

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention  
Du diplôme de Master Académique**

**Par :**

BAHRI Rim, BOUSSAG Chahinez et DJEZARE Rayane

**Intitulé :**

**Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des  
extraits de *Marrubium vulgare***

**Soutenu devant le jury composé de :**

M <sup>me</sup> . BOUAZIZ Samia	Université de M'sila	Président
Mr. KHERBACHE Abdallah	Université de M'sila	Examineur
M <sup>lle</sup> . DEHIMI Khadidja	Université de M'sila	Rapporteur

**Année universitaire : 2021 /2022**

## REMERCIEMENTS

En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier d'abord ALLAH le tout puissant de nous avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail.

Nous adressons également nos remerciements les plus sincères à *M<sup>lle</sup> Dehimi Khadidja*, notre directeur de recherche, qui a bien voulu accepter de diriger ce mémoire. Nous avons énormément apprécié travailler avec vous durant notre cursus. Veuillez accepter notre très profonde reconnaissance et l'assurance de nos sentiments les plus distingués.

Nous remercions chaleureusement les membres de jury d'avoir accepté de juger notre travail, M<sup>me</sup> **BOUAZIZ Samia** et Mr **KHERBACHE Abdallah**

Nous offrons nos plus sincères remerciements à Mr. **LAOUAR Hocine** (Professeur à l'université de sétif- 1) qui a identifié la plante étudiée et le laboratoire de la phytothérapie appliquée aux maladies chroniques (université de Sétif-1), où on a réalisé une partie de notre travail.

## ملخص:

*Marrubium vulgare* هو نبات طبي من عائلة *Lamiaceae*، واسع الانتشار في الجزائر ويسمى محليا "مريوت". تستعمل أوراق هذا النبات في الطب التقليدي لعلاج أمراض الكبد، الاضطرابات الهضمية وآلام البطن. تم هذا العمل لتقدير كمية بعض المركبات الكيميائية النباتية وتقييم النشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا لمستخلصات هذا النبات. تم تحضير المستخلصات بالنقع باستعمال أربع مذيبات ذات قطبية مختلفة. تم الحصول على أعلى مردود استخلاص في المستخلص المائي (10.6%)، متبوع بمستخلص الميثانول (8.5%)، ثم مستخلص الأسيتون (3.36%) وأخيرا مستخلص الهيكسان (1.84%). أظهر المستخلص المائي أعلى كمية من عديدات الفينول (60.54 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك / مغ مستخلص)، مستخلص الأسيتون كان الأغنى بالفلافونويدات (100.1 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين / مغ مستخلص) ومستخلص الميثانول الأغنى بالدباغ (81.29 ميكروغرام مكافئ حمض التانيك / مغ مستخلص). أظهر مستخلص الميثانول أعلى قدرة على إرجاع الحديد بقيمة امتصاص قصوى قدرت ب 0.94 عند تركيز 2مغ/مل. في اختبار بيتا كاروتين/حمض اللينولييك، أظهر مستخلص الهكسان نشاطية أعلى من بقية المستخلصات بنسبة تثبيط قدرت ب 84.82%. تم دراسة النشاطية المضادة للبكتيريا ضد ثلاثة سلالات ميكروبية (*P.aeruginosa* و *S. aureus*, *E.coli*)، حيث لم تظهر المستخلصات أي فاعلية مضادة للبكتيريا عند تركيز 200 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: *Marrubium vulgare*، مستخلص مائي، مستخلصات عضوية، عديدات الفينول، FRAP، بيتا كاروتين، نشاطية مضادة للبكتيريا.

## Résumé

*Marrubium vulgare* est une plante médicinale de la famille des *Lamiaceae*, répandue en Algérie et appelée localement « Mariout ». En médecine traditionnelle, les feuilles de cette plante sont utilisées pour traiter les maladies du foie, les troubles digestifs et les douleurs abdominales. Ce travail a été réalisé pour quantifier certains composés phytochimiques et évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de la plante. Les extraits ont été préparés par macération en utilisant quatre solvants de polarité différente. Le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu dans l'extrait aqueux (10.6 %), suivi par l'extrait de méthanol (8.5%), puis l'extrait d'acétone (3.36%) et enfin, l'extrait d'hexane (1.84%). L'extrait aqueux a montré les teneurs les plus élevées en polyphénols (60.54 µg équivalent acide gallique /mg d'extrait), l'extrait d'acétone était le plus riche en flavonoïdes (100.1 µg équivalent quercétine/mg d'extrait) et l'extrait de méthanol le plus riche en tannins (81.29 µg d'équivalent d'acide tannique/mg d'extrait). La meilleure capacité à réduire le fer est représenté par l'extrait méthanolique qui a montré une valeur maximale d'absorbance de 0.94 à une concentration de 2 mg/ml. Dans le test du bêta-carotène/acide linoléique, l'extrait d'hexane a montré une activité supérieure aux autres extraits, avec un taux d'inhibition de 84.82%. L'activité antibactérienne a été étudiée contre trois souches microbiennes (*S. aureus*, *E.coli* et *P.aeruginosa*), où les extraits n'ont montré aucun effet antibactérien à une concentration de 200 mg/ml.

**Mots clés :** *Marrubium vulgare*, extrait aqueux, extraits organiques, polyphénols, FRAP, bêta-carotène, activité antibactérienne.

## Abstract

*Marrubium vulgare* is a medicinal plant from the *Lamiaceae* family, widespread in Algeria and is called locally "Mariouth". In traditional medicine, the leaves of this plant are used to treat liver diseases, digestive disorders and abdominal pain. This work was realized to quantify some phytochemical compounds and evaluate the antioxidant and antibacterial activities of the plant extracts. The extracts were prepared by maceration using four solvents with different polarity. The highest yield extraction was obtained in aqueous extract (10.6 %), followed by methanol extract (8.5 %), then acetone extract (3.36 %) and finally hexane extract (0.52%). Aqueous extract showed the highest levels of polyphenols (60.54  $\mu\text{g}$  gallic acid equivalent/mg of extract), acetone extract was the most rich in flavonoids (100.1  $\mu\text{g}$  quercetin equivalent/mg extract) and methanol extract the most rich in tannins (81.29  $\mu\text{g}$  tannic acid equivalent/mg extract). The best capacity to reduce iron is represented by methanol extract which showed a maximal absorbance value of 0.948 at a concentration of 2 mg/ml. In the beta-carotene / linoleic acid, hexane extract showed a higher activity than the other extracts with an inhibition rate of 84.82%. The antibacterial activity was studied against three microbial strains (*S. aureus*, *E.coli* and *P.aeruginosa*), where extracts did not show any bacterial effect at a dose of 200 mg/ml.

**Key words:** *Marrubium vulgare*, aqueous extract, organic extracts, polyphenols, FRAP, beta-carotene, antibacterial activity.

# Sommaire

<b>Introduction</b>	01
<b>Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique</b>	
1. La plante <i>Marrubium vulgare</i>	04
1.1. La famille des <i>Lamiaceae</i>	04
1.1.1. Généralités	04
1.1.2. Répartition géographique	04
1.2. Le genres <i>Marrubium</i>	04
1.3. L'espèce <i>Marrubium vulgare</i>	05
1.3.1. Description botanique	05
1.3.2. Classification	05
1.3.3. Intérêts thérapeutiques	06
1.3.4. Composition chimique	06
2. Les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants	06
2.1. Les radicaux libres	07
2.1.1. Définition	07
2.1.2. Les principaux ROS	08
2.1.2.1. L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )	08
2.1.2.2. Le radical hydroxyle (OH)	08
2.1.2.3. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ )	08
2.1.2.4. Le monoxyde d'azote (NO)	08
2.2. Le stress oxydatif	08
2.2.1. Définition	08
2.2.2. Maladies liées au stress oxydatif	08
2.3. Les antioxydants	09
2.3.1. Définition	09
2.3.2. Les type d'antioxydants	09
2.3.2.1. Les antioxydants endogènes	09
a- La superoxyde dismutase (SOD)	09
b- La catalase	09
c- Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)	09
d- Le glutathion (GSH sous sa forme réduite)	10
2.3.2.2. Les antioxydants exogènes	10
a- La vitamine E	10
b- Les caroténoïdes	10
3. Antimicrobiens et résistance bactérienne	10
3.1. Mode d'action des agents antibactériens	10
3.2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques	11
4. Les polyphénols	11
4.1. Définition	11
4.2. Classification des polyphénols	12
4.2.1. Les flavonoïdes	12
4.2.2. Les tannins	13

4.2.2.1. Les tannins condensés	13
4.2.2.2. Les tannins hydrolysables	14
<b>Chapitre 02 : Matériel et Méthodes</b>	
1. Matériel	16
1.1. Matériel végétal	16
1.2. Souches bactériennes	16
1.3. Produits Chimiques	17
2. Méthodes	17
2.1. Extraction	17
2.1.1. préparation de l'extrait aqueux	17
2.1.2. préparation des extraits organiques	17
2.2. Etude phytochimique	18
2.2.1. Les flavonoïdes	18
2.2.2. Les tannins	18
2.2.3. Les quinones	18
2.2.4. Les terpénoïdes	18
2.2.5. Les saponines	18
2.3. Dosages de quelques métabolites secondaires	18
2.3.1. Dosage des polyphénols totaux	18
2.3.2. Dosage des flavonoïdes	19
2.3.3. Détermination de la teneur totale en tannins	20
2.4. Etude de l'activité antioxydante des extraits de la plante	21
2.4.1. Pouvoir réducteur de fer (FRAP ou Ferric Reducing Antioxidant Power)	21
2.4.1.1. Préparation du tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6)	21
2.4.1.2. Réalisation du test	22
2.4.2. Test de $\beta$ - carotène/acide linoléique	22
	23
2.5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de la plante	23
2.5.1. Préparation de l'inoculum	23
2.5.2. Méthode des puits de diffusion	23
2.6. Etude statistique	
<b>Chapitre 03 : Résultats et discussion</b>	
1. Extraction	25
2. Etude phytochimique	25
3. Dosage des composés phénoliques de la plante	26
4. Activité antioxydante des extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	27
4.1. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	27
4.2. Test du $\beta$ - carotène/acide linoléique	26
5. Activité antibactérienne de <i>M. vulgare</i>	31
<b>Conclusion et perspectives</b>	34
<b>Références bibliographiques</b>	36

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Répartition géographique mondiale de la famille des <i>Lamiaceae</i> (en rouge)	05
2	Modes d'action des antibiotiques sur les bactéries	11
3	Structure de base des flavonoïdes	13
4	Structures des différentes classes de flavonoïdes	13
5	Structure chimique (a) d'un tanin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose)	14
6	<i>Marrubium vulgare</i> . A : Plante dans son environnement, B : Partie aérienne	16
7	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	19
8	Courbe d'étalonnage de la quercétine.	20
9	Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.	21
10	Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.	28
11	Pouvoir réducteur des extraits de <i>Marrubium vulgare</i> .	28
12	(A). Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de <i>Marrubium vulgare</i> par rapport aux témoins (BHT et DMSO) par le test du $\beta$ -carotène/acide linoléique durant 48h. (B). Pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et organiques et des témoins par le test du $\beta$ -carotène/acide linoléique après 24h.	30
13	Activité antibactérienne de la gentamycine (contrôle positif) contre <i>E. coli</i> (1), <i>P. aeruginosa</i> (2) et <i>S. aureus</i> (3) et de l'extrait aqueux de <i>M. vulgare</i> contre <i>P. aeruginosa</i> (4).	31

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
01	Composition chimique de <i>Marrubium vulgare</i> (Huile essentielle)	07
02	Les différentes classes des composés phénoliques	12
03	Souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne	16
04	Rendements des extractions aqueuses et organiques de <i>M.vulgare</i>	25
05	Analyse phytochimique des différents extraits de <i>Marrubium vulgare</i>	26
06	Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tannins totaux dans les extraits de <i>M. vulgare</i>	26

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Hydroxytoluène butylé
DMSO	Dimethylsulfoxyde
EAG	Equivalent d'acide gallique
EAT	Equivalent d'acide tannique
EQ	Equivalent de quercétine
FRAP	Ferric reducing/antioxydant power
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Forme réduite de Glutathion
GSSG	Forme oxydée de Glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde D'hydrogène
I%	Pourcentage d'inhibition
MHA	Mueller-Hinton Agar
NADH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide d'hydrogène
NADPH	Nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxide Nitrique Synthase
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anion Superoxyde
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxygène singulet
OH <sup>•</sup>	Radical hydroxyle
ONOO <sup>•</sup>	Peroxynitrite
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxyde dismutase

# **Introduction**

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été utilisées pour améliorer la santé humaine et soigner plusieurs maladies. Ce savoir traditionnel s'est transmis de génération en génération, et constitue aujourd'hui, d'une part, une mine d'informations pour ceux qui préfèrent les usages folkloriques, et d'autre part, une ressource inestimable pour l'industrie pharmaceutique **(Ben Guegua, 2010)**.

