des extraits DM, AE et ME qui sont trois fois plus importants que celui de l'extrait EP. Le test de piégeage du radical libre DPPH, met en évidence le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique de *M. vulgare*. Quant au test de sensibilité bactérienne de deux souches pathogènes, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *S. aureus* ATCC 25923, met en lumière le potentiel antibactérien des quatre extraits de *M. vulgare* qui plus meilleur que certaines types d'antibiotiques.

Le présent travail apporte une validation scientifique quant à l'usage traditionnel massif de *M. vulgare* par les populations. Le potentiel antioxydant et antibactérien intéressant d'extraits de cette plante permet de l'utiliser dans plusieurs domaines : en médecine, en industrie alimentaire et en cosmétique. Il sera, donc, important dans les futures études d'identifier les constituants actifs, responsables de l'activité antioxydante et antibactérienne de *M. vulgare*. D'autres études plus poussées concernant la confirmation de la capacité antioxydante de cette plante par des tests in vitro et in vivo, ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne globale (bactéries, champignons et levures) d'huiles essentielles et d'autres types d'extraits de cette espèce, sont nécessaires.

Références

bibliographiques



A

- Abidat K. Mebarki K. (2015).** *In* mémoire de l'obtention du diplôme de MASTER. Etude des activités antioxydante et antibactérienne d'extraits polaires méthanoliques d'espèces endémiques du genre *Thymus*.
- Akroum. S. (2010).** Étude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. *In* Thèse de Doctorat : Université Mentouri De Constantine-Algerie.
- Amič D. Davidovic´-Amic´ D. Beslo D. Trinajstic´ N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. **34**, pp : 55-61.
- Arora A., Sairam R. Srivastava G. (2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*. **21**, pp 1227-1238.
- Arts I. C. and Hollman. P. C. (2005).** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, pp 317–325.
- Ashkenazy D. Friedman J. Kashman Y. (1983).** The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. *Journal of Medicinal Plant Research*, **47**: pp 218-220.
- Azzi R. Lahfa F. and Djaziri R. (2014):** Phytochemical, antihyperglycemic and antihyperlipidemic study of crude hydroalcoholic extract of aerial parts of *Marrubium vulgare* L. *In normal and streptozotocin induced-diabetic wistar rats*.126, pp : 19-39.

B

- Bellakhdar J. (1997).** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires la pharmacopée marocaine traditionnelle. *IBS Press*. 5, pp : 340-341.
- Bénard, C. (2009).** Étude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. *In* Thèse de Doctorat : Université de NANCY.
- Benbrook C.M. (2005).** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *Rapport sur l'état de la connaissance scientifique The Organic Center for Éducation and Promotion*.45.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bennani H. Fiet. J. et Adlouni. A. (2009). Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate: étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone des Laboratoires*. **416**, pp : 23-26.

Berrougui H. Isabelle M. Cherki M. Khalil A. (2006). Marrubium vulgare extract inhibit human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sciences*. **67**, pp : 105-112.

Boizot N. and Charpentier. J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. **32**, pp : 79-82.

Bonnet C. Alamigeon, F. et Michels P. (2010). Guide complet des soins esthétiques : du coté de ma vie. *Edition Eyrolles*, pp 14.

Bonnier G. (1909). La Végétation de la France, Flore Complète. Tome 09. *Suisse et Belgique*. Paris. **472**, pp : 25-26.

Boudjelal A. (2012). Extraction et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées de la région de M'sila, Algérie. *In Thèse de doctorat*, Université badji Mokhtar. Annaba, pp 61.

Boukef M.K. (1986). Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, Les plantes de la médecine traditionnelle tunisienne, *Agence de Coopération Culturelle et Technique*. Paris. France. **80**, pp 163-164.

Bouquet A. (1972). Plantes Médicinales du Congo Brazzaville. *Ed : O.R.S.T.O.M*, pp 19.

Boyd B. Ford C. Koepke M.C. GaryK. Horn E. McAnalley S. and McAnalley B. (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience and Nutrition*.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Techniques et Documentation*. 3^{ème} Ed. Lavoisier. Paris. **96**, pp : 199-388.

C

Cavin A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et anti radicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (Annonacées). *In* Thèse de Doctorat Université de Lausanne. Suisse, pp : 241.

D

Dellile L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Bited in different solvents. *Pharm Biol* **43**, pp : 21 – 5.

Di Domenico F. Foppoli C. Coccia R et Perluigi M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta*. **44**, pp : 737–747.

Diallo A. (2005). Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense*. *In* Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université *BAMAKO, MALI*. **32**, pp : 38-47.

Diallo A. 2005. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE). *In* Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto -Stomatologie de Bamako, Mali.

Dicko M. H. Gruppen H. Traoré A. S. Voragen A. G. J. and Van Berkel W. J. H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. **95**, pp : 21-38.

Djahara (2010). *In* Thèse En Vue De L'obtention Du Diplome De Doctorat En SCIENCE Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L.*

Djahra O. Bordjiba S. Benkherara (2012) Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare L.*).

