



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريبيج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et protection des végétaux

Thème

**Caractérisation phytochimique et activités biologiques
de la plante médicinale *Marrubium vulgare* L.**

Présenté par : LAOUISSI Fatma

BOUMEZOUGH Sara

Devant le jury:

Président: M^r Mr ZIAD Abdelaaziz. MAA (Univ Mohamed El bachir El Ibrahimi BBA)

Encadrant: M^{me} BOUMERFEG Sabah. Pr (Univ Mohamed El bachir El Ibrahimi BBA)

Examineur: M^{me} NASRI Meriem MCB (Univ Mohamed El bachir El Ibrahimi BBA)

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail.

*Nos remerciements s'adressent en particulier à notre encadrant **Pr. BOUMERFEG Sabah**, qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il nous a accordé, nous a permis de réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier **Mr ZIAD Abedlaaziz** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de notre soutenance.
Nos remerciements s'adressent aussi à **M^{me} NASRI Meriem** d'avoir accepté d'examiner notre travail*

*Un remerciement spécial à **Mme BAALI Faiza** pour son aïd, encouragement ainsi que son soutien moral qui ont été d'une grande importance pour l'élaboration de ce travail*

I

Nous exprimons notre gratitude à tous les enseignants rencontrés lors de notre cycle universitaire.

Dédicaces

A ma très chère mère

Ma mère tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A Mon cher frère et son épouse

Mon cher frère qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A Mon cher petit frère

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

A MES CHERS SOEURS

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A Mes neveux Anes et Idir

A Ma aimable binôme ^SARA^ ma sœur Qui 'a partagée avec moi les moment difficiles de ce travaille et sa famille merci infiniment sara .

A Mes aimables amies

^fatma^

Dédicace

*Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de **DIEU**, qui m'a offert santé, force, patience et volonté jusqu'au dernier moment. Je te remercie **ALLAH** pour ça et pour ton soutien à chaque instant.*

« Celui qui ne remercie les gens ne remercie guère Dieu ».

Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :

*À qui je préfère à moi-même (**Ma mère**) et pourquoi pas, et s'est sacrifiée pour moi ; Elle n'a épargné aucun effort pour toujours me plaire, Merci maman pour tout ce qu'elle m'a donné Merci pour toutes tes prières pour moi, j'espère que tu seras toujours satisfaite.*

*A (**Mon père**) pour son amour son soutien depuis toujours, Il a me donner toutes les chances pour réussir. Toutes les expressions de gratitude ne pas suffisante pour exprimer mes sentiments envers toi, fier que tu sois mon père.*

A mes sœurs et mes frères qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre encouragement et confiance.

A mes chères amies qui ont proche de moi pour les sympathiques moments qu' on passe ensemble.

*Ama chérie, ma sœur, mon partenaire de ce travail (**FATMA**), Je n'oublierai pas les moments difficiles que nous avons passés, merci Dieu qui nous a réunis dans ce travail.*

Sara

ملخص

تناولت هذه الدراسة المرجعية التحليل الكيميائي النباتي والأنشطة البيولوجية للمستخلصات الميثانولية والزيوت الأساسية للأجزاء الهوائية من *M. vulgare* L. وأظهر التقدير الكمي لمجموع البوليفينول وإجمالي الفلافونويد الموجودة في المستخلصات الميثانولية أن هذا ci غني نسبياً بالبوليفينول والفلافونويد. أظهرت الدراسة الكيميائية النباتية وجود حمض الجاليك ، وحمض الكلروجينيك ، وكيرسيتين ، وجليكوسيدات فينيل بروبانويد ، وجليكوسيد الفينيلإيثانويد ، وفيرباسكوزيد في المستخلصات الميثانولية. تم تحديد تكوين الزيت العطري بواسطة GC / MS و GC / FID مما يسمح بتحديد العديد من المكونات مثل Germacrene D و β -Caryophyllene ، والتي تعد أكثر المكونات السائدة. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الميثانولية والزيوت الأساسية لفطر *M. vulgare* عن طريق اختبارات DPPH في المختبر ، وتبييض البيتا كاروتين واختبار H_2O_2 تحتوي جميع مستخلصات *M. vulgare* والزيوت الأساسية على خصائص مضادة للأكسدة جيدة جداً. أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات والزيوت الأساسية نشاطاً قوياً. بينما الزيوت العطرية لنباتنا ليس لها أي تأثير ضد البكتيريا سالبة الجرام. نشاط بيولوجي آخر لوحظ نقص سكر الدم ، مرقئ ، مضاد للقرحة لمستخلصات *M. vulgare* L التي تمت إضافتها إلى ملف النبات لاستخدامه في طب الأعشاب.

الكلمات المفتاحية: *M. vulgare* ، زيوت أساسية ، بوليفينول ، CPG / SM ، HPLC / UV ، مضادات الأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، نشاط مضاد لمرض السكر، نشاط مرقئ، نشاط مضاد للقرحة.

Résumé

Cette étude bibliographique a abordée l'analyse phytochimique et les activités biologiques des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle des parties aériennes de *Marrubium vulgare* L. L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoides contenus dans les extraits méthanoliques a montré que celui-ci est relativement riche en polyphénols et flavonoides. L'étude phytochimiques a permis de mettre en évidence la présence de l'acide gallique, acide chlorogénique, quercétine, phénylpropanoïdes glycosides, phenylethanoid glycoside et les verbascoside dans les extraits méthanoliques. La composition de l'huile essentielle a été déterminée par GC/MS et GC /FID permettant l'identification de plusieurs constituant comme Germacrene D et β -Caryophyllene, qui sont les constituants les plus dominants. L'activité antioxydante des extraits méthanolique et des huiles essentielle du *M. vulgare* a été évalué par les tests *in vitro* DPPH, blanchissement du β -carotène et piégeage de H_2O_2 . L'ensemble des extraits et des huiles essentielles *M. vulgare* présentent des très bonnes propriétés antioxydantes. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits et les huiles essentielles a révélé une puissante activité. Tandis que les huiles essentielles de notre plante ne présente aucun effet vis-à-vis les bactéries de gram négative. D'autres activité biologique ; hypoglycémiant, hémostatique, antiulcéreuse ont été remarqué pour les extraits du *M. vulgare* L ceci a ajouté au profil du plante d'être utilisé en phytothérapie.

Mots clés : *M. vulgare*, huile essentielle, polyphénols, CPG/SM, HPLC/UV, activités antioxydante, activité antimicrobienne, activité antidiabétique, activité hémostatique, activité antiulcéreuse.

Abstract

The objective of this bibliographic study is based on the phytochemical study of the plant *Marrubium vulgare* L, and the evaluation of the biological activities of the methanolic extracts obtained by maceration and of the essential oil which obtained by hydrodistillation of the aerial parts of the plant *M. vulgare* L. Quantitative estimation of total polyphenols and flavonoids contained in methanolic extracts showed that this ci is relatively rich in polyphenols and flavonoids. The phytochemical study demonstrated the presence of gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, phenylpropanoids glycosides, phenylethanoid glycoside and verbascoside in methanolic extracts. The composition of the essential oil was determined by GC / MS and GC / FID allowing the identification of several constituents such as Germacrene D and β -Caryophyllene, which are the most dominant constituents. The antioxidant activity of methanolic extracts and essential oils of *M. vulgare* was evaluated by in vitro DPPH, β -carotene bleaching and H₂O₂ scavenging tests. All *M. vulgare* extracts and essential oils exhibit very good antioxidant properties. Evaluation of the antimicrobial activity of extracts and essential oils revealed potent activity. While the essential oils of our plant have no effect vis-à-vis gram negative bacteria. Other biological activity; hypoglycaemic, hemostatic, antiulcer have been noted for extracts of *M. vulgare* L this added to the profile of the plant to be used in herbal medicine.

Key words: *M. vulgare*, essential oil, polyphenols, GC/MS, HPLC/UV, antioxidant activities, antimicrobial activity, antidiabetic activity, hemostatic activity, antiulcer activity.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAR% : Activité Antioxydante Relative.

AGE: Advanced glycation End-product

BHA: Butyl HydroxyAnisol.

BHT: **Butyl** HydroxyToluène.

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse.

DIF : Détecteur à Ionisation de Flamme.

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyle.

HCl : Chlorure d'Hydrogène

HE : Huiles Essentielle.

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

IC 50 : Concentration inhibitrice de 50 %.

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse.