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 65 à 80% de la population mondiale des pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépend principalement des plantes médicinales traditionnelles pour les soins de santé primaires ; Malgré les avancées remarquables de la chimie organique de synthèse au XXe siècle, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent leur origine directement ou indirectement des plantes. Les activités biologiques des plantes médicinales sont dues aux métabolites secondaires qu'elles contiennent et surtout les polyphénols **(Calixto, 2005)**.

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydatif et antioxydant de l'organisme. Il a en effet été décrit comme un agent causal critique impliqué dans de nombreuses maladies humaines chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, l'inflammation, le diabète sucré et le vieillissement **(Uttara et al., 2009)**. Ces dommages oxydatifs sont obtenus par l'attaque des radicaux libres sur diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui conduit finalement à la dégradation et à la mort des cellules **(Moon et Shibamoto, 2009)**.

Les infections bactériennes sont causées par divers micro-organismes et sont à l'origine des maladies les plus meurtrières et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques ont été développés pour les traiter, mais son abus est dû à l'émergence de résistances multi-bactériennes **(Hesini et al., 2007)**.

La plante *Marrubium vulgare* est une plante médicinale traditionnellement utilisée dans le traitement de nombreux troubles comme les maladies du foie et de la vésicule biliaire, la constipation, accumulation de liquide dans le corps, ballonnements, ainsi que les douleurs et crampes abdominales **(Guib-fakim, 2006)**.

Dans ce travail, l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits préparés à partir des parties aériennes de *Marrubium vulgare*. Cette étude contribue à :

- Préparation des extraits des parties aériennes de *Marrubium vulgare*.
- Screening phytochimique et évaluation de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins des extraits préparés.
- Etude du pouvoir antioxydant des extraits par la méthode de FRAP et le test de  $\beta$ -carotène/acide linoléique.
- Etude de l'activité antibactérienne des extraits en utilisant la technique des puits de diffusion.

# **Chapitre I :**

# **Synthèse Bibliographique**

## 1. La plante *Marrubium vulgare*

### 1.1. La famille des *Lamiaceae*

#### 1.1.1. Généralités

La plante étudiée appartient à la famille des *lamiaceae* anciennement appelées Labiatae, se compose de 6900 à 7200 espèces réparties en 236 genres (**Dinc et al., 2009**). Les genres les plus importants sont *Salvia* (900 espèces), *Scutellaria* (360 espèces), *Coleus* (325 espèces), *Plectranthus* (300 espèces), *Hyptis* (280 espèces), *Teucrium* (250 espèces), *Thymus* (220 espèces) et *Nepeta* (200 espèces) (**Raja 2012 ; Venkateshappa et sreenath, 2013**).

Cette famille consiste d'herbes, d'arbustes et d'arbres vivaces, les plantes sont recouvertes par des poils et glanduleuses, elles se caractérisent par une tige quadrangulaire bien visible et à inflorescences verticillées ; les feuilles sont toujours opposées et simples et les fleurs sont regroupées en épis terminaux ou en bobines aux nœuds foliaires sur une grande partie de la tige et généralement irrégulières à système bilatéral zygomorphe (**Guignard et al., 2005** ). Parmi les plantes les plus connues appartenant à cette famille, on cite la menthe, l'origan, la cataire, le romarin, les lavandes, les népétas et le teck.

#### 1.1.2. Répartition géographique

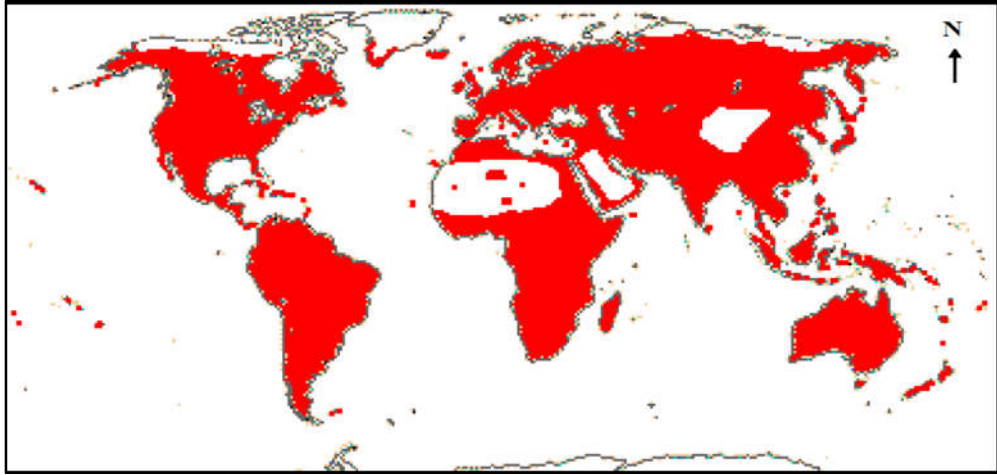
La distribution des plantes de la famille des *lamiaceae* dans le monde est cosmopolite, on les trouve surtout dans les zones tropicales et tempérées du monde et parfois dans les régions arctiques et en hautes montagnes. Leur diversité est rencontrée dans le bassin méditerranéen, l'Asie centrale, continent américain, les îles du pacifique, l'Afrique équatoriale et la Chine (**Walker et al., 2004**) (Figure 1).

En Algérie, selon Quezel et Santa (1963), cette famille comprend 28 genres et 146 espèces. Les *Lamiaceae* ne se rencontrent guère dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar, sauf les trois espèces *Marrubium deserti*, *Salvia aegyptica* et *Teucrium polium* sont largement répandues dans ces régions (**Saad, 2017**).

### 1.2. Le genre *Marrubium*

Le genre *Marrubium* comporte 30 espèces réparties dans différentes régions dans le monde. Les plantes appartenant à ce genre sont des Arbustes à tiges et face inférieure des feuilles blanches tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aigues et les fleurs sont blanches. Le calice à 10 dents, dont les 5 commissurales un peu plus courtes, toutes terminées en pointe épineuse.

En Algérie, on retrouve 6 espèces différentes au sein de ce même genre : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pomelet et *Marrubium deserti* de Noé (Quezel et Santa, 1963).



**Figure 01** : Répartition géographique mondiale de la famille des *lamiaceae* (en rouge) (Pirani et Prado, 2012).

### 1.3. L'espèce *Marrubium vulgare*

#### 1.3.1. Description botanique

*Marrubium vulgare* L. ou marrube blanc, connue en Algérie par le nom «Marriout», est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen et utilisée pour ses vertus thérapeutiques (Djahra et al., 2013). C'est une plante herbacée vivace de 30 à 60 cm de haut ; ses tiges sont ramifiées, quadrangulaires, cotonneuses et denses ; ses feuilles sont obliques, ridées, avec des bords verts jaunâtres sur la face supérieure et blanc-vertes sur la face inférieure ; ses fleurs sont nombreuses, blanches en contribuant au calice tubulaire, qui s'agrandit considérablement par sa partie supérieure, formant un halo membraneux autour du fruit (Quezel et Santa, 1963).

#### 1.3.2. Classification

La position systématique de l'espèce *M. vulgare* est comme suit (Quezel et Santa, 1963) :

**Règne** : végétal

**Embranchement** : Spermaphytes

**Sous embranchement** : Angiospermes

**Classe :** Eudicotylédones

**Sous-classe :** Astérides

**Ordre :** Lamiales

**Famille :** Lamiacées

**Genre :** *Marrubium*

**Espèce :** *Marrubium vulgare* L.

### 1.3.3. Intérêts thérapeutiques

La plante *M.vulgare* est très utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement symptomatique de la toux et lors des affections bronchiques aiguës et bénignes. C'est un expectorant des sécrétions bronchiques en cas de toux productive et est utilisée pour soulager le mal de gorge (**Belhattab et al., 2006**). La plante est utilisée aussi comme antispasmodique, anti-diarrhéique et tonique amer. En plus, cette espèce est exploitée pour lutter contre la cellulite et l'obésité. En outre, les composants du marrube ont des actions régulatrices sur les muscles cardiaques. Un bon nombre de ces utilisations traditionnelles ont été confirmées par des tests scientifiques. Actuellement, les recherches sur son action contre la fièvre typhoïde montrent que la plante a la capacité de faire baisser la fièvre tout en améliorant l'état général et en raccourcissant la durée de la maladie (**Bremness, 2005**).

### 1.3.4. Composition chimique

Les études phytochimiques effectuées sur *Marrubium vulgare* confirment qu'elle contient de nombreux métabolites secondaires, on cite essentiellement : les flavonoïdes (apigénine 7-O-glucoside, lutéoline 7-O-glucoside), le ladanein, le cryoeryol 7-O glucuronide (**Boudjelal et al., 2012**), les stérols, les dérivés de phénylpropanoïdes (verbascoside), les terpènes, les tannins qui sont spécifiques des Lamiacées et dérivés de l'acide hydroxycinnamique et les saponosides (**Wichtl, 2003**).

Selon Kadri et ses collaborateurs (**2011**) qui ont réalisé une étude sur la composition chimique des huiles essentielles de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*, 34 composés ont été identifiés, dont les plus abondants sont le  $\gamma$ -Eudesmol, le  $\beta$ -Citronellol, le Citronellyl formate, le Geranyl formate et le Germacrene-D (Tableau 1).