Dohoo N. Yamin K. Tahrouch S. Idrissi Hassani L. M. Badoc A. Et Gmira N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro marocaine *Thymelaea lythroides*. *Bull.Soc pharm. Bordeaux*. **142**, pp : 61-78.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Domenico T. Francesco C. Maria G.S. Vincenza V. Mariateresa C.D. Antonella S. Gabriela M.et Giuseppe B. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**, pp : 2474-2478.

Dorman H.J.D. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. *J Applied Microbiol.* **74**, pp : 308 – 16

Duffy S.J., Vita J.A. (2003). Effects of phenolics on vascular endothelial function. *Current Opinion in Lipidology*. **92**, pp : 21-27.

Duraffourd C. et Lapraz J.C. (2002). Phytothérapie clinique. Endobiogénie et Médecine. Edition Masson, Paris.

E

El Ajjouri M. Badr S. Mohamed G. Abderrahman A. Abdellah F. Mohamed R. Fatiha A. et Mohamed A. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* L contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **12**, pp : 345- 351.

El Bardai S. Lyoussi B. Wibo M. Morel N. (2001). Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*. Pp : 329-343.

F

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **11**, pp : 108-115.

Floegel. A. Kim. D.O. Chung. S. J. Koo. S. I. and Chun. O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**, pp : 1043–1048.

G

Guidot D. M. Repine J. E. Kitlowski A. D. Flores S. C. Nelson S. K. Wright R. M. Et McCord J. M. (1995). Mitochondrial respiration scavenges extra mitochondrial superoxide anion via a non-enzymatic mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*. **96**, pp: 1131-1136.

Guignard J.L. (2001). Botanique systématique moléculaire. *Edition Masson*. Paris. pp 290.

Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* Pp 141-158.

H

Hadbaoui Z. (2012). Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux. *In* Thèse de Doctorat : Université de Kasdi Merbah Ouargla-Algerie.

Hadj Salem J. (2009). Extraction, Identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de Doctorat : Université de LORRAINE.

Herrera A. A. Aguilar S. L. (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*. **36**, pp : 6-561.

J

Jacob L. (2007). L'insuffisance rénale aiguë. Edition Springer. Pp 88.

Jacques B. and André R. (2004). Biochimie métabolique. *Ed ellipses*. Paris. Pp 217-219, 220-223-225.

Javanovic S.V. Steenken S. Tosic M. Marjanovic B., Simic M.J., 1994. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. **116**, pp : 4846-4851.

K

Katarzyna U. Anna M. Marta M. Joanna J.B. Et Grzegorz W. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of génération times in liquid bacterial cultures. *Biologia*. **62**, pp : 132-135.

Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolique*. **20**, Pp : 165-177.

L

Lahouel M. Amedah S. Zellagui A. Touil A. Rhouati S. Benayache F. Leghouchi E. et Bousseboua H. (2006). The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti and prooxydant effect and flavonoids concentration. *Thérapie*. **61**, pp : 347-355.

Lenoir L. (2011). Effet protecteur des polyphenols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de Doctorat : Université D'auvergne.

M

M Rizk. Odorus (2014). Constituents of plants growing in Qatar, *Fitoterapia*, **52** (2), (1982) 35-42. *A partir de l'article Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'Asteriscus-graveolenssubsp.*

Marc F. Davin A. Deglène-Benbrahim L. Ferrand C. Baccaunaud M. et Fritsch P. (2004). Méthodes d'évaluations du potentiel antioxidant dans les aliments. *Médecines Sciences*. **20**, pp : 458-464.

Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygén free radicals and human disease. *Biochem*. Pp 147 161.

Masoodi M. H. Ahmed B. Zargar I. M. Khan S. A. Khan S. and Singh P. (2008). Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *African J Biotechnol*, pp 86-87.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Matkowski A. Piotrowska P. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*. Pp: 346-353.

Meyre S.C. Yunes R.A. Schlemper V. Campos-Buzzi F. Cechinel-Filho V. (2005). Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Farmaco*. pp 321–326.

Mika A. Minibayeva F. Beckett R. and Lüthje S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*. Pp 3-173.

Milan S.S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Journal of Science*. Pp: 63-72.

Miller N-J. Sampson J. Candeias L.P. Bramley P.M. Rice-Evans C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, **384**, 240-242.

M-K.Boukef. (2008). Médecine Traditionnelle et Pharmacopée, les plantes de la médecine traditionnelle tunisienne. *Agence de coopération culturelle et technique*, Paris, France. Pp 163-164.

Moroh J.L.A. Bahi C. Dje K. Loukou Y.G. et Guede-Guina F. (2008). Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiacae) sur la croissance in-vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. 77 : Pp 44 –61.

N

Nair R Chanda S (2005) Anticandidal activity of *Punica granatum* exhi. Pp 52.

Nair R. Chanda S. (2005). Anticandidal activity of *Punica granatum* exhibited in different solvents. *Pharmaceutical Biology*. **43**: pp : 21-5.

Nève J. (2002). Nutrition et stress oxydant : Modulation de l'apport alimentaire en antioxydants. Optimisation of dietary intake of antioxidants. *Nutrition clinique et métabolisme*. Pp 292–300.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Njus D. Kelley P.M. (1991). Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. *FEBS Letters*. Pp 147-151

Novaes A.P. Rossi C. (2001). Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapies*. Pp 427-30.