LDL : Lipoprotéines de basse densité.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

p.c : poids corporelle.

RLs : Radicaux libres.

RNS: Reactive Nitrogen Species.

ROS: *Reactive Oxygen Species*.

SM : Spectrométrie de Masse.

UV : Ultraviolet.

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 01 : <i>Marrubium vulgare</i> L..... | 3 |
| Figure 02 : Schéma du procédé de la Hydrodistillation..... | 9 |
| Figure 03 : GC-MS de l'huile essentielle de <i>M.vulgare</i> | 11 |
| Figure 04 : Structure chimique de quelques composés de l'huile essentielle de <i>M.vulgare</i> | 13 |
| Figure 05 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale..... | 16 |
| Figure 06 : Sources endogènes des espèces réactives oxygénées..... | 17 |
| Figure 07 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules..... | 18 |
| Figure 08 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire..... | 19 |
| Figure 09 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène..... | 20 |
| Figure 10 : Structure chimique du radical libre DPPH..... | 23 |
| Figure 11 : Réaction de test DPPH..... | 24 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|---------------------|--|----|
| Tableau 01 : | Contenu des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits méthanolique du <i>M. vulgare</i> | 6 |
| Tableau 02 : | Composition chimique en polyphénols des extraits méthanolique du <i>M. vulgare</i> | 8 |
| Tableau 03 : | Méthodes d'extraction des HE, partie utilisée et rendement..... | 10 |
| Tableau 04 : | Composition chimique de l'huile essentielle de <i>M.vulgare</i> | 12 |
| Tableau 05 : | Les espèces réctives radicalaires et non radicalaires..... | 15 |
| Tableau 06 : | Système antioxydant enzymatique..... | 20 |
| Tableau 07 : | Résultats de test DPH des extraits méthanolique et des huiles essentielles de <i>M. vulgare</i> | 24 |
| Tableau 08 : | Résultats de test de blanchiment du β -carotène des extraits méthanoliques et huiles essentielles du <i>M. vulgare</i> | 26 |
| Tableau 09 : | Effet scavenger de peroxyde d'hydrogène par des extraits méthanoliques de <i>M. vulgare</i> | 28 |
| Tableau 10 : | Résultats de l'activité antibactérienne de différents extraits de <i>M. vulgare</i> | 29 |
| Tableau 11 : | Résultats de l'activité antifongique de différents extraits de <i>M. vulgare</i> | 30 |
| Tableau 12 : | Effet de l'extrait aqueux du <i>M. vulgare</i> sur la glycémie..... | 34 |
| Tableau 13 : | Effet de l'extrait de <i>M.vulgare</i> sur la coagulation sanguin..... | 36 |
| Tableau 14 : | Effets de l'extrait méthanolique de <i>M.vulgare</i> , de la marrubiine et de l'oméprazole sur l'ulcère induit par l'éthanol chez la souris..... | 38 |

SOMMAIRE

Remerciements

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Présentation de étudiée : *Marrubium vulgare* L.

I.1. Genre *Marrubium* 3

I.2. *Marrubium vulgare* L..... 3

I.2.1. Description botanique 3

I.2.2. Systématique 4

I.2.3. Aires de répartition 4

I.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle..... 4

Chapitre II : Etude phytochimique de *Marrubium vulgare* L.

II.1. Composés phénoliques 5

II.1.1. Extraction (extrait méthanolique)..... 5

II.1.2. Analyses chimiques 5

II.1.3. Caractérisation des polyphénols par HPLC/UV..... 7

II.2. Huiles essentielles..... 8

II.2.1. Extraction par Hydrodistillation..... 8

II.2.2. Résultats d'extraction des huiles essentielles..... 9

II.2.3. Analyse des huiles essentielles..... 10

Chapitre III : Activités biologiques de *Marrubium vulgare*

| | |
|---|-----------|
| III.1. Activité antioxydante | 15 |
| III.1.1. Le stress oxydatif..... | 15 |
| III.1.2. Un radical libre (RL)..... | 15 |
| III.1.3. Les espèces réactives de l'oxygène..... | 15 |
| III.1.4. Sources des radicaux libres..... | 16 |
| III.1.5. Les principales cibles des ROS..... | 18 |
| III.1.6. Le système de défenses antioxydants..... | 20 |
| III.1.7. Rôle physiologique des ROS | 22 |
| III.1.8. Stress oxydatif et maladies..... | 22 |
| III.1.9. Tests antioxydants | 22 |
| III.2. Activité antimicrobienne..... | 28 |
| III.2.1. Activité antibactérienne..... | 28 |
| III.2.2. Activité antifongique..... | 29 |
| III.3. Activité antidiabétique..... | 33 |
| III.4. Activité hémostatique..... | 35 |
| III.5. Activité antiulcéreuse..... | 37 |
| Conclusion | 39 |
| Références bibliographiques | |

Introduction

Introduction

La phytothérapie existe depuis la nuit des temps, l'homme a eu recours aux plantes pour se nourrir mais aussi pour se soigner. Au fil des siècles, la connaissance des plantes médicinales se transmet de génération en génération (**Eline, 2019**). Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs (**Pelt, 2001**).

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la médecine des médicaments très efficaces. Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité (**Gurib-Fakim, 2006**).

Selon l'organisation mondiale de la Santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire (**Calixto, 2005**).

Un grand nombre de plantes médicinales et aromatiques et des plantes cultivées ou spontanées possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui ont trouvé des applications dans divers domaines (**Hennebelle et al., 2007**).

Les propriétés biologiques qui caractérisent ces plantes médicinales sont dues au fait qu'elles contiennent de nombreux composés actifs spécifiques au règne végétal connu sous le nom de métabolites secondaires. Parmi les composés potentiellement intéressants les polyphénols, qui ont été d'un grand intérêt pour les scientifiques et les chercheurs car ils ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et autres antibactériennes. Ces composés sont distribués presque dans toutes les parties de la plante et sa distribution est liée à des facteurs génétiques et environnementaux comme il est cité par la littérature.

Les huiles essentielles font aussi partie du groupe des métabolites secondaires et sont bien connues pour leurs propriétés biologiques qui sont attribuées aux diversités des composés chimiques qui les composent. Dans ce contexte, nous sommes intéressés à étudier une

plante médicinale, qui est *Marrubium vulgare* de la famille des Lamiacées et qui est très utilisé dans l'antiquité à des fins thérapeutiques.

Cette étude bibliographique a abordé l'étude phytochimique des extraits méthanoliques et de l'huile essentielle des parties aériennes de *M. vulgare*, ainsi que l'étude de leurs activités biologiques.

Ce mémoire est structuré en 3 chapitres :

- Chapitre 1 : Une présentation générale sur la plante *M. vulgare* (description botanique générale de l'espèce étudiée, leur répartition géographique et leurs utilisations en médecine traditionnelle).
- Chapitre 2 : Etude phytochimique de la plante qui consiste à :
 - Extraction des composants bioactifs comme les polyphénols et les huiles essentielles)
 - Caractérisation et l'analyse de différents composés actifs d'extrait méthanolique et d'huile essentielle par CPG/SM et HPLC/UV
 - médecine traditionnelle).
- Chapitre 3 : étude des activités biologiques de la plante.

Chapitre I

Présentation de

Marrubium vulgare L.

I.1. Genre *Marrubium*

Le genre *Marrubium*, communément appelé marronnier, appartient à la famille des Lamiacées. Ce genre comporte quelque 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasien et quelques pays d'Amérique Latine. Il est utilisé comme source d'arômes alimentaires et à des fins médicinales (**Letchamo et al., 1997 ; Meyre, 2005 ; Rigano, 2006**).

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

I.2. *Marrubium vulgare*

I.2.1. Description botanique

M. vulgare est une Arbuste, d'aspect blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués, a feuilles petites en coin à la base et portant quelque dents au sommet, fleurs en petites glomérules à l'aisselle des paires de feuilles, corolle petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'accroissant considérablement par sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse (**Figure 01**) (**Ozenda, 2004**).



Figure 01: *Marrubium vulgare* L. (**Haratymand et Weryszko-Chmielewska, 2017**).

I.2.2. Systématique

Selon **Judd *et al.*, (2002)** la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est :

| | |
|------------------------|-----------------------------|
| Règne : | Végétale |
| Embranchement : | Angiosperme |
| Classe : | Eudicotylédones |
| Sous-classe : | Gamopétale |
| Ordre : | Lamiales |
| Famille : | Lamiacées |
| Genre : | <i>Marrubium</i> |
| Espèce : | <i>Marrubium vulgare</i> L. |

Nom vernaculaire algérien : Meriwet ; Français : Marrube blanc.