**Tableau 01** : Composition chimique de *Marrubium vulgare* (Huile essentielle) (Kadri et al., 2011).

Composé	%	Composé	%
N-trimethylsilyltrifluoroacetamide	2.35	$\alpha$ -Muurolene	0.63
N,N-bistrimethylsilyltrifluoroacetamide	0.97	$\alpha$ -Amorphene	0.81
$\alpha$ -Pinene	1.16	$\alpha$ -Humulene	0.68
Camphene	0.49	Neoolloocimene	0.91
1,8-Cineole	3.72	Nerylacetate	3.41
$\alpha$ -Thujone	2.29	Germacrene-D	9.37
1-Vinylcyclohexane	0.75	Ledene	5.35
Camphor	1.03	$\beta$ -bisabolene	0.86
Iso menthon	0.57	$\sigma$ -Cadinene	3.30
Borneol	0.61	$\alpha$ –Agarofuran	0.42
$\beta$ -Citronellol	9.90	Furan-2-one, 4-phenyltetrahydro	1.44
Geraniol	2.42	$\Upsilon$ -Eudesmol	11.93
Citronellyl formate	9.50	$\beta$ -Cubebene	1.52
Geranyl formate	6.25	Citronellylbutanoate	0.66
$\alpha$ -Copaene	1.37	Geranyltiglate	5.53
$\beta$ -Bourbonene	1.96	Cyclononasiloxane, octadecamethyl	3.08
Trans-caryophyllene	2.15	Eicosamethylcyclodecasiloxane	2.29

## 2. Les radicaux libres, stress oxydatif et les antioxydants

### 2.1. Les radicaux libres

#### 2.1.1 Définition

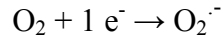
Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés), où l'union d'un électron célibataire avec un autre électron peut créer une stabilité en fonction du phénomène d'oxydation (Halliwell,

1996). Toutes les molécules réactives dérivées de l'oxygène que ce soient des radicaux ou molécules non radicalaires sont dites espèces réactives d'oxygène (Kholkhal, 2014).

### 2.1.2. Les principaux ROS

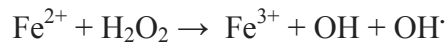
#### 2.1.2.1. L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ )

Les superoxydes sont des composés chimiques contenant l'anion dioxyde  $O_2^{\cdot-}$  dérivé de l'oxygène avec un électron non apparié et possède alors des propriétés paramagnétiques (Bonnot, 2009).



#### 2.1.2.2. Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )

Une espèce chimique qui attaque la plupart des molécules biologiques. Ce radical peut se former selon la réaction de Fenton en présence des ions métalliques (Sorg, 2004) :

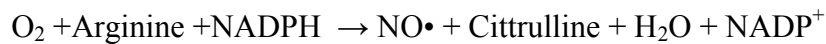


#### 2.1.2.3. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et L'oxygène singulet ( $^1O_2$ )

Deux molécules qui ne sont pas des radicaux libres proprement dits. L' $H_2O_2$  a la capacité de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires. Le  $^1O_2$  est une forme excitée d'oxygène, hautement oxydative (Halliwell et Gutteridge, 1996).

#### 2.1.2.4. Le monoxyde d'azote (NO)

Appelé aussi oxyde nitrique est un radical libre ubiquitaire dont la molécule comporte un atome d'azote et d'oxygène et est synthétisé par l'enzyme NOS (Coleman, 2001)



## 2.2. Le stress oxydatif

### 2.2.1. Définition

Le stress oxydatif se produit dans la cellule lorsque l'équilibre est perturbé entre ses oxydants et antioxydants ce qui favorise l'état oxydatif. Ce déséquilibre est dû à la surproduction d'espèces oxygénées activées ou au manque de l'apport en antioxydants (Halliwell, 1996).

### 2.2.2. Maladies liées au stress oxydatif

Dans de nombreuses maladies graves, en particulier celles liées au vieillissement telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer, le stress oxydatif est le facteur causal originel. La plupart des maladies causées par le stress oxydatif apparaissent avec l'âge car le

vieillesse réduit les défenses antioxydantes et augmente la production de radicaux dans les mitochondries avec une diminution dans l'efficacité de la réparation des composants oxydés et des systèmes de dégradation (Sohal, 2002). A titre préventif, il est essentiel de disposer d'une haute technologie permettant de bien établir l'état de stress oxydatif d'un individu afin de délivrer nos défenses antioxydantes optimales et de réduire les dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Haleng, 2007).

### 2.3. Les antioxydants

#### 2.3.1. Définition

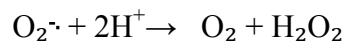
Un antioxydant est un agent qui ralentit ou empêche l'oxydation en neutralisant les radicaux libres et les ROS en général, prévenant ainsi l'apparition de maladies liées au stress oxydatif (Kulawik et al., 2013).

#### 2.3.2. Les types d'antioxydants

##### 2.3.2.1. Les antioxydants endogènes

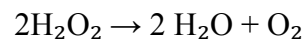
###### A. La superoxyde dismutase (SOD)

Les SOD sont des métalloprotéines qui sont également des oxydoréductases assurant l'élimination de l'anion superoxyde, qui est la première espèce toxique formée à partir de l'oxygène dans les cellules eucaryotes (Fridovich, 1995 ; Levine et Kidd, 1996). Ces enzymes catalysent la réaction entre le superoxyde et des protons, ce qui donne de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (Murray et al., 2013) :



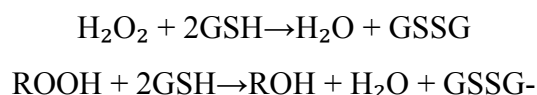
###### B. La catalase

Cette hémoprotéine contient quatre groupes hèmes et est localisée principalement dans les peroxysomes (Valko et al., 2006). Elle possède une activité peroxydase et utilise une molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$  comme donneur d'électrons et une autre molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$  comme oxydant selon la réaction suivante (Murray et al., 2013) :



###### C. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La GPx peut réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et d'autre part les hydro-peroxydes organiques (ROOH) en alcools (Marfak, 2003). Ce rôle essentiel dans le cycle redox car cette enzyme permet le maintien d'un milieu intracellulaire réducteur avec un taux élevé de GSH et un faible taux de GSSG (Ganther, 1999).



### D. Le glutathion (GSH sous sa forme réduite)

C'est un tri-peptide formé par la liaison entre l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Ce composé est particulièrement important car est un substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (**Halliwell et Gutteridge, 1999**). Le glutathion peut aussi régénérer la vitamine E (**Reddy et al., 1982**) et réagir avec les radicaux hydroxyles directement pour interrompre la chaîne d'oxydation (**Hermes-Lima, 2005**).

#### 2.3.2.2. Les antioxydants exogènes

Les principaux antioxydants issus de l'alimentation sont la vitamine E, la vitamine C, les flavonoïdes et les caroténoïdes. Ces molécules sont capables d'interrompre la chaîne de réaction radicalaire (**Cadenas, 1989**). Ici on cite :

##### A. La vitamine E

C'est un antioxydant liposoluble. De ce fait, elle cette vitamine est capable d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique (**Singh et al., 2005**).

##### B. Les caroténoïdes

Sont également des molécules liposolubles produites par les plantes et qui doivent être apportées par l'alimentation chez les animaux. Leur potentiel antioxydant pour lutter contre la peroxydation lipidique est très connu et ils sont aptes de réagir avec les radicaux libres de trois manières : par le transfert d'électron, d'hydrogène ou la liaison directe avec le radical (**Tanumihardjo, 2013**).

### 3. Antimicrobiens et résistance bactérienne

Les antibiotiques sont une découverte thérapeutique importante dans la lutte contre les infections, ces médicaments jouent un rôle important dans le traitement des maladies infectieuses ce qui entraîne leur utilisation excessive et sélective (**Levy, 1992**). Cette utilisation abusive des antibiotiques est à l'origine de la résistance des bactéries aux agents antimicrobiens connus d'où la nécessité de chercher de nouvelles molécules naturelles comme les extraits bruts des plantes qui ont commencé à avoir beaucoup d'attention comme source potentielle de molécules antimicrobiennes. Les *Lamiaceae* sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme extraits à qualité médicale (**Ykhlef et al., 2011**).

#### 3.1. Modes d'action des agents antibactériens

Les molécules à effet antibactérien peuvent exercer leur activité contre les bactéries en utilisant différents mécanismes d'action, essentiellement, l'inhibition de synthèse de la paroi

bactérienne ou la membrane plasmique, ainsi que l'inhibition de la synthèse protéique et la synthèse d'ADN (Figure 2) (Mainardi, 2015).

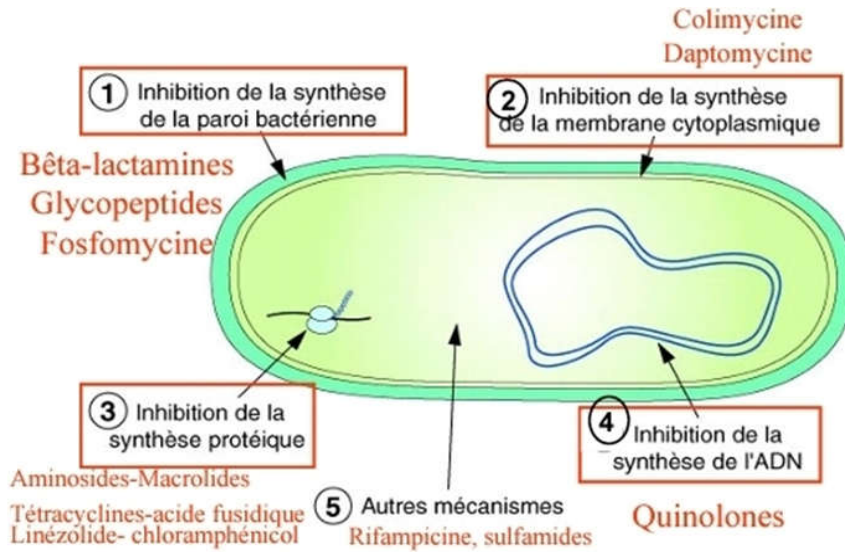


Figure 02 : Modes d'action des antibiotiques sur les bactéries (Mainardi, 2015).

### 3.2. Mécanismes de la résistance aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être soit naturelle soit acquise. Il y a quatre grands mécanismes de résistance, dont le mécanisme exercé dépend du mode d'action de l'antibiotique (Mainardi, 2015) :

- 1- Enzymatique.
- 2- Modification de la cible.
- 3- Imperméabilité.
- 4- Efflux.

## 4. Les polyphénols

### 4.1. Définition

Les polyphénols sont des composés spécifiques du règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires très variées qui consiste d'une classe constituée d'environ 8000 composés, divisés en plusieurs catégories dont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins (Middleton et al., 2000). Leur structure est caractérisée par la présence d'au moins un cycle aromatique (Cheynier et al., 1997) ; ils jouent un rôle essentiel dans la physiologie des plantes et ont des propriétés potentielles pour la santé de l'organisme humain comme des antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cancéreux, antibactériens, antiviraux et antifongiques (Daglia et al., 2012).

## 4.2. Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (Tableau 2) (Clifford, 1999).

**Tableau 02** : Les différentes classes des composés phénoliques (Daayf et Lattanzio, 2008).

Squelette carboné	Classes de composés phénoliques
C6	Phénols simples et benzoquinones
C6-C1	Acides phénoliques
C6-C2	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C6-C3	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C6-C4	Naphthoquinones
C6-C1-C6	Xanthonnes
C6-C2-C6	Stilbènes et anthraquinones
C6-C3-C6	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C6-C1) <sub>2</sub>	Tannins hydrolysables
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes et néolignanes
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Biflavonoïdes
(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignines
(C6) <sub>n</sub>	Catéchols

### 4.2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe des polyphénols, avec plus de 6000 composés (Erlund, 2004). Leur structure est composée de deux cycles aromatiques (cycle A et B) et un hétérocycle (cycle C) central formant une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>(Figure 3). Ces métabolites secondaires sont généralement des pigments localisés dans les feuilles, les fleurs et les fruits et sont connus par leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Hadjali, 2017).