O

Orhan E. Belhattab R. Senol F.S. Gülpinar A.R. Hosbas S. Kartal M. 2010. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare subsp. glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products* **32**, pp : 566–571.

Osman. A. M. (2011). Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **412**, pp : 473–478,.

Ozawa T. Lilley TH. Haslam E. (1987) Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Photochemistry* Pp: 2937 – 42

P

Patrick B. Jean L. and Michel S. (1988). Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. *1er Ed Médecine –Sciences Flammarion*. Paris. Pp: 100-108-274.

Perez C. Paul M. Bazerque P (1990). An antibiotic assay by the agar-well diffusion method. *Acta Biol Med Exp* **15**, pp : 113 – 5

Pincemail J. et Defraigne J.O. (2003). Le Coenzyme Q 10 ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. Pp 55-60.

Pourrut B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. In Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat à l'institut nationale polytechnique de l'Université de Toulouse spécialité : Eco toxicologie. France.

Q

Quezel P. Santa. S. (1963). La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Tome II, Ed : CNRS.* Paris. p 360-361.

R

Raynaud J. (2007). Prescription et conseil en phytothérapie. *Ed : Tec et Doc.* Paris. Pp 149.

Richard C et Kiredjian M. (1995). Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts : Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella. 2^{ème} édition. *Ed Institut. Pasteur.* Paris. pp: 42-43 in h12

Rigano D. Apostolides A. N. Bruno M. Formisano C., Grassia A., Piacente S., Piozzi F., Senatore F. (2006). Phenolic compound of *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum* from Lebanon. *Biochemical Systematics and Ecology.* pp 256-260.

Robert D. et Catesson A. M. (2000). Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative. *Wolters Kluwer France Edition.* Pp 320.

Roman R.R. Alarcon-Aguilar F. (1992). Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research.* Pp 59-64.

S

Schlempher V. 1996, Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues *hytomedicine*, pp211 – 216.

Siddhuraju P. Becker K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Seed extracts. *Food Chemistry.* Pp: 10-19.

Singleton V.L. Orthofer R. and Lamuela-Raventos R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* **299**, pp : 152-178.

Solfo R.R. (1973). Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxus madagascariensis* Bail et ses variétés. *Ed: O.R.S.T.O.M*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Spiller G. et Spiller. M. (2007). Tout savoir sur les fibres. *Éditions le mieux-être*. Pp27.

Steven P. Rachel C. Martha E. Paul H. Jane S. and Peter W.J. (2004). Microbiology of Waterborne Diseases. *Ed Elsevier Academic Press*. Pp71-132

V

Vauzour D. Rodriguez-Mateos A. Corona G. Oruna-Concha M. J. and Spencer J. P. E. (2010). Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* **2**, pp : 1106-1131.

Vigneau C. (1985). Plantes médicinales, Thérapeutique – Toxicité ; *Éditions Masson*. Pp 1-292.

Vigneau C. (1985). Plantes médicinales, Thérapeutique – Toxicité ; *Éditions Masson* ; Livre de 290 pages.

Visioli F. Borsani L. et Galli C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential rôle of Phytochemicals. *Cardiovascular Research* **47**, pp : 419–425.

W

Weel KGC. (1999). Antioxidant activity of Horehound (*Marrubium vulgare L*).Grown in Lithuania, *Fett/ Lipid* pp 395 – 400.

Wichtl M and Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2^{ème} Ed: TEC & DOC. *Paris*. pp. 1-364.

Wootton-Beard P. C. Moran A. and Ryan L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International* **44**, pp : 217–224.

Wu H. (2007). Isolation and characterization of natural products from inger and Allium Ursinum. *ProQuest Edition*, pp 28.

Y

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Yumrutas O. Saygideger S.D. (2010). Determination of in vitro antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish and Mey. And *Lamium amplexicaule* L. from South east of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*. pp: 2164-2172.

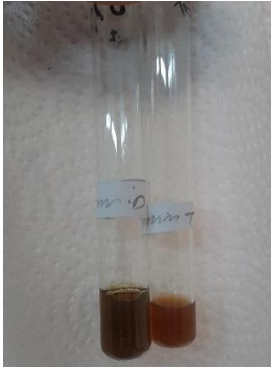
Annexe



Annexe

Screening phytochimique

Tanin catéchique



Térpanoïde et stérols



Flavonoïde



Cardinolide



Alcaloïde



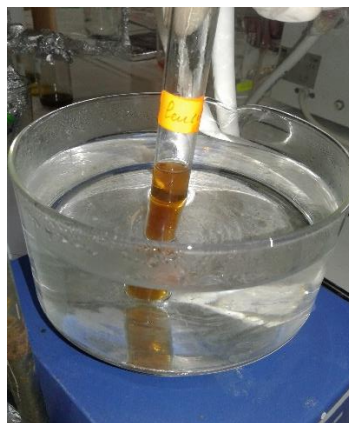
Saponine



Anthocyane



Leucoanthocyanes



Quinones

Perte la photo