I.2.3. Aires de répartition

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des Lamiacées et comprend environ 75 espèces répandues dans une grande partie du globe et notamment en Europe et en Asie. On compte 50 espèces sur le pourtour méditerranéen. En Algérie, sept espèces sont répertoriées (**Zaabat *et al.*, 2010**).

I.2.4. Utilisation en médecine traditionnelle

Dans la région méditerranéenne, *M. vulgare* est fréquemment utilisée en médecine traditionnelle pour soigner diverses maladies. La plante serait hypoglycémique (**Roman Ramos *et al.*, 1992**) (vasorelaxant, antihypertenseur (**El-Bardai *et al.*, 2004**), analgésique (**Souza *et al.*, 1998**), anti-inflammatoire (**Sahpaz *et al.*, 1996**), activité antioxydante (**weel *et al.*, 1999**), anti-dermatogène (**stulzer, 2006**) et de nombreuses autres activités biologiques.

En Algérie, *M. vulgare* est utilisé en médecine populaire pour traiter plusieurs maladies digestives, diarrhée, ainsi que le diabète, les rhumatismes, la bronchite aiguë ou chronique, la toux, l'asthme et d'autres infections respiratoires (**Belhattab *et al.*, 2006**).

Chapitre II

Etude phytochimique de

Marrubium vulgare L.

II.1. Composés phénoliques

II.1.1. Extraction (extrait méthanolique)

II.1.1.1. Extractions par macération

L'extrait méthanolique du *M. vulgare* a été préparé selon une méthode précise. Une quantité (g) d'une partie de la plante est mise à macérer dans un volume (ml) de solvant (méthanol) sous agitation pendant un temps défini, à l'ombre et à température ambiante. L'extrait récupéré par filtration est soumis à une évaporation du méthanol dans un rotavapeur. La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre qui est conservée à une température jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Analyses chimiques

II.1.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est fondé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Cicalteu consiste en une solution jaune acide (Ac) contenant un complexe polymérique d'ions (hétéro polyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Cicalteu oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro polyacides d'où la formation d'un complexe bleu. Les résultats sont exprimé et en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g E) (Daels, 1999).

II.1.2 .2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode adaptée par **Zhishen et al., (1999)**. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible a 510 nm. Les résultats sont exprimé et en mg d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g E)

II.1.2. 3. Résultats obtenus

Tout le contenu pénoïque dans les trois extraits méthanolique examiné de la plante utilisant le réactif de folin ciocalteau, et les résultats sont exprimés en mg EAG/g E.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits varient entre 3,42 et 60.4 mg EAG/g E. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique obtenu par Yousefi *et al.* (2016) avec un taux de 60.4mg EAG/g E, par rapport aux extraits obtenus par **Khaled – Khodja *et al.* (2014)** et **Ghedadba *et al.* (2014)**, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de 20.07 et 3,42 mg EAG/g E respectivement.

La concentration des flavonoïdes dans les trois extraits de la plante déterminé par le chlorure d'aluminium avec la méthode spectrophotométrique et les valeurs obtenue sont exprimés en mg EQ/g E. Les résultats présentés dans le **Tableau 01** montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les trois extraits méthanolique. L'extrait méthanolique de **Ghedadba *et al.* (2014)** enregistre un maximum de flavonoïdes (18,0 mg EQ/g E), suivi par l'extrait de Yousefi *et al.* (2016) qui renferme des teneurs plus faibles (12.05mg EQ/g E). Tandis que la plus basse concentration des flavonoïdes a été mesurée dans l'extrait de **Khaled-Khodja** (7.03 mg EQ/g E).

La différence des teneurs phénoliques et flavonoïdes entre les trois extraits méthanolique de la plante peut être lié au climat de la région ou à la méthode d'extraction utilisée qui ne donne pas une composition quantitative complète des extraits (**Beecher *et al.*., 2004**).

Tableau 01: Contenu des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits méthanolique du *M. vulgare*.

| Références | Polyphénols totaux mg EAG/g E | Flavonoïdes totaux mg EQ/g E |
|--|----------------------------------|---------------------------------|
| Ghedadba <i>et al.</i>, 2014 | 3,42 ± 0,85 | 18,0 ± 0,75 |
| Khaled-Khodja <i>et al.</i>, 2014 | 20.07 ± 0.44 | 7.03 ± 0.28 |
| Yousefi <i>et al.</i>, 2016 | 60.4 | 12.05 |

II.1.3. Caractérisation des polyphénols par HPLC/UV

II.1.3.1. Principe de la technique

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) consiste à exploiter les interactions des solutés avec deux phases l'une mobile et l'autre stationnaire sous haute pression. Les solutés sont séparés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'affinité du soluté dans l'éluant, la polarité ou la charge électrique. Après leur séparation, les solutés sont identifiés et dosés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique (**Panaiva, 2006**).

Le mode de fonctionnement de la HPLC est largement décrit. Ainsi, à un instant donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne, et se trouve entraîné par la phase mobile. Les constituants du mélange sont ensuite recueillis et identifiés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption. La chromatographie aboutit à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne : c'est un chromatogramme (**Panaiva, 2006**).

2.1.3.2. Principaux résultats

L'analyse qualitative par HPLC a permis de constater la richesse des extraits méthanoliques du *M. vulgare* en principes actifs, en particulier polyphénols et flavonoïdes. ; Chaque extrait diffère de l'autre par sa composition chimique dont la présence de l'acide gallique, Quercétine et phénylpropanoïdes glycosides dans l'extrait obtenu par **Ghedadba et al. (2014)** ; Phényléthanoid glycoside Deacetyl vitex lactone pour l'extrait obtenu par **Amri et al. (2017)**; et de l'acide chlorogénique ; Verbascoside (acteoside) ; Flavonoïdes concernant l'extrait obtenu par **Boudjelel et al., (2013)**.

Cette variété en composés phénoliques des différents extraits méthanoliques de la plante nous a permis de conclure que le méthanol a été recommandé et fréquemment employé pour l'extraction des composés phénoliques (**falleh et al., 2008**) ainsi que la plante est riche en métabolites secondaires plus précisément en composés phénoliques qui ont des propriétés biologiques importantes ce qui confirme leur utilisation pour des buts thérapeutiques.

Tableau 02 : Composition chimique en polyphénols des extraits méthanolique du *M. vulgare*.

| Les polyphénole obtenus | Références |
|--|--------------------------------------|
| Acide chlorogénique | |
| Verbascoside (acteoside). | Boudjelal <i>et al.</i>, 2013 |
| Flavonoïdes :(luteoline ; apigenine ;crysoeriol ; Ladanein). | |
| Acide gallique, Quercétine | Ghedadba <i>et al.</i>, 2014 |
| Quatre phénylpropanoï-des glycosides : le forsythoside B , le balloté-troside , l'arénarioside et le verbascoside. | |
| Phenylethanoid glycoside | |
| Deacetylvitexlactone et | Amri <i>et al.</i>, 2017 |

L'acide chlorogénique a également été identifié comme faisant partie des principaux composés phénoliques de *M. vulgare* (**Boudjelal *et al.*, 2013**).

Ghedadba *et al.* (2014) ont identifié l'acide gallique et la quercétine comme les principaux composés présentent dans l'extrait de la partie aérienne de *M. vulgare*.

II.2. Huiles essentielles

II.2.1. Extraction par Hydrodistillation

La distillation à l'eau ou «hydrodistillation», est une méthode simple et la plus anciennement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur (**Figure 02**). L'ensemble est ensuite porté à ébullition sous une pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Les

vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage (recyclage de l'eau de distillation à l'aide d'un siphon) des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe, généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles, est le Clevenger (**Bruneton, 1999**).