Les flavonoïdes sont classés principalement en flavones, flavonols, flavanols, flavanones, anthocyanidines et isoflavones (Figure 4) (Effendi et al., 2008).

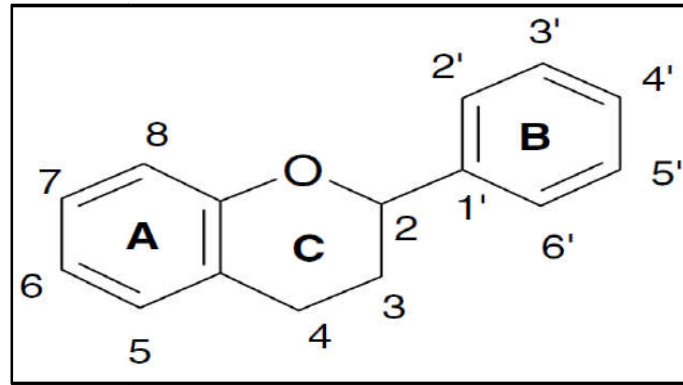


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes (Balasundram *et al.*, 2006).

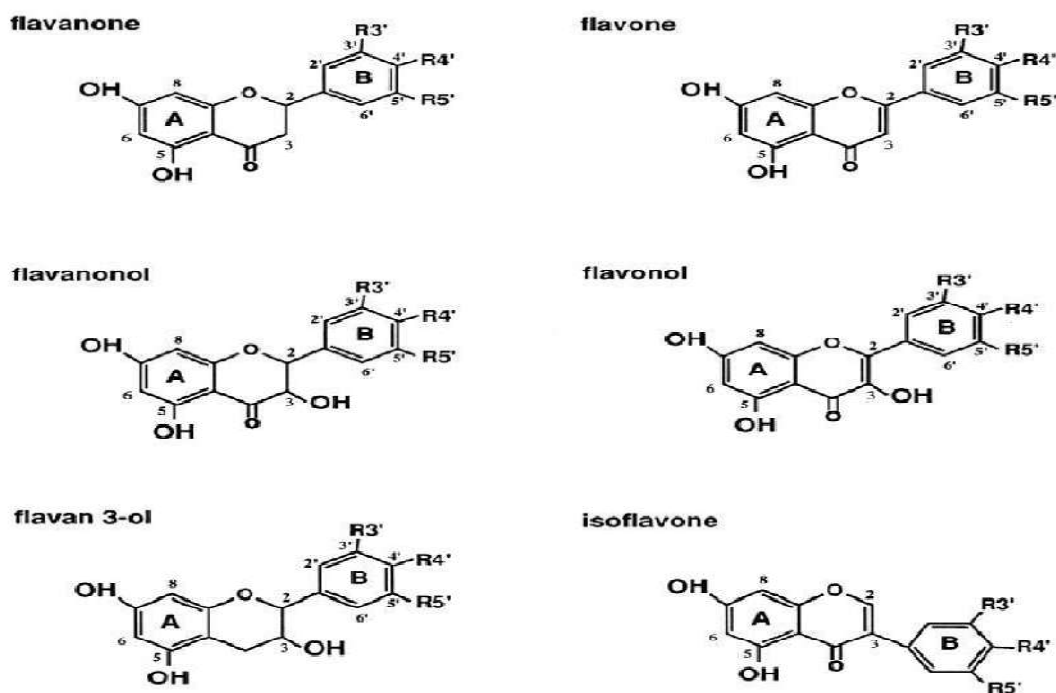


Figure 04 : Structures des différentes classes de flavonoïdes (Bakkali *et al.*, 2008).

#### 4.2.2. Les tannins

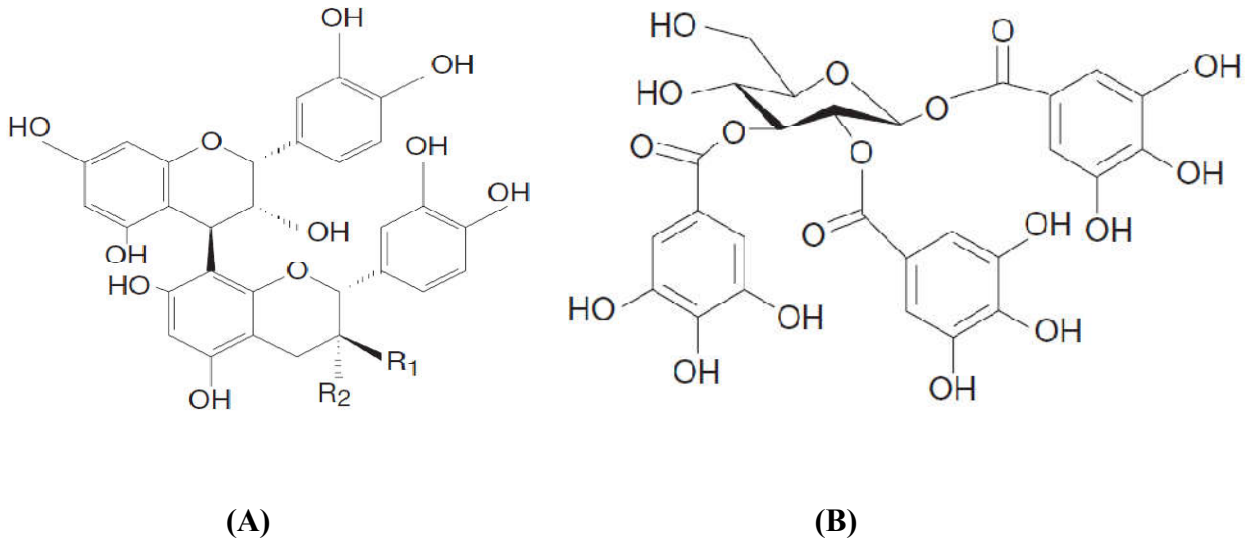
Les tannins sont des substances d'origine végétale présentes dans toutes les parties de la plante, non azotées, de structure polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool et l'acétone, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da (Saad, 2017). Ce sont classés en deux groupes selon leur structure chimique (Figure 5) (kholkhal, 2014) :

##### 4.2.2.1. Les tannins condensés

Leur structure est plus complexe et résistante à hydrolyse. Ce sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C<sub>4</sub> et C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub> et C<sub>6</sub>.

#### 4.2.2.2. Les tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés. Ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique.



**Figure 05** : Structure chimique (a) d'un tannin condensé (proanthocyanidine) et (b) d'un gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose) (Sikora, 1990).

# **Chapitre II :**

## **Matériel et Méthodes**

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

La plante *Marrubium vulgare* (Figure 6) a été récoltée en Novembre 2021 de la région Hammam Dalaâ à M'sila. L'identification botanique a été confirmée par Pr. Laouar Hocine (Université Ferhat Abbas-Sétif 1). La partie aérienne de la plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec pendant une semaine. Après séchage, le matériel végétal a été broyé pour être utilisé ultérieurement dans l'extraction.



-A-

-B-

**Figure 06:** *Marrubium vulgare*. A : Plante dans son environnement, B : Partie aérienne.

### 1.2. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont des souches de références (Tableau 3). Les bactéries ont été fournies par le laboratoire de microbiologie du département de Microbiologie et Biochimie.

**Tableau 3 :** Souches bactériennes utilisées dans l'étude de l'activité antimicrobienne.

<b>SOUCHE</b>	<b>Gram</b>	<b>Référence</b>
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC22922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	ATCC27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC22923

ATCC: American type culture collection.

### 1.3. Produits Chimiques

Tous les produits chimiques utilisés proviennent de Sigma, Fluka, Biochem et pro lab. Les solvants utilisés proviennent de Sigma-Aldrich, Honeywell et AnalaR NORMAPUR.

## 2. Méthodes

### 2.1. Extraction

Afin d'obtenir les molécules actives de la plante étudiée, on a utilisé quatre solvants de polarités différentes : l'eau distillée, le méthanol, l'acétone et l'hexane.

#### 2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

Dans un flacon, 50g du matériel végétal ont été macérés dans 500ml d'eau distillée à 70°C avec agitation durant une heure. Le mélange a été laissé deux jour à température ambiante et à l'abri de lumière avec une agitation occasionnelle. Ensuite, l'ensemble a été filtré par du coton puis par du papier whatman. Le filtrat a été soumis à une évaporation par un rotavapor pour éliminer l'eau. L'extrait obtenu a été séché à l'étuve et conservé dans des eppendorfs à 4°C jusqu'à utilisation (**Gnanaprakash et al., 2010**).

#### 2.1.2. Préparation des extraits organiques

L'extraction a été effectuée selon la méthode décrite par Siracusa et ses collaborateurs en 2011. 50g de la poudre du matériel végétal ont été macérés dans 500 ml d'hexane pendant deux jours avec une agitation occasionnelle à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après filtration et évaporation, l'extrait d'hexane est obtenu. Les résidus végétaux ont été macérés ensuite dans l'acétone puis le méthanol, filtrés et évaporés en suivant la même méthode utilisée pour l'hexane. Les extraits ont été séchés à l'étuve et conservés dans des eppendorfs à 4°C jusqu'à utilisation.

Le rendement en extrait est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec de la plante et est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement Ext \%} = \text{MExt} / \text{MEch} \times 100$$

Où

**MExt**: Masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

**MEch**: Masse de l'échantillon végétal en g.

### 2.2. Etude phytochimique

Afin de vérifier la présence ou l'absence des composés chimiques les plus importants dans les extraits de la plante, on a effectué quelques tests simples selon la méthode décrite par Sunil et ses collaborateurs (2012).

#### 2.2.1. Les flavonoïdes

On ajoute à 1ml d'extrait de concentration 4mg/ml quelques gouttes d'hydroxyde de sodium (NaOH).L'apparition de la couleur jaune intense qui disparaît à l'addition de quelques gouttes d'acide dilué indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait.

#### 2.2.2. Les tannins

Pour vérifier la présence des tannins, on place 1 ml d'extrait (concentration 4mg/ml) dans un tube à essai plus quelques gouttes de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) 0.1%. En cas de présence des tannins on obtient un précipité noir bleuâtre ou noir verdâtre.

#### 2.2.3. Les quinones

On place dans un tube à essai 500  $\mu\text{l}$  de l'extrait à une concentration de 4 mg/ml et 500  $\mu\text{l}$  d'acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ce qui conduit à l'apparition de la couleur rouge en cas de présence des quinones.

#### 2.2.4. Les terpénoïdes

On mélange 1ml de chaque extrait (4mg/ml) avec 0.5ml de chloroforme. Puis, 0.75 ml d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) sont ajoutés doucement. Si un anneau brun rougeâtre apparaît à l'interfacedes on conclue la présence des terpénoïdes dans l'extrait.

#### 2.2.5. Les saponines

500  $\mu\text{l}$  d'extrait (4mg/ml) sont dilués par 3 ml d'eau distillée et agités rapidement pendant 15 minutes. L'apparition d'une couche stable de mousse indique la présence des saponines.

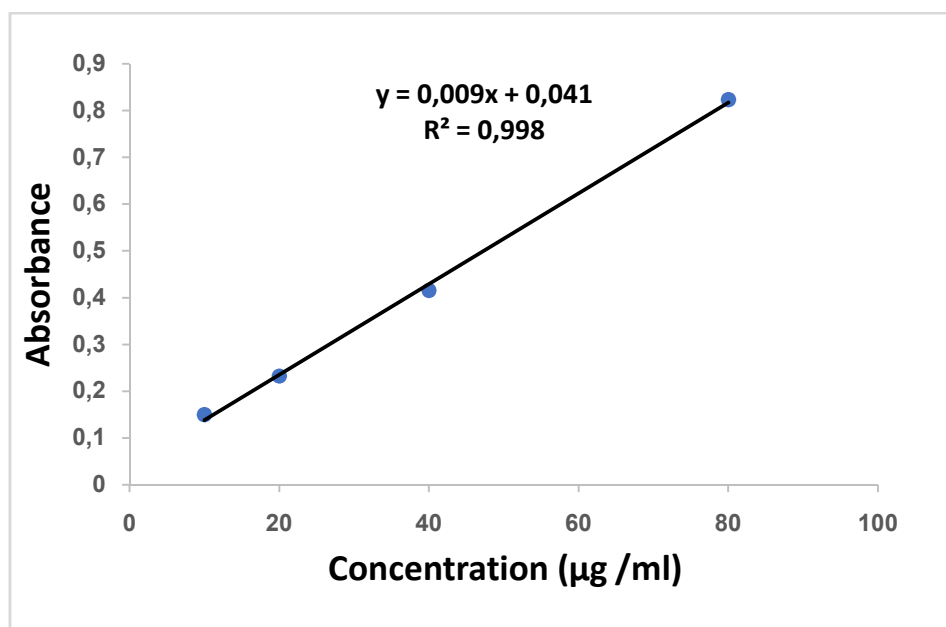
### 2.3. Dosages de quelques métabolites secondaires

#### 2.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué par le test de Folin-Ciocalteu (**Li et al., 2007**). Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). Ces constituants sont réduits par

les polyphénols présents dans les extraits ce qui mène à la formation de produits de couleur bleue, évaluée par un spectrophotomètre à 765 nm. Cette couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10%) est ajouté à 200 µl de chaque extrait à une concentration de 2 mg/ml ou à 200 µl de DMSO utilisé pour dissoudre les extraits (blanc). Après avoir agité et incubé durant 4 min, on ajoute 800 µl de carbonate de sodium à 75 g/l ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). L'ensemble est incubé à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 h. L'absorbance est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 765 nm. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 7) est préparée et les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g E).

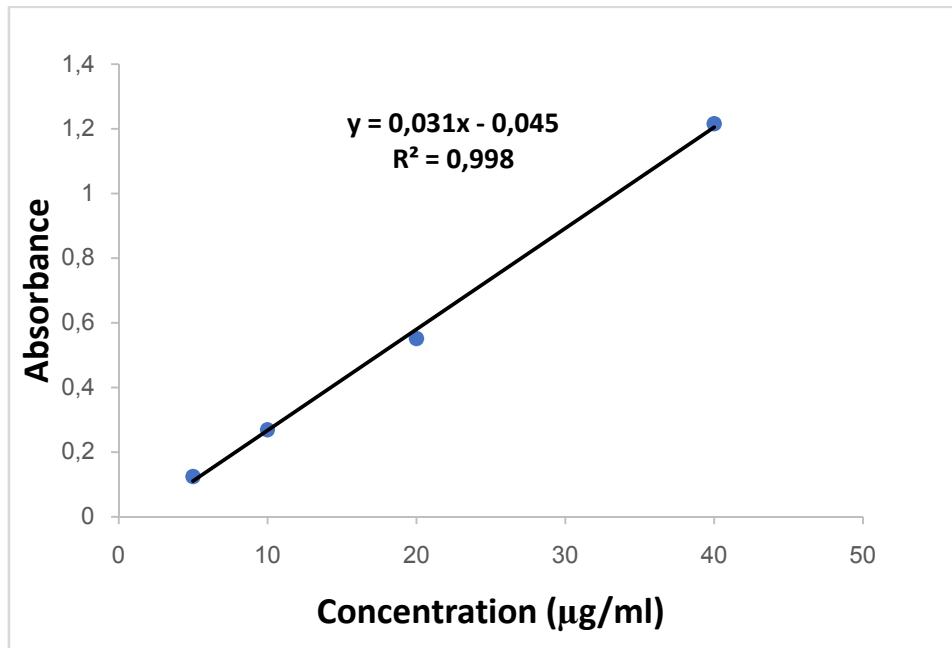


**Figure 07** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.  
Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

### 2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été évaluée selon la méthode de trichlorure d'Aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) (Bahorun et al., 1996). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation d'aluminium. La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait.

Brièvement, 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'extrait préparé à une concentration de 2 mg/ml dissout dans le DMSO. Après incubation à l'obscurité durant 10 min, l'absorbance est mesurée à  $\lambda = 430$  nm. La concentration en flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (Figure 8) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ}/\text{mg E}$ ).



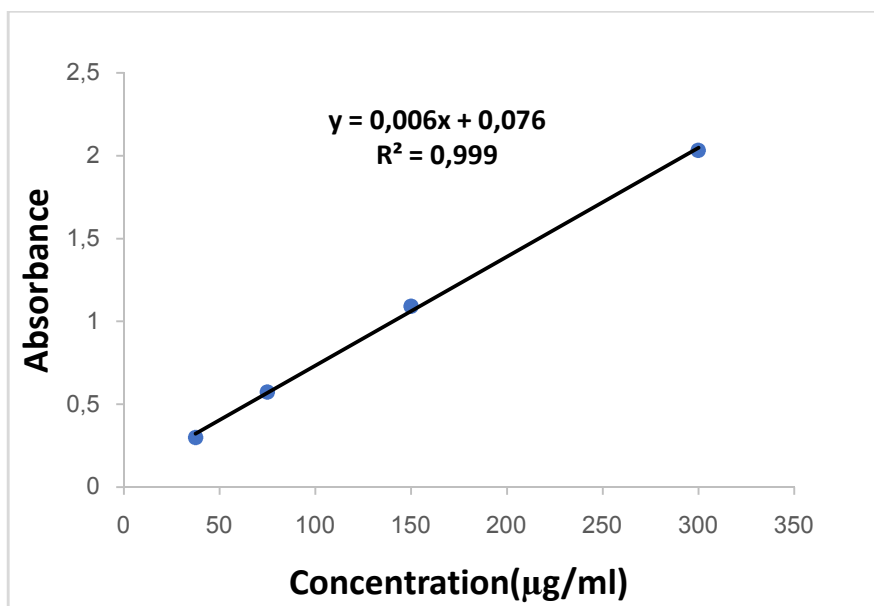
**Figure 08** : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

### 2.3.3. Détermination de la teneur totale en tannins

Selon la méthode décrite par Prasanth et ses collaborateurs en 2017, le dosage des tannins est effectué en utilisant le réactif Folin et l'acide tannique comme standard.

Le milieu réactionnel est préparé en ajoutant 350  $\mu\text{l}$  de chaque extrait (2 mg/ml dans le DMSO) à 1.5 ml de Folin-Ciocalteu (10%). Après agitation, 1.5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%) ont été ajoutés et le mélange est incubé pendant 45 min à 45°C. L'absorbance est déterminée à  $\lambda = 765$  nm. L'acide tannique est utilisé comme standard à différentes concentrations comme suit : 37.5, 75, 150 et 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figure 9). Les teneurs en tannins totaux sont exprimées en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide tannique par mg d'extrait sec ( $\mu\text{g EAT}/\text{mg E}$ ).



**Figure 09** : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.

## 2.4. Etude de l'activité antioxydante des extraits de la plante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de la plante *Marrubium vulgare*, deux tests différents ont été effectués : FRAP et  $\beta$  carotène/acide linoléique.

### 2.4.1. Pouvoir réducteur de fer (FRAP ou Ferric Reducing Antioxidant Power)

On a estimé l'activité antioxydante totale des extraits par l'évaluation du pouvoir antioxydant réducteur ferrique. Ce test est effectué selon la méthode décrite par Maruthamuthuet et Kandasamy (2016). Il se base sur la réduction de l'ion ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

#### 2.4.1.1. Préparation du tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6)

On dissout dans 800ml de l'eau distillée 8 g de chlorure de sodium (NaCl), 0,2 g de chlorure de potassium (KCl), 1,44 g de disodium-hydrogéné-phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0,24 g de dihydrogéné-phosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Après ajustement du ph à 6,6 par l'acide chlorhydrique, on ajoute l'eau distillée jusqu'à un volume total de 1L.

### 2.4.1.2. Réalisation du test

On ajoute à 500 µl de solution d'échantillon (les différents extraits) à différentes concentrations (0.5, 1 et 2 mg /ml) 1250 µl de tampon phosphate (pH 6,6) puis 1250 µl de potassium hexacyanoferrate [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Après agitation et incubation à 50°C au bain marie pendant 20 minutes, on ajoute 1250 µl d'acide trichloracétique (TCA à 10%) et le mélange est soumis à une centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 minutes. 1250 µl de surnageant sont ensuite transférés dans un autre tube auquel on ajoute 1250 µl d'eau distillée et 250 µl de Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub> à 0,1%), l'ensemble est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance est effectuée à 700 nm ; une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. Un blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le DMSO. Le contrôle positif utilisé est représenté par l'acide ascorbique préparé à différentes concentrations. Chaque solution est répétée trois fois.

### 2.4.2. Test de β- carotène/acide linoléique

La capacité antioxydante des extraits a été estimée en mesurant l'inhibition des composés organiques volatils et les hydroperoxydes conjugués diène qui résultent de l'oxydation de l'acide linoléique. Le test est réalisé selon la méthode décrite par Dapkevicius et ses collaborateurs (1998).

La préparation de la solution de bêta-carotène consiste à dissoudre 0,5 mg de bêta-carotène dans 1 ml de chloroforme, auquel on ajoute 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme par rotavapor (40°C), on ajoute 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sous agitation. De l'émulsion obtenue, 2,5 ml sont placés dans des tubes à essai et 350 µl de chaque extrait sont ajoutés à une concentration de 3 mg/ml ou de l'hydroxytoluènebutylé (BHT) utilisé à la même concentration comme témoin positif, ou encore du DMSO utilisé comme témoin négatif. L'absorbance des solutions est mesurée à 490 nm au temps « 0 » puis à différents intervalles de temps : 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures, 24 heures et 48 heures.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la loi suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (At/At_0) \times 100$$

At : absorbance au temps (t).

At<sub>0</sub> : absorption initiale.

## 2.5. Etude de l'activité antibactérienne des extraits de la plante

### 2.5.1. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été activées initialement dans un bouillon nutritif. Après incubation à 37°C pendant 24 h, les bactéries ont été ensemencées sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 h à 37°C. Ensuite, une colonie de chaque bactérie est transférée par repiquage dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation, l'inoculum a été ajusté à une turbidité standard de 0,5 McFarland, ce qui correspond à une densité optique de 0,08-0,13 à une longueur d'onde de 620 nm. La concentration finale de l'inoculum est d'environ  $10^7$ - $10^8$ UFC/ml (**Khribch *et al.*, 2018**).