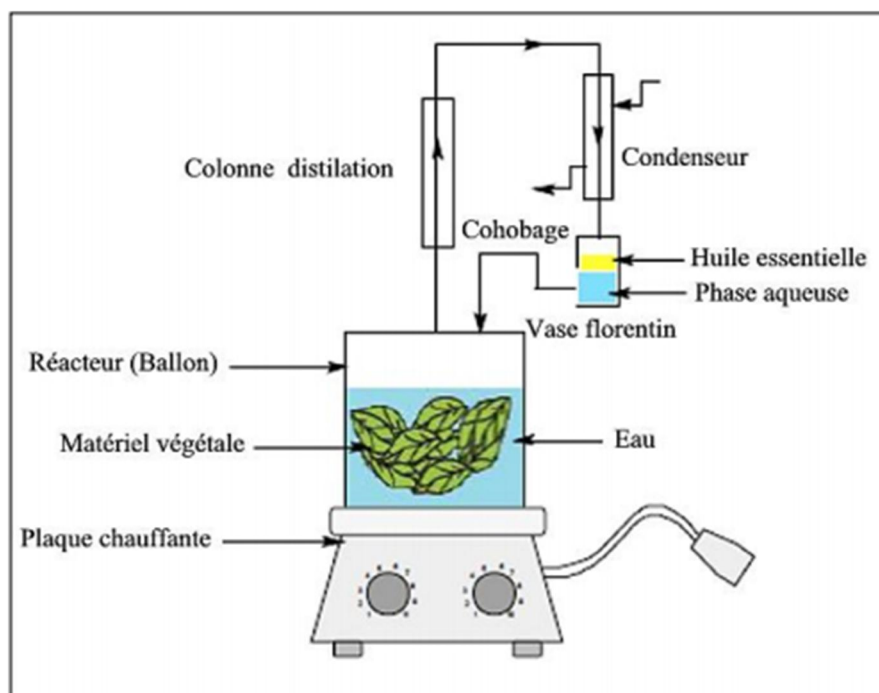


Figure 02 : Schéma du procédé de la Hydrodistillation (**Chenni, 2016**).

II.2.2. Résultats d'extraction des huiles essentielles

Le tableau (03) présente quelques méthodes d'extraction des HE de *M.vulgare*, la partie plante utilisées ainsi le rendement et les composés identifiées.

Tableau 03 : Méthodes d'extraction des HE, partie utilisée et rendement.

| Méthode d'extraction | Partie utilisée | Rendement | Références |
|-------------------------------------|------------------------|------------------|---|
| Hydrodistillation (3h) clevenger | Partie aérienne | 0.06% | Zawislak, 2015 (Pologne) |
| Hydrodistillation (4h) clevenger | Partie aérienne | 0.1% | Asadipour et al., 2005 (Iran) |
| Hydrodistillation (4h) clevenger | Feuilles | 0.34% | Bokaeian et al., 2014 (Iran) |
| Hydrodistillation (4h) clevenger | Partie aérienne | 0.05% | Abadi et Hassani, 2013 (Algérie) |
| Hydrodistillation (3h) clevenger | Partie aérienne | 0.05% | Belhattab et al., 2006 (Algérie) |
| Hydrodistillation (2h) clevenger | Partie aérienne | 0.02% | Hamdaou et al., 2014 (Tunisie) |
| Hydrodistillation (4h) clevenger | Partie aérienne | 0.05% | Kadri et al., 2011 (Tunisie) |

II.2.3. Analyse des huiles essentielles

Quelque soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire. La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile (**Leila, 2015**).

Le principe de la CPG est basé sur la répartition des constituants à séparer entre deux phases non miscibles : l'une des deux est une phase stationnaire tandis que l'autre est une

phase mobile qui passe à travers la phase stationnaire. Dans l'analyse CPG, les composés à analyser sont vaporisés, ensuite élués par la phase mobile à travers la colonne. A la sortie de la colonne, les analytes sont séparés dans le temps en fonction de leurs pressions relatives de vapeur (volatilité) et de leurs affinités pour la phase stationnaire. Lorsque les analytes arrivent au niveau du détecteur (détecteur à ionisation de flamme DIF), un signal est enregistré générant un chromatogramme sous forme de pics qui sont caractérisés par un temps de rétention (**Bouchonnet, 2009**).

En outre, le potentiel de la CPG couplée à la SM est bien connu pour la détermination des composés volatils contenus dans les huiles essentielles. Le procédé d'identification le plus fréquent en GC/MS consiste à comparer les spectres de masse inconnus avec ceux contenus dans la librairie SM de référence. Les indices de rétention en combinaison avec les informations structurales fournies par la GC/MS (**Figure 03**) sont utilisés pour confirmer l'identité des composés (**Louiza, 2018**).

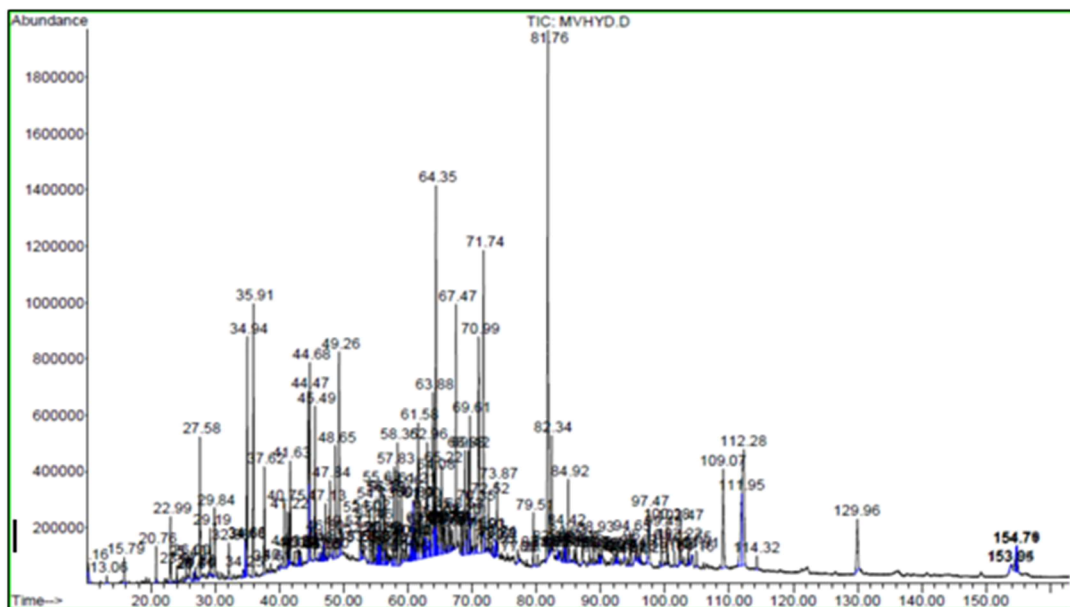


Tableau 04 : Composition chimique de l'huile essentielle de *M.vulgare*.

| Le pays | Composés majeurs | Références |
|----------------|--|-------------------------------|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Germacrene D (23.85%) • Bicyclogermacrene (20.06%) • E-caryophyllene (44.54%) • α-Humulene (5.79%) | Zawislak, 2012 |
| Pologne | <ul style="list-style-type: none"> • Germacrene D (27.18%) • Bicyclogermacrene (9.45%) • Carvacrol (6.64%) • δ-Amorphene (8.18%) • E-caryophellene (34.51%) | Zawislak, 2015 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Germacrene D (10.04%) • β-Bisabolene (1.98%) • Bicyclogermacrene (3.38%) • Caryophellene oxide (18.67%) • Trans-caryophyllene (12.77%) | Asadipour et al., 2005 |
| Iran | <ul style="list-style-type: none"> • Germacrene D (10%) • β-Bisabolene (0.77%) • δ-Eudesmol (11%) • Citronellyl formate (10%) • β-Citronellol (8%) • Geranyl tiglate (7.1%) • Geranyl formate (6.02%) | Bokaeian et al., 2014 |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Germacrene D (0.88%) • 4,8,12,16-tetramethyl heptadecan-4-olid (16.97) • Germacrene D-4-ol (9.61) • α-Pinene (9.37) | Abadi et Hassani, 2013 |
| Algérie | | |

- Germacrene D (0.3%)
 - β -Caryophyllene (3.9%)
 - β -Bisabolene (10.9%)
 - Carvacrol (0.7%)
 - Eugenol (50.1%)
- Belhattab *et al.*, 2006**

- Germacrene D (2.4%)
 - β -Caryophyllene (7.8%)
 - β -Bisabolene (28.3%)
 - (E)- β -Farnesene (7.4%)
 - l α -1,8-Cineol (4.8%)
- Hamdaou *et al.*, 2014**

Tunisie

- Germacrene D (9.37%)
 - β -Bisabolene (0.86%)
 - γ -Eudesmol (11.93%)
 - β -Citronellol (9.90%)
 - Citronellyl formate (9.50%)
- Kadri *et al.*, 2011**