### 2.5.2. Méthode des puits de diffusion

Dans ce test, des puits de 7mm sont creusés dans la gélose de Mueller-Hinton Agar (MHA) coulée dans des boîtes de Pétri (à trois points équidistants des bords et du centre de la boîte) et ensemencée par écouvillonnage de suspension bactérienne de  $10^7$  germes/ml, préparée comme ci-dessus. Les quatre extraits ont été dissouts dans le DMSO à une concentration 200 mg/ml et 30 µl de chaque extraitsont incorporés dans chaque puits. Une pré-incubation de 1 h à 4°C a été faite pour que l'extrait puisse diffuser dans le milieu. L'extrait a été remplacé par le DMSO dans le témoin négatif et la gentamycine a été utilisée comme contrôle positif. Les boites ensemencées ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres d'inhibition sont ensuite mesurés autour des puits (**Bouyahya *et al.*, 2017**).

La sensibilité des bactéries aux extraits a été classée par le diamètre des halos d'inhibition comme suit : résistantes ( $\emptyset < 08$  mm), sensibles ( $09 < \emptyset < 14$  mm), très sensibles ( $15 < \emptyset < 19$  mm) et extrêmement sensibles ( $\emptyset > 20$  mm) (**Ponce *et al.*, 2003**).

## 2.6. Etude statistique

Les courbes et les graphiques sont tracés par Microsoft Excel 2007. L'étude statistique est effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.04. Les résultats des tests qui ont été effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. La signification statistique est déterminée par le test ANOVA-one way et les différences sont considérées statistiquement significatives au niveau de  $p < 0,05$ .

# **Chapitre III :**

## **Résultats et Discussion**

## 1. Extraction

On a obtenu à partir des parties aériennes de la plante *M. vulgare* quatre extraits (aqueux, méthanol, acétone et hexane) en utilisant la technique de macération. À partir de 50 g de la poudre macérée dans 500 ml de chaque solvant on a eu des résultats de rendements exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse initiale du matériel végétal. Les rendements obtenus sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau 04 :** Rendements des extractions aqueuse et organiques de *M.vulgare*.

Extrait	Rendement (%)
Aqueux	10.60
Méthanol	08.50
Acétone	03.36
Hexane	01.84

A partir des résultats obtenus, l'extrait aqueux a donné le rendement le plus élevé (10.6%) par rapport aux autres extraits. L'extrait aqueux est suivi par l'extrait méthanolique dont le rendement est égale à 8.5%, puis l'extrait acétone (3.36%) et enfin l'extrait d'hexane qui a montré le rendement le plus faible (1.84%).

L'utilisation de plusieurs solvants de polarités différentes permet d'obtenir le maximum de constituants chimiques des plantes (**Fleurentin et al., 1991**).Le rendement de l'extraction dépend de plusieurs facteurs à savoir la nature du solvant, la méthode d'extraction, la durée de macération, la vitesse d'agitation du matériel végétal dans le solvant, la température, la nature chimique de l'échantillon et la durée de séchage (**kouwelton et al., 2017**).

## 2. Etude phytochimique

Les résultats des divers tests phytochimiques effectués sur les extraits sont présentés dans le tableau 5.

Les tests utilisés dans l'étude phytochimique préliminaire sont visés pour donner les différents groupes de composés contenus dans chaque fraction de la plante. Selon les résultats obtenus, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les quinones sont présents dans tous les extraits étudiés, alors que les tannins sont absents seulement dans l'extrait d'hexane. Les saponines sont présentes seulement dans l'extrait de méthanol.

**Tableau 05** : Analyse phytochimique des différents extraits de *Marrubium vulgare*.

Extrait	Aqueux	Méthanol	Acétone	Hexane
Flavonoïdes	+	+	+	+
Saponines	-	+	-	-
Tannins	+	+	+	-
Terpenoïde	+	+	+	+
Quinones	+	+	+	+

(+) : présence, (-) : absence.

Les flavonoïdes et les tannins appartiennent au groupe des polyphénols qui sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Les quinones, connus pour leur activité antimicrobienne, possèdent des cycles aromatiques avec deux substituants cétones et les terpénoïdes sont des précurseurs pour la synthèse des stéroïdes dans les plantes (Tiwari et al., 2011).

### 3. Dosage des composés phénoliques de la plante

Afin de déterminer les teneurs des composés phénoliques, à savoir les phénols totaux, les flavonoïdes et les tannins totaux dans les extraits préparés de la plante, des tests spectrophotométriques ont été utilisés. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 06** : Dosage des polyphénols, flavonoïdes et tannins totaux dans les extraits de *M.vulgare*.

Extrait	Teneur en polyphénols (µg EAG/mg E)	Teneur en flavonoïdes (µg EQ/mg E)	Teneur en tannins (µg EAT/mg E)
Aqueux	60.84±5.80	05,37±0.13	75.54±4.77
Méthanol	45.68±0.00	25,05±0.46	81.29±5.00
Acétone	19.31±1.28	100.13±1.27	61.41±0.23
Hexane	09.81±0.44	52.73±1.58	14.95±1.11

EAG : équivalent d'acide gallique, EQ : équivalent de quercétine, EAT : équivalent d'acide tannique, E : extrait.

Selon le tableau, l'extrait aqueux est le plus riche en polyphénols par rapport aux autres extraits (60.842µg EAG/mg E), suivi par l'extrait méthanolique (45.68µg EAG/mg E), tandis que l'extrait acétone et l'hexane sont les plus pauvres en polyphénols avec des teneurs proches (19.31 et 9.81 µg EAG/mg E, respectivement). On peut noter que la teneur des extraits en polyphénols est proportionnelle à leur polarité. D'après une étude réalisée par Ghedadba et ses collaborateurs (2014), les extraits aqueux et méthanolique de la plante ne contiennent que 3.07 et 3.42 mg EAG/g E, respectivement. Les extraits dans la présente étude sont donc plus riches en polyphénols. Dans une autre étude effectuée par Mssillou et collaborateurs en 2021 sur la même plante récoltée au Maroc, l'extrait d'acétone/eau contenait 112 mg EAG/g E, tandis que l'extrait éthanol/eau a donné une valeur de 98.77 mg EAG/g E.

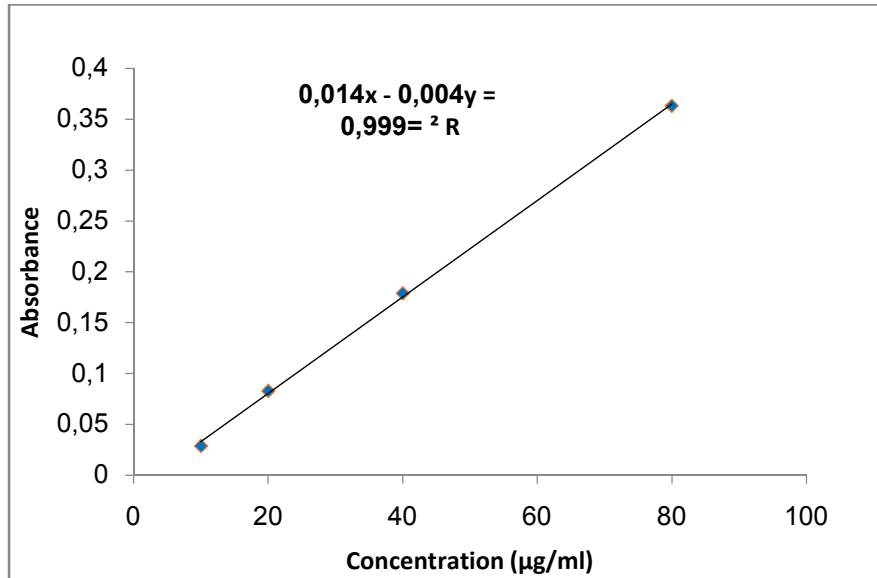
Pour les flavonoïdes, la teneur la plus élevée a été obtenue dans l'extrait d'acétone (100.1 µg EQ/mg E), suivi de l'extrait d'hexane (52.73µg EQ/mg E), puis méthanolique (25,05µg EQ/mg E) et enfin l'extrait aqueux (5,37µg EQ/mg E). Dans la même étude citée précédemment réalisée par Ghedadba *et al.* (2014), les extraits méthanolique et aqueux de la plante contenaient 18 et 4.34 µg EQ/mg E, ces résultats sont très proches des valeurs trouvées dans notre étude. Dans l'étude réalisée par Mssillou (2021), les extraits acétone/eau et éthanol/eau contenaient 21.08 et 17.65 µg EQ/mg E ; les extraits dans notre étude sont donc plus riches en flavonoïdes.

La quantification des tannins dans les extraits a révélé que les quantités les plus élevées sont trouvées dans les extraits de méthanol et aqueux où les valeurs sont proches (81.29et 75.54µg EAT/mg E, respectivement), suivis de l'extrait d'acétone avec une concentration de 61.41µg EAT/mg E et enfin de l'extrait hexane avec une concentration de 14.95µg EAT/mg E. Ces résultats sont légèrement élevés en comparaison à ceux obtenus par Mssillou *et al.* en 2021, où les extraits éthanol/eau et acétone/eau ont donné des valeurs de 65.51 et 46.96 µg EAT/mg E.

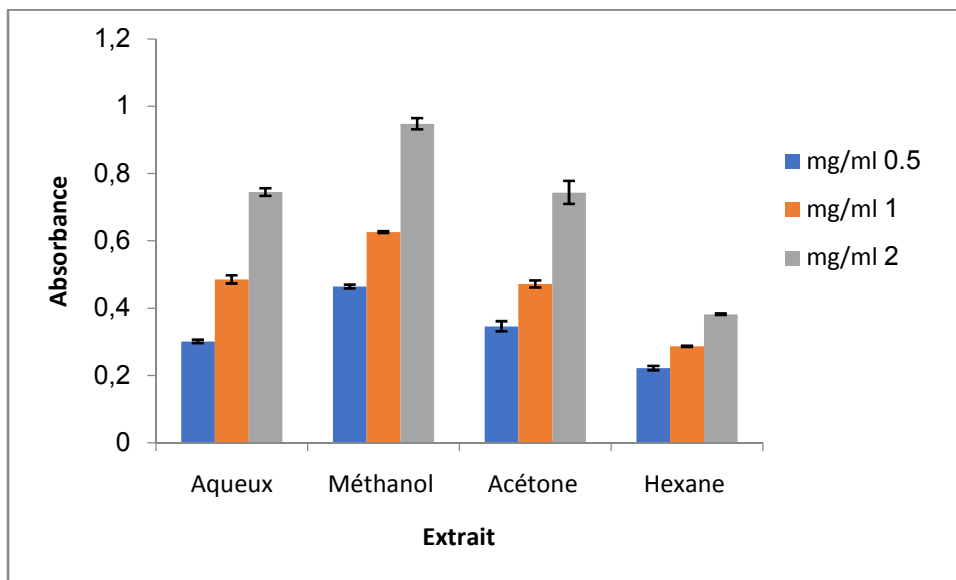
## **4. Activité antioxydante des extraits de *Marrubium vulgare***

### **4.1. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)**

L'activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de la plante a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Les résultats sont résumés dans les figures 10 et 11.



**Figure 10 :** Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique. Chaque point représente la moyenne de trois répétitions.



**Figure 11 :** Pouvoir réducteur des extraits de *Marrubium vulgare*. Chaque valeur représente la moyenne de trois répétitions  $\pm$  SD.

Les antioxydants ont la capacité de réduire les ions ferriques en donnant un électron tout en convertissant le fer de la forme  $Fe^{3+}$  à la forme  $Fe^{2+}$ . Cette réaction se manifeste par le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (Bentabet et al., 2014).

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur des extraits de la plante et de l'acide ascorbique est dose-dépendant, c'est-à-dire que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à la concentration des d'extraits et du standard utilisé. La capacité des extraits à réduire le fer est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique dont la valeur de l'absorbance de ce dernier est de 0.35 pour la concentration 80 µg/ml. Parmi les extraits, la fraction méhanolique a montré la meilleure capacité réductrice ( $A = 0,94$ ) par rapport aux autres extraits pour la même concentration (2mg/ml), suivi de l'extrait aqueux et acétonique avec presque la même valeur (0,745 et 0.743, respectivement), l'extrait d'hexane qui a eu la plus faible capacité réductrice ( $A = 0,38$ ). On remarque que le pouvoir réducteur des extraits est proportionnel à leur contenu en tannins. Le potentiel réducteur des extraits est sans doute lié à la présence des molécules capables de donner des électrons comme les tannins (**Ferreira et al., 2006**).

Dans l'étude de Mssillou et collaborateurs (2021), l'extrait éthanolique a donné un pouvoir réducteur plus élevé que l'extrait d'acétone ce qui est en accord avec nos résultats. Ils ont trouvé que l'IC<sub>50</sub> de la fraction d'éthanol est égale à 4.51 mg/ml, alors que celle de l'extrait d'acétone est de 6.43 mg/ml.

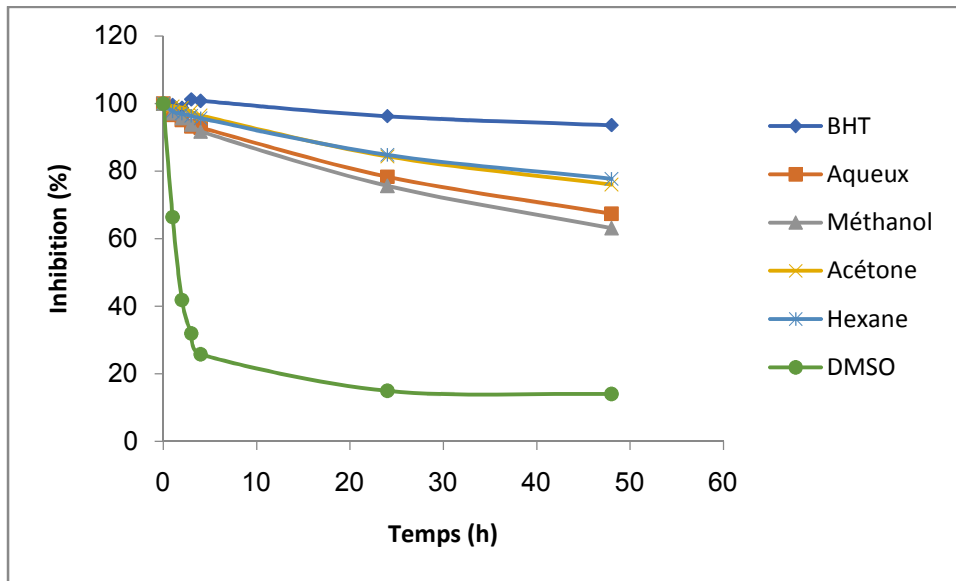
#### 4.2. Test de $\beta$ - carotène/acide linoléique

La technique de blanchissement du  $\beta$ -carotène vise à évaluer l'activité antioxydante des extraits par l'inhibition de la peroxydation lipidique en suivant l'absorbance au cours du temps. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport à l'absorbance initiale (Figure 12).

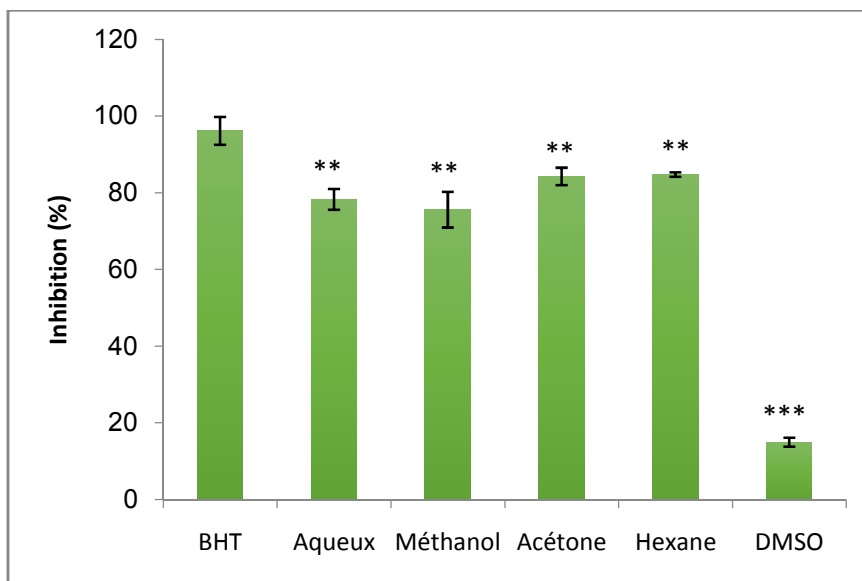
L'oxydation de l'acide linoléique donne des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont oxyder le  $\beta$  carotène, ce qui cause la disparition de sa couleur orange. En présence des antioxydants des extraits, ces molécules protègent le composé de  $\beta$ -carotène ce qui ralentie la disparition de sa couleur. Le blanchissement est suivie spectrophotométriquement à 490 nm (**Manallah, 2012**).

Les résultats montrent que dans le blanc DMSO (contrôle négatif), le pourcentage d'inhibition diminue rapidement au cours du temps, alors qu'en présence des extraits et du BHT la diminution est ralentie.

(A)



(B)



**Figure 12 :** (A). Activité antioxydante des extraits aqueux et organiques de *Marrubium vulgare* par rapport aux témoins (BHT et DMSO) par le test du  $\beta$ -carotène/acide linoléique durant 48h. (B). Pourcentages d'inhibition des extraits aqueux et organiques et des témoins par le test du  $\beta$ -carotène/acide linoléique après 24h. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions  $\pm$  écart type. Comparaison au BHT : (p<0.01)\*\*, (p<0.001)\*\*\*.

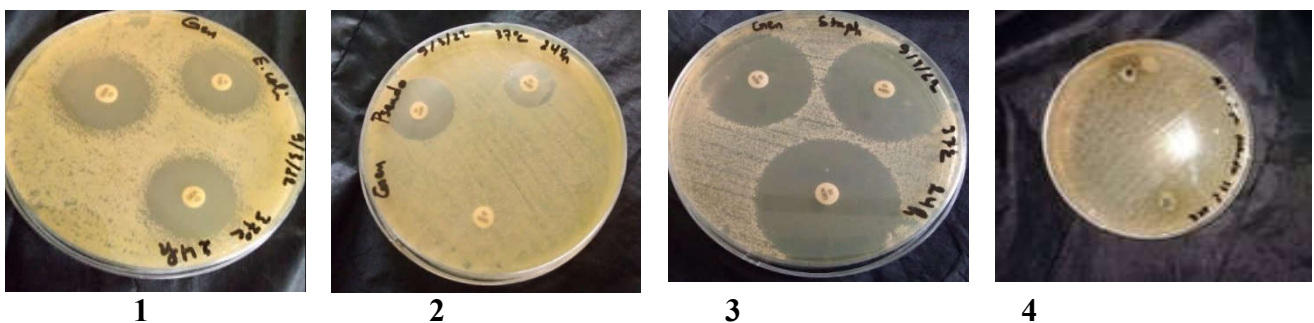
Après 24 h d'incubation, l'activité antioxydante la plus élevée est présentée par l'extrait d'hexane (84,82%) et l'extrait d'acétone (84,35%) avec des valeurs très proches ; puis l'extrait aqueux (78,34%) et méthanolique (75,65%) qui ont donné des activités presque similaires. La meilleure activité a été enregistrée par le BHT (un antioxydant synthétique) avec un pourcentage d'inhibition de 93.57%. A la lumière de ces résultats, les extraits de la plante ont un effet inhibiteur significatif contre la peroxydation lipidique surtout pour les extraits d'hexane et d'acétone par rapport au BHT.

Plusieurs facteurs semblent moduler les résultats d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique à savoir la nature liposoluble ou hydrosoluble des antioxydants mais aussi leur concentration. Dans cette étude les extraits les moins polaires ont donné la meilleure activité.

Selon l'étude réalisée par Ghedadba et *al.* (2014), le pourcentage d'inhibition en utilisant le même test pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux est de 63.77% et 56.63%, respectivement. Une autre étude effectuée par Rezgui et *al.* (2021) a mentionné que l'extrait méthanolique de la plante a donné une inhibition de 46.41%, mais en utilisant une méthode un peu modifiée.

### 5. Activité antibactérienne des extraits de *M. vulgare*

Le pouvoir antibactérien des quatre extraits de la plante *Marrubium vulgare* à été déterminé par la méthode des puits de diffusion en utilisant trois souches bactériennes de Gram positif et négatif. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 13.



**Figure 13 :** Activité antibactérienne de la gentamycine (contrôle positif) contre *E. coli* (1), *P. aeruginosa* (2) et *S. aureus* (3) et de l'extrait aqueux de *M. vulgare* contre *P. aeruginosa*(4).

Les résultats montrent que les extraits de la plante n'ont montré aucune activité contre les souches utilisées à une concentration maximale de 200 mg/ml. De même, le control négatif (DMSO) n'a pas eu un effet sur les bactéries. La gentamycine qui a été utilisée comme

contrôle positif a montré une activité vis-à-vis des trois souches, avec des zones d'inhibition de l'ordre de  $35.33 \pm 0.57$  mm pour *S. aureus*,  $25 \pm 1$  mm pour *E. coli* et  $20.50 \pm 4.94$  mm pour *P. aeruginosa*.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ghedadba et *al.* en 2014, où les extraits de *Marrubium vulgare* n'avaient montré aucune activité contre les mêmes trois souches utilisées dans notre étude, à une concentration allant jusqu'à 1000 mg/ml. Dans l'étude de Mssillou et *al.* en 2021, les extraits éthanolique et acétonique de la plante n'ont montré aucun effet inhibiteur contre *S. aureus*, ce qui est en accord avec nos résultats ; alors que la fraction méthanolique a montré une petite zone d'inhibition de 11.66 mm contre *E. coli* à une concentration de 1000 mg/ml, au contraire de la fraction acétonique qui n'a pas eu un effet sur cette souche.

**Conclusion  
et  
perspectives**

Les plantes médicinales sont la source idéale de composé actifs, c'est pourquoi elles sont largement utilisées dans l'industrie pharmaceutique. Parmi ces composés les plus intéressants et le plus étudiés : les polyphénols. Dans cette étude, le profil en polyphénols, ainsi que les activités antioxydante et antibactérienne des extraits de la plante *Marrubium vulgare*, récoltée de la région de M'sila, sont évalués.

L'étude phytochimique de cette plante a montré la présence de flavonoïdes, tannins, quinones, saponines et terpénoïdes dans les extraits aqueux et organiques de la plante. L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode Folin-ciocalteu a montré la présence de la plus grande quantité de ces métabolites dans l'extrait aqueux, cependant, l'extrait d'acétone a montré la teneur la plus élevée en flavonoïdes et l'extrait méthanolique était le plus riche en tannins. La capacité antioxydante a été évaluée par les tests de FRAP et de  $\beta$ -carotène/acide linoléique ; dans la méthode de FRAP, l'extrait de méthanol avait le pouvoir réducteur le plus élevé par rapport aux autres extraits. L'essai de blanchissement de  $\beta$ -carotène a montré que l'extrait d'hexane avait le pourcentage d'inhibition le plus élevé. En outre, tous les extraits n'ont montré aucun effet contre les différentes souches bactériennes testées.