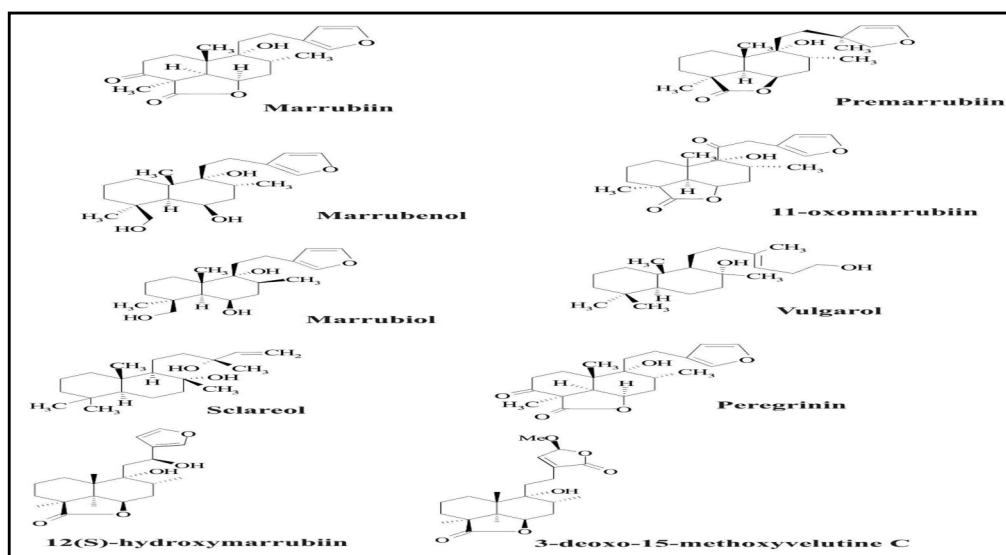


Figure 04 : Structure chimique de quelques composés de l'huile essentielle de *M. vulgare*.

Le rendement et la composition d'huile essentielle de *M. vulgare* ne sont pas stable ; et varient selon plusieurs facteurs tels que : les conditions génétiques et environnementales et

d'autres facteurs sont liés aux conditions expérimentales (méthodes d'extractions) (**Franz et Novak, 2010 ; Mohammad, 2016 ; Kezazi et al., 2017**).

Selon (**Letchamo et Mukhopadhyay, 1997**) le contenu de l'huile essentielle était faible et varié selon les différentes parties de la plante. Les feuilles contiennent la fraction la plus grande (0.29%) ; les fleurs (0.10%) ; les tiges (0.01%), aucune huile essentielle n'a été trouvée dans les graines. Plusieurs travaux ont révélé la dominance de E-caryophyllène, du Germacrène D les huiles essentielles de marrube de différentes origines d'Iran (**Zawislak, 2012 ; Zawislak, 2015**). **Bokaeian et al. (2014)** ont trouvés que Caryophellène oxyde (18.67%), Trans-caryophyllène (12.77%), Germacrène D (10.04%) étaient des constituants majeurs.

Les valeurs relativement basses peuvent être dues à des conditions de croissance chaude et sèche du nord et l'est de l'Afrique (**Miloudi et al., 2018**).

Les variations de composition chimique de l'huile essentielle de *M. vulgare* peuvent être attribuées à différents facteurs environnementaux. Tandis que, l'huile essentielle est un produit métabolique de cellules végétales, et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, l'altitude, le taux d'exposition au soleil) le type de sol, le stade de croissance de la plante en question, le moment de la récolte et la méthode d'extraction (**Béjaoui et al., 2013a**).

Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente : on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes. (**Bedi et al., 2001**)

Toutes les étapes de traitement allant de la récolte de la matière première végétale au stockage de l'huile essentielle peuvent également induire des variations dans la concentration des composés ou même l'apparition de nouvelles molécules. Tandis que la présence ou l'absence d'un constituant chimique à tout stade de croissance est exclusivement déterminée par le patrimoine génétique de la plante, sa concentration est régie à la fois par la génétique et des facteurs environnementaux. (**Deschepper, 2017**)

Chapitre III

Activités Biologiques de

Marrubium vulgare

III.1. Activité antioxydante

III.1.1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif /nitrosatif dû à un déséquilibre entre la formation de ROS/RNS et la capacité altérée d'un organisme à détoxifier ces intermédiaires ou à réparer les dommages qu'ils causent (Poprac *et al.*, 2017).

III.1.2. Un radical libre (RL)

Est une espèce chimique possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, cet électron lui confère une certaine instabilité et haute réactivité (Ortiz *et al.*, 2013).

III.1.3. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives sont des espèces chimiques oxygénées telles que les radicaux libres provenant de l'O₂ (ERO), alors que les espèces réactives de l'azote (ERN) sont considérées comme une sous-classe des ERO (Tableau 05) ; et sont générées de la réaction de l'oxygène avec l'azote (Ye *et al.*, 2015).

Tableau 05 : Les espèces réactives radicalaires et non radicalaires.

| ERO /ERA | Symbole chimique | Propriétés |
|-----------------------------------|------------------------------|---|
| L'anion superoxyde | O ₂ ^{•-} | Les O ₂ ^{•-} sont considérés comme des ROS primaires. Il résulte d'une réduction électronique de O ₂ par diverses oxydases telles que la NADPH oxydase ; la XO. Il peut également se former dans la chaîne du transport d'électron mitochondrial (Lanciano <i>et al.</i> , 2013) |
| Le radical hydroxyle | OH [•] | L'espèce radicalaire la plus réactive de l'oxygène, à une demi-vie extrêmement courte, capable de réagir très rapidement avec la plupart des biomolécules (Bartosz, 2003). |
| Monoxyde d'azote (oxyde nitrique) | NO [•] | Synthétisé dans les cellules endothéliales à partir de l'arginine et l'O ₂ grâce à l'action d'enzymes NO synthase. Il peut réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO ₂) (Lismont <i>et al.</i> , 2015). |
| Radicaux alkyles | R [•] | Généralement issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons (Delattre <i>et al.</i> , 2005). |

Espèce radicalaire

Espèce non radicalaire

| | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| Radicaux peroxy | ROO• | Les radicaux peroxy sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centré sur le carbone R• (Delattre et al.,2005). |
| L'oxygène singulet | ¹O₂ | Oxygène avec des spins antiparallèles. Produit à des pressions importantes en oxygène sous l'effet de l'absorption des rayons UV (Chu et al., 2010). |
| Le peroxyde d'hydrogène | H₂O₂ | formé à la dismutation de O ₂ •- par le superoxyde dismutase. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l'H ₂ O ₂ donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO• hautement réactif (Birben et al., 2012). |
| Acide hypochlorique | HOCL | Produit dans les neutrophiles, sa toxicité s'effectue à travers des réactions d'halogénations et d'oxydations (Chu et al., 2010) |
| Peroxynitrite | ONOO- | Un composé extrêmement réactif et toxique, responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécule (Lismont et al., 2015). |

III.1.4. Sources des radicaux libres

La production de radicaux libres peut être d'origine endogène ou exogène ou résulter d'activités enzymatiques ou non enzymatiques :

III.1.4.1. Les sources endogènes

a. La mitochondrie

La chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 05**) est responsable de la production de 90% des ROS dans la cellule (**Balaban et al., 2005**). La production d'O^{•2-} résulte de la fuite d'électrons lors de leur transfert par les complexes de la chaîne respiratoire (**Zhang et Gutterman, 2007**).

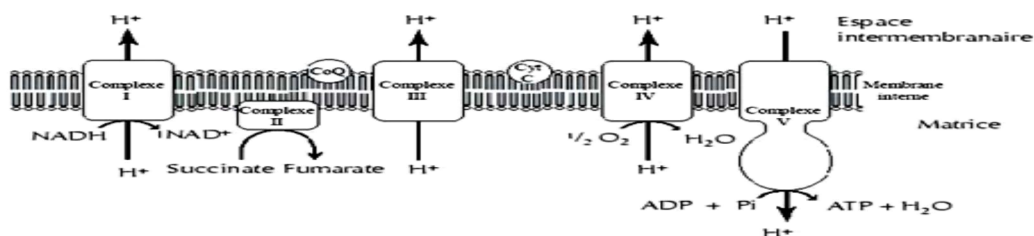


Figure 05: Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Chérifa, 2014**)

b. La xanthine oxydase

Dans les conditions physiologiques, la xanthine oxydase (XO) catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde (**Chan, 2003**). La XO joue un rôle crucial dans la génération de l' $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 . (**Rahman et al., 2006**).

c. La NADPH oxydase

Les NADPH oxydases comprennent une famille de protéines capables de transférer des électrons du NADPH à travers les membranes cellulaires ; les électrons réagissent avec O_2 générant $O_2^{\cdot-}$ et accompagnant d'autres ROS en aval (**Figure 06**) (**Hansen et al., 2018**).

d. Peroxysomes

Les peroxysomes sont l'un des principaux sites de production intracellulaire de H_2O_2 car ils contiennent de nombreuses enzymes produisant H_2O_2 . (**Del Río & López-Huertas, 2016**). Il a été démontré que les peroxysomes produisent également $O_2^{\cdot-}$ et NO^{\cdot} à la suite de leur métabolisme normal (**Figure 06**) (**Lismont et al., 2015**).

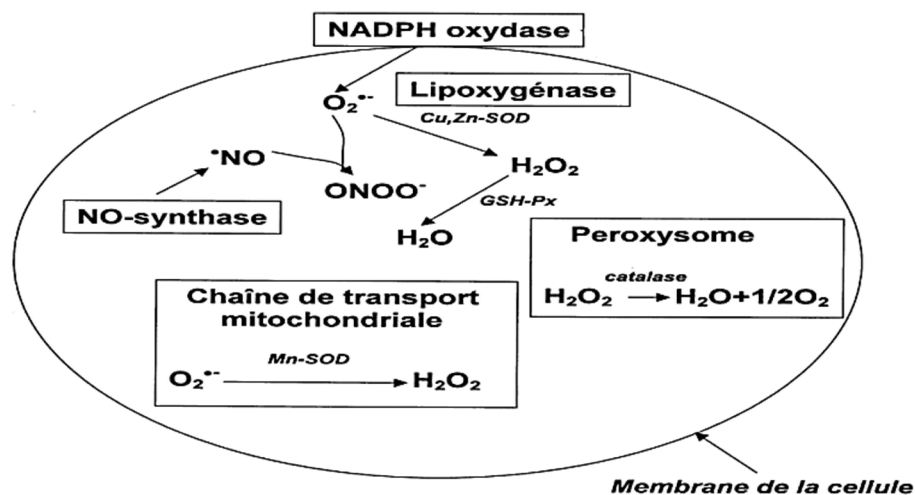


Figure 06. Sources endogènes des espèces réactives oxygénées (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**).

III.1.4.2. Les sources exogènes

En plus des sources endogènes, il existe des sources exogènes liées le plus souvent à une mauvaise hygiène de vie. Parmi ces sources exogènes, on peut citer le tabagisme, l'alcool ou la consommation d'huiles oxydées ainsi que des agents physiques tels que les UV, la chaleur ou certains polluants (Riché, 2008).

III.1.5. Les principales cibles des ROS

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques ; oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides (Figure 07, 08, 09) (Favier, 2003).

III.1.5.1. Acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\bullet\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine (Figure 07) ; entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng *et al.*, 2007).

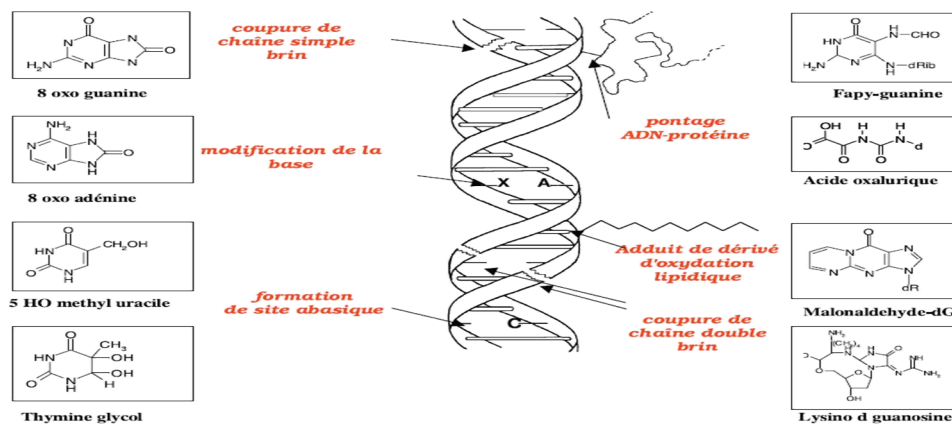


Figure 07: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

III.1.5.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine (**Figure 08**). Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique) (**Haleng *et al.*, 2007**).

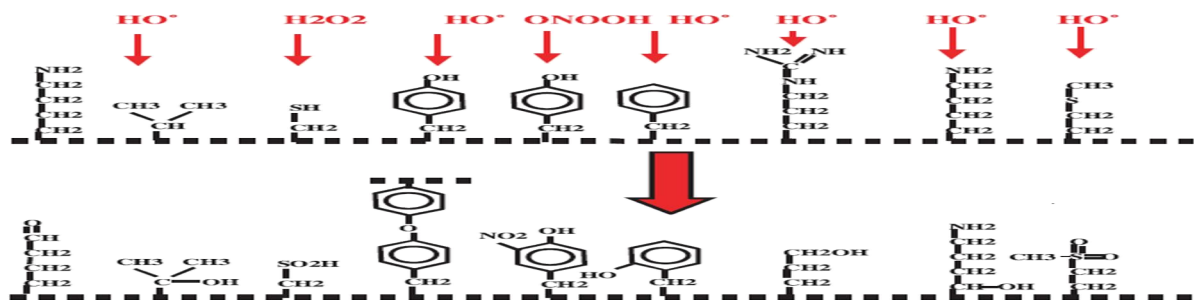


Figure 08 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (**Favier, 2003**).

III.1.5.3. Les lipides

Les lipides sont la cible privilégiée des ERO : le radical hydroxyle instable réagit avec les lipides constitués d'acides gras polyinsaturés pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), suffisamment réactif pour déclencher une réaction en chaîne sur les acides gras voisins : c'est la lipo-peroxydation des membranes cellulaires. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Cette réaction provoque aussi la dissociation des lipoprotéines à faible densité du sang et provoque un dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux sanguins ou athérosclérose (**Tsimikas *et al.*, 2005**).

III.1.5.4. Les glucides

Les ERO attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycane du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et $\text{OH}\cdot$, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGE (Advanced glycation End-product) (produit terminaux de glycation PTG (AGE) (**Favier, 2003**).

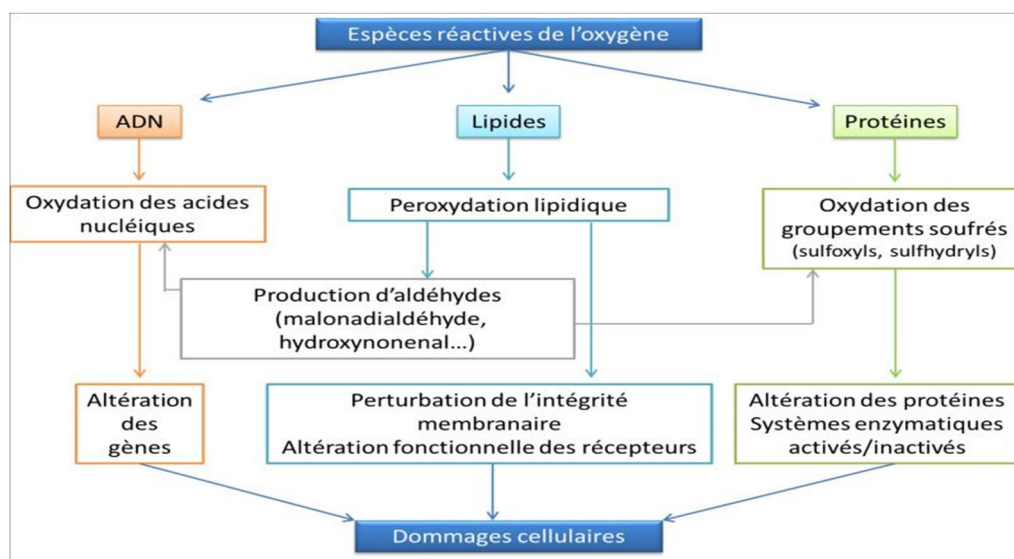


Figure 09 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène.
(Monteil *et al.*, 2004)

III.1.6. Le système de défenses antioxydants

III.1.6.1. Antioxydants enzymatiques

L'organisme se défend contre les radicaux en synthétisant des enzymes (**Tableau 06**) qui les neutralisent (Vincent *et al.*, 2004).