D'autre-part, on propose d'autres études complémentaires pour l'identification des molécules qui participent dans l'effet antioxydant, ainsi qu'évaluer d'autres activités biologiques potentielles de cette plante.

# **Références bibliographiques**

- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., LuyckyM. & GazinM., 1996 : Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation 31, 1-6.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008) – Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Balasundram ,N ., Sundram., K et Samman.,S (2006) .Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : antioxidants activity , occurrence ,and potential used .*Food chem.* 99:191-203
- Belhattab R., Larous L., Figueiredo, A. C., Santos P.A.G., Costa M.M., Barroso J. G. & Pedro L.G., (2006): Essential Oil Composition and Glandular Trichomes of *Marrubium vulgare* L. Growing Wild in Algeria. *Journal of Essential Oil Research* 18(4), 369–373.
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z. & Boucherit K., 2014 : Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de béchar en algérie. *Phytothérapie* 12, 364 – 371.
- Bremness, Lesley., ( 2005). *The Complete Book of Herbs : A Practical Guide to Growing & Using Herbs*, Montréal, Reader's Digest, 272 p
- Ben Guegua, H., 2010: L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Mémoire de fin d'études. Université de Ouargla. p. 2.
- Bonnot, T. (2009). *Recettes des dieux: esthétique du fétiche*. Paris, musée du quai Branly, et Arles, Actes Sud, 2009. *Gradhiva. Revue d'anthropologie et d'histoire des arts*, (10), 220-223.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., & Ruberto, G. (2012). Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83(2), 286-292.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N., (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie* , 15 (6) :379-383
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79-110.
- Calixto J. B., 2005 : Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personalview. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 131 – 134.
- Cheyrier, V, Fulcrand, H, Sarni, P, & Moutounet, M. (1997). Application des techniques
- Clifford M.N., 1999. Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea *Washington, DC, CRC*.

- Coleman, J.W., 2001. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1397-1406.
- Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T.A. & Linssen P.H., 1998 : Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food. Agr* **77**, 140–146.
- Daayf, F.; Lattanzid, V. Recent advances in poly phenol research 1; Ed: wiley-blackwell. (2008)
- Djahra, A.B., Bordjiba, O. & Benkherara, S. Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie* **11**, 348–352 (2013).
- Dinc M., Mnevver Pinar N., Dogu S. et Yildirimli S. (2006) . microphological studies of *Lallemantia* L . (*Lamiaceae*) species growing in Turkey . *Acta Biol . Cracoviensia Series Bot .*, 51:45-54
- Effendi L., Yajun Y. et al., (2008). Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli* . *Metab. Eng.* **8**: 172-181.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, **24**(10), 851-874
- Evaluation of *Marrubium vulgare* Growing Wild in Tunisia for Its Potential as a Dietary Supplement Foods **10** (11), 2864, 2021
- Ferreria A., Proenca C., Serralheiro L.M.L., Arango M.E.M., 2006 : The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* **108**:31-37.
- Fridorich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutase . *Annu Rev. Biochem* , **64** : 97-112.
- Ganther H.E., 1999 : Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**, 1657-1666.
- Ghedadba, N., Hambaba, L., Aberkane, M. C., Oueld-Mokhtar, S. M., Fercha, N., & Bousselsela, H. (2014). Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*, **2**(2), 64-74.
- Gnanaprakash, K., Madhusudhana Chetty, C., Ramkanth, S., Alagusundaram, M., & Tiruvengadarajan Vs, A. P. S. (2010). Aqueous extract of *Flacourtia indica* prevents carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rat.
- Guignard J.L. (2001)– *Biochimie végétale*. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185.
- Gurib-Fakim A., 2006: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* **27**,1-93.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, **62**(10).

- Halliwell, B. (1996). Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie-biologie*, 44(1), 6-13.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hermes-Lima, M., 2005. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In K. B. Storey (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.
- Hseini, S., & Kahouadji, A. (2007). Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroa*, 28, 79-93.
- Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African journal of biotechnology*, 10(19), 3908-3914.
- Kholkhal, F., (2014). Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus ssp coloratus* et *ssp euciliatus*. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Biologie, Option: Produits naturels, Aspects nutritionnels et Activités Biologiques, Telemcen, Université Abou Bekr, 164.
- Khribch, J., Nassik, S., El houadfi, M., Zrira, S., Oukessou, M., (2018). Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire *Mar. Sci. Agron. Vét*, 6 (3): 300-307 .
- Koné, K. P. F. O., Soro, Y., & Siaka, S. (2017). Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 44, 15-22.
- Kulawik, P., Zogul, F., Glew, R., Zogul, Y. (2013). Significance of antioxidants for seafood safety and human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 475-4916.
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.
- Levy, S. B. (1992). The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle in KHCHATOURIANS GG 1998: Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic resistant bacteria. *JAMC*, 159, 112-1136.
- Mainardi, J. L. (2015). Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques: session interactive autour de l'antibiogramme. Unité Mobile de Microbiologie Clinique, Service de Microbiologie, Hôpital Européen Georges POMPIDOU et Faculté de Médecine Paris René DESCARTES.
- Manallah A ; 2012 : Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Thèse doctorat, Université Ferhat Abbas- Sétif-1.

- Marfak A. (2003) . Radiolyse gamma des flavonoides : Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides . Thèse de doctorat de l'université de Limoges , pp 24-42 .
- Maruthamuthu Vijayalakshmi & Kandasamy Ruckmani., 2016 : Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. Bangladesh J Pharmacol.
- Middleton EJ; Kandaswami C; Theoharides TC .(2000) .The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev 52: 673-751.
- Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. Journal of agricultural and food chemistry, 57(5), 1655-1666.
- Mssillou, I., Agour, A., Hamamouch, N., Lyoussi, B., & Derwich, E. (2021). Chemical Composition and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Marrubium vulgare L. The Scientific World Journal, 2021.
- Murray; Bender; Bothan; Kennlly; Rodwell; wiel (2013). Biochimie de Harper 5 édition De Boech supérieures. Paris; p:561.
- Pierre Lieutaghi., (2004). Le Livres des Arbres, Arbustes & Arbrisseaux , (nouvelle édition par Actes Sud .1322 p.
- Pirani J et Prado J .(2012) Emprypsida, a new name for the class of land plants Taxon ,61(5) : 1096-1098.
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT-Food Science and Technology, 36(7), 679- 68
- Quezel P et Santa S., 1963 : Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desrtiques méridionales. CNRS, Paris.
- Raja R. (2012) medicinally potential of Labiatae (Lamiacea) family : An review , Resear .j.Plant , 1-11.
- Rezgui, M., Basma, M., Neng, N., Nogueira, J. M., Bettaieb Ben-Kaab, L., & Machado Araújo, M. E. (2021). Evaluation of marrubium vulgare growing wild in Tunisia for its potential as a dietary supplement. Foods, 10(11), 2864.
- SAAD.S (2017). Analyse de diversité chimique par les composés phéoliques de *Marrubium deserti de Noé*. Etude ethnobotanique et propriété médicinale. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Biologie, Option: Génétique, physiologie moléculaire microbiologie des plants, université de science et de technologie Houari Boumediene.
- Sikora F.J., McBride M.B., 1990. Aluminium complexation by protocathechuic and caffeic acids as determined by UV spectrophotometry. Soil Sci. Soc. Am. J. 54, 78-86.

## Références bibliographiques

- Singh U., Devaraj S. & Jialal I., 2005: Vitamin e, oxidative stress, and Inflammation. Annual Review of Nutrition 25, 151-175
- Sohal R.S., Mockett R.J. & Orr W.C., 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Rad Biol Med. 33, 575-586.
- Sorg O. ( 2004 ) . Oxidative stress : a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus Biologies ; 327 : 649-662.
- Tanumihardjo S.A., 2013: Carotenoids and Human Health. Humana Press, Springer. USA
- Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G. & Kaur H., 2011 : Phytochemical screening and extraction: a review. Internationale Pharmaceutica Scientia 1, 98-106.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Current neuropharmacology, 7(1), 65-74.
- Venkateshappa S.M . et Sreenath K.P (2013) potential medicinal plants of Lamiaceae . American Intre . J. Rear . Formal . Appl , Nat , Sci ., 3:82.87.
- Wichtel M. et Anton R. (1999) - Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc
- Walker J , B , Sytsma K.J., Treien J et Wink M.(2004) .Silva (Lamiaceae )is not Monophyletic : implication for the systematic radiation ,and ecological specialiazation of Salvia and tribe Mentheae American J.Bot ,91:11155-1125.
- Yakhlef, G., Laroui, S., Hambaba, L., Aberkane, M. C., & Ayachi, A. (2011). Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. Phytothérapie, 9(4), 209-218.

19-22 MAY, 2022

## Effect of Different Extracting Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts From Algerian *Marrubium vulgare*

Khadidja DEHIMI<sup>1,2</sup>, Chahinez BOUSSAG<sup>1</sup>, Rim BAHRI<sup>1</sup>, Rayane DJEZAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of M'sila, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratory of Phytotherapy applied to chronic diseases, University of Setif 1, Algeria.

[khadidja.dehimi@univ-msila.dz](mailto:khadidja.dehimi@univ-msila.dz)

### ABSTRACT

*Marrubium vulgare* (Lamiaceae), known in Algeria as «Merriouet», is a medicinal herb originated in Mediterranean area and central Asia, nowadays is common in all continents. It is used in folk medicine to treat many illnesses but especially digestive disorders. In the present study, phenolic profile and antioxidant activity of *M. vulgare* extracts prepared using solvents from different polarities are evaluated. According to the obtained results, total phenols content was proportional to the polarity of solvent used for the extraction; aqueous extract showed the highest amount in polyphenols with a value of 60.84 µg GAE/mg E. Acetone extract was found to be the most rich in flavonoids (100.12 µg QE/mg E), while methanol fraction contained the highest tannins content (81.29 µg TAE/mg E). In the FRAP assay, the capacity of extracts to reduce iron was proportional to their tannins contents, the best activity was obtained by methanol fraction with A = 0.94 at a concentration of 2 mg/ml. In the β-carotene / linoleic acid test, the highest percentage inhibition was obtained by less polar extracts (hexane and acetone) with a value of 84% after 24 h of incubation. Furthermore, all fractions did not have any effect on *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* at a concentration of 200 mg/ml.

**Key words:** *Marrubium vulgare*, Solvent polarity, polyphenols, antioxidant.

### REFERENCES

- Yabrir, B. (2019). Essential oil of *Marrubium vulgare*: Chemical composition and biological activities. A review. Natural Product Sciences, 25(2), 81-91.
- Aćimović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiproviski, B., Sikora, V., & Zeremski, T. (2020). *Marrubium vulgare* L.: A phytochemical and pharmacological overview. Molecules, 25(12), 2898.

# CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This certificate is proudly presented to

**Khadija DEHIMI**

We would like to thank you for your valuable contributions  
as a participant with the online oral presentation entitled

*Effect of Different Extracting Solvents on Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts  
From Algerian Matricaria vulgare*

at the 5. International Conference on Life and Engineering Sciences  
with the sponsorship of Anand International College of Engineering,  
Antalya-TURKEY, May 19-22, 2022.



Assoc. Prof. Dr. Gökhan ÖMEROĞLU  
Co-Chair of ICOLES 2022

22.05.2022