Tableau 06 : Système antioxydant enzymatique.

| Enzyme | Mode d'action |
|--|--|
| Superoxyde dismutases (SOD) : EC1.15.1.1 | Assurant l'élimination de l' $O_2^{\cdot-}$ par une réaction de dismutation en le transformant en H_2O_2 et en O (Fukai et Ushio-Fukai 2011). |
| Glutathion peroxydase (GPxs) : EC 1.11.1.19 | Enzyme qui peut réduire le H_2O_2 en eau. Elles permettent de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne (Brigelius-Flohé et Maiorino 2013). |
| Catalase : EC1.11.1.6 | Enzyme responsable de la détoxification du H_2O_2 . La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène (Asmat <i>et al.</i> 2015). |
| La thiorédoxine réductase : EC1.8.1.9 | La TrxR intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Haleng <i>et al.</i>, 2007) |

III.1.6.2. Antioxydants non enzymatiques

La classe des antioxydants non enzymatiques regroupe des composés endogènes de faible poids moléculaire qui peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion) ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique) (Kohen et Nyska, 2002). Des protéines telles que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition permettant de prévenir la formation du radical hydroxyle (Martinez-Cayuela, 1995).

III.1.6.3. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu *et al.*, 2000).

III.1.6.4. Les antioxydants d'origine végétale

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydantes remarquables. Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants (Defraigne et Pincemail, 2008) comme :

- **La vitamine C (acide ascorbique) :** Ses propriétés antioxydantes sont attribuées à sa capacité d'être réduit en radical ascorbyle après la perte d'un électron ou d'un proton (Valko *et al.*, 2006). La Vit C peut empêcher l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) produites par divers systèmes générateurs des ROS (Limbach et Guillard, 2007).
- **Les caroténoïdes ;** Ce sont des pigments liposolubles jaunes, orangés à rouges, synthétisés par les plantes et les microorganismes. Les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'O₂^{•-} et les RLs en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Tanumihardjo, 2013).
- **la vitamine E ;** Elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique (Valko *et al.*, 2006). Durant la réaction antioxydante, l' α -tocophérol connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO[•] (Singh *et al.*, 2005).

- **Les polyphénols** : sont des métabolites secondaires ont des propriétés antioxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes qui peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des RLs, par chélation de métaux de transition comme ou par inhibition de l'activité de la XO (Li *et al.*, 2014).

III.1.7. Rôle physiologique des ROS

Dans des conditions normales, les ROS sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer les facteurs de transcription (Haleng *et al.*, 2007).

Les ROS jouent aussi un rôle important dans les mécanismes de défense antimicrobienne incorporé par les macrophages et les neutrophiles (Slauch, 2011).

Le NO[·] joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tels que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission (Holmström et Finkel, 2014).

III.1.8. Stress oxydatif et maladies

Le déséquilibre entre les espèces oxydantes et le système de défense antioxydant peut déclencher des facteurs spécifiques responsables des dommages oxydatifs dans la cellule: la sur-expression des gènes oncogènes, génération des composés mutagènes, la prolifération incontrôlée des cellules et l'invasion tumorale. Cela conduit à la création et la progression du cancer (Saito *et al.*, 2015). En plus, les ERO peuvent aggraver les lésions cérébrales, ce qui conduit à une neurodégénérescence et des troubles neuropsychiatriques (Bordt et Polster, 2014 ; Moniczewski *et al.*, 2015). D'autre part, les ERO provoquent une promotion de l'activité athérogène et l'apparition de l'inflammation, donc ils sont des éléments importants dans les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension et l'insuffisance cardiaque, qui ont relation avec d'autres maladies telles que le diabète et les maladies rénales (Pisoschi et Pop, 2015).

III.1.9. Tests antioxydants

III.1.9.1. Test DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composes phénoliques

Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 10) (Blois, 1958; Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Popovici *et al.*, 2009).

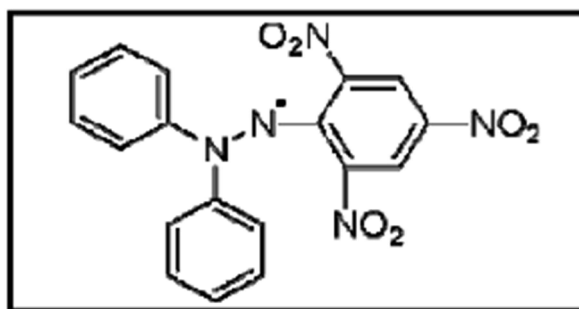


Figure 10: Structure chimique du radical libre DPPH (Popovici *et al.*, 2009).

La réduction du radical libre DPPH[•] (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH (2,2 Diphényl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Figure 11) (Maataoui *et al.*, 2006).

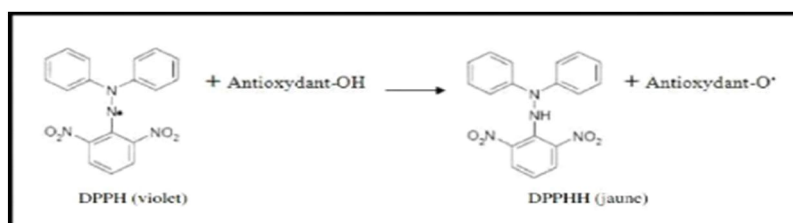


Figure 11 : Réaction de test DPPH (Congo, 2012).

III.1.9.1.1. Résultats obtenue

Tableau 07 : Résultats de test DPPH des extraits méthanolique et des huiles essentielles de *M. vulgare*.

| | IC 50 | Partie utilisé | Références |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------|--|
| Extrait méthanolique | 1,5 µg/ml | | |
| | Quercétine | Partie arienne | Ghedadba <i>et al.</i>, 2014 |
| | 0.81 µg/ml | | |
| | 0.522 ±0.001 (mg BHAE/g powder) | Feuilles | Khaled Khodja <i>et al.</i>, 2014 |
| Huiles essentielle | 35 ± 0.01 | | |
| | BHT 30± 0.01 | Feuilles | Aouadhi <i>et al.</i>, 2014 |
| | 153.84µg/ml | Partie aérienne | Abadi <i>et al.</i>, 2013 |
| | BHT 35 µg/ml | | |
| | 99 µg/ml | | |
| | BHT 17.36 | Partie aérienne | Tab et Zatla, 2017 |

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques et des huiles essentielle du *M. vulgare* a été évaluée par l'activité inhibitrice sur la solution méthanolique du DPPH ; d'après le tableau 7 les IC50 a été déterminé ; et selon **Kadri *et al.* (2011)** une valeur plus faible de l'IC50 (la concentration du substrat qui cause une inhibition de 50 % de l'activité de DPPH) indique une activité antioxydante plus élevée.

L'évaluation quantitative de l'activité antiradicalaire a prouvé que l'extrait méthanolique est plus actif (IC50 = 1,5 µg/ml) ; en comparant avec la quercétine (utilisée comme témoin) qui a montré une activité approximativement équivalente (IC50 = 0,81 µg/ml) (, ce qui indique la présence de composés efficaces dans la composition biochimique de la plante qui ont une capacité élevée dans la réduction du DPPH. Ces composés sont caractérisés par une polarité élevée et sont identifiés par (HPLC) dans l'extrait méthanolique de la plante ;

parmi eux on a les phénylpropanoïdes glycoside ; l'acide gallique ; et la quercétine (**Ghedadba et al., 2014**).

Les résultats sont en accord avec ceux de **Pukalskas et al. (2012)** qui ont prouvé que l'extrait méthanolique de *M. vulgare* de Pologne s'est avéré pour montrer l'activité antioxydante remarquable dans le balayage de radical DPPH (IC₅₀ = 1,15 µg/ml).

Khaled-Khodja et al. (2014) a exprimé l'activité de piégeage des radicaux DPPH en équivalent de BHA ; l'extrait méthanolique du *M. vulgare* a montré une faible capacité antioxydante par rapport aux autres plantes de même famille avec (IC₅₀=0.522 mg / mL) en comparant avec BHA (IC₅₀= 0.041 mg / mL).

Ces résultats ont été confirmés par les teneurs phénoliques et flavonoïdes de l'extrait méthanolique du *M. vulgare* qui sont faibles par rapport à celles des extraits des autres plantes, ceci ne montre pas que l'extrait du *M. vulgare* n'a pas une activité de piégeage le radical DPPH parce que en comparaison avec autres recherches (**Pukalskas et al., 2012**) et dans ce test l'extrait de la plante a une capacité antiradicalaire élevée.

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* par les tests DPPH montre une activité antioxydante plus importante avec (IC₅₀=35µg/ml) proche de control positive (BHT= 30µg/ml), ce résultat due à la présence de certains composés phénoliques qui ont des propriétés de piégeage des radicaux libres grâce à la présence des groupements hydroxyles donneurs des atomes d'hydrogène et par conséquent empêchent d'autres composés d'être oxydés (**Aouadhi et al., 2014**).

L'activité antioxydante des huiles essentielles est évaluée largement par le radical DPPH qui est diminué en présence d'un donneur d'hydrogène. Les résultats illustrés dans le **tableau 7** indiquent que l'huile essentielle de *M. vulgare* présentait une activité antioxydante modérée avec une valeur d'IC₅₀ de 153,84 µg/ml par rapport à celle de l'antioxydant synthétique (BHT=35 µg/ml). Ces résultats indiquent que l'huile essentielle de la plante riche en composé chimique tel que Tetramethyl heptadecan-4-olide Germacrene D-4-ol , α- pinène qui sont identifiés par GC-MS et qui ont des capacités antioxydantes faibles par rapport aux composés phénoliques (**Abadi et al., 2013**).

D'après les résultats de cette étude de (**Tabet Zatla, 2017**) on remarque que l'activité anti-oxydante de l'huile de *M. vulgare* était presque 6 fois inférieure au témoin le BHT avec (IC₅₀=99µg/ml ; BHT= 17.36 µg/ml).

Cet effet anti-radicalaire des huiles essentielles sur le DPPH• est dû à leur capacité donatrice d'un atome d'hydrogène, donc a partir de ce test on constate que la structure chimiques des huiles essentielles du *M. vulgare* n'avait pas une grande capacité donatrice d'hydrogène et par conséquent un effet antiradicalaire faible a été enregistré (**Conforti, 2006**)

III.1.9.2. Test B carotène

Le potentiel antioxydant d'un extrait végétal peut être évalué par la détermination de la capacité d'inhibition de l'oxydation du β -carotène. Dans ce teste, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaque les onze doubles liaisons du β -carotène, ce qui entraine une décoloration de cette dernière mesuré spectrophotométriquement à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (**Kubola et Siriamornpun, 2008**).

III.1.9.2.1. Résultats obtenus

Tableau 08 : Résultats de test de blanchiment du β -carotène des extraits méthanoliques et huiles essentielles du *M. vulgare*.

| | AAR (%) | IC50 ($\mu\text{g/mL}$) | BHT ($\mu\text{g/mL}$) | Références |
|---------------------------------------|---------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Extrait méthanolique | 63,77 | / | / | Ghedadba et al., 2014 |
| Huile essentielle | / | 149 | 0.6 | Tabet Zatla, 2017 |
| α tocopherol | 100 | | | |

Les activités inhibitrices de peroxydation des lipides par les polyphénols et les flavonoïdes ont été évaluées par l'essai du blanchiment du β -carotène qui est fondé sur la perte de la couleur jaune de β -carotène due à sa réaction aux radicaux qui sont constitués par oxydation d'acide linoléique dans une émulsion. Cette méthode est employée couramment parce que le β -carotène montre une activité biologique forte et est un composé physiologique important (**kadri et al., 2011**). Les résultats de blanchiment du β -carotène (**Tableau 8**) ont indiqué que l'activité de l'extrait méthanolique du *M.vulgare* est plus élevée (dans le système

de modèle à l'acide linoléique) avec (AAR = 63,77 %) proche de celle du standard utilisé (α -tocophérol (AAR=100%). (Ghedadba *et al.*, 2014). Ces résultats sont en accord avec les résultats de plusieurs groupes de recherche, qui ont rapporté une corrélation positive entre tout le contenu phénolique et l'activité antioxydante (Pukalskas, 2012), ainsi ils ont indiqué que le coefficient le plus élevé de l'activité antioxydante du *M. vulgare* dans le système de blanchiment du β -carotène est apporté par l'extrait méthanol-eau du marrube.

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *M. vulgare* a été évaluée par la méthode de blanchiment du β carotène. Les résultats de Tableau 8 indiquant que HEs du *M. Vulgare* ont une faible capacité inhibitrice de formation des radicaux libre de l'acide linoléique avec IC50=149 μ g/ml par rapport au contrôle positif qui été utilisé dans ce test le BHT=0.6 μ g/ml, cette activité peut-être due a la composition chimique des huiles essentielle qui n'avait pas une capacité suffisante pour inhiber la peroxydation de l'acide linoléique (Tabet Zatla, 2017).

III.1.9. 3. Effet scavenger de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire d'oxygène et considéré comme toxique pour les cellules car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule (Shrinivas *et al.*, 2011).

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV.

La diminution de la concentration de H₂O₂ par les composés piègeurs provoque la diinution de la valeur d'absorbonce de ce dernier à 230mm. Néanmoins les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (Malgalhaes *et al.*, 2008).

III.1.9.3.1. Résultats obtenus

Tableau 09 : Effet scavenger de peroxyde d'hydrogène par des extraits méthanoliques de *M. vulgare*.

| | % d'inhibition | Référence |
|----------------------|----------------|------------------------------------|
| Extrait méthanolique | 18.81 ± 0.37 | Khaled-Khodja <i>et al.</i> , 2014 |
| Acide ascorbique | 60.46 ± 2.14 | |

L'effet de piégeage de peroxyde d'hydrogène d'un antioxydant est montré par sa capacité donatrice des électrons et l'inhibition de formation du radical hydroxyle.

Dans cette étude nous avons remarqué que l'extrait méthanolique du *M. vulgare* capable de piégée le peroxyde d'hydrogène avec un pourcentage d'inhibition 18,81%; en comparant cet résultat avec celle de l'acide ascorbique qui avait un pourcentage 60 ,46% (Tableau 09) (Khaled-Khodja *et al.*, 2014).

III.2. Activité antimicrobienne

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections (CCE, 2001).

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé est utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles de la plante. Les disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'agent antimicrobien sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé préalablementensemencé avec un inoculum calibré d'une culture pure de la bactérie à tester. Après incubation, les boîtes de Pétri sont examinées et les diamètres des zones d'inhibition entourant les disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques des différents agents antimicrobiens testés, afin de déterminer la catégorisation clinique (résistant, intermédiaire, sensible). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la bactérie testée.

III.2.1. Activité antibactérienne

L'activite antibactérienne de de la plante médicinale *M. vulgare* a ete évaluée par la méthode de diffusion sur disques en milieu gélose.

Le tableau 10 est présenté les différentes résultats de l'activité antibactérienne.

Tableau 10 : Résultats de l'activité antibactérienne de différents extraits de *M. vulgare*.

| Type d'extrait | Souches bactériennes | Zone d'inhibition (mm) | Références |
|------------------------------|-------------------------------|------------------------|---|
| Extrait méthanolique | <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 ± 0.7 | Boudjelal, 2013 (Algérie) |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 09 ± 0.1 | |
| | | 12 ± 0.3 | |
| | <i>Escherichia coli</i> | | |
| Extrait flavonoïdique | <i>Escherichia coli</i> | 38 ±2,003 | Djahra, 2014 (Algérie) |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 38 ±1,014 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 00 ±00 | |
| Extrait tannique | <i>Escherichia coli</i> | 40 ±0,577 | Djahra . 2014 (Algérie) |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 34 ±2,466 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 ±2,291 | |
| Huiles essentielles | <i>Escherichia coli</i> | 00 ±00 | Zarai et al., 2011 (Tunisie) |
| | <i>Botrytis cinerea</i> | 00 ±00 | |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 00 ±00 | |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | 12.0 ± 0.5 | |
| | <i>Micrococcus luteus</i> | 12.0 ± 0.5 | |

III.2.2. Activité antifongique

L'activité antifongique des extraits et des huiles essentielles de *M. vulgare* a été évalué à travers des différentes souches fongiques.

Les résultats des tests sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Résultats de l'activité antifongique de différents extraits de *M. vulgare*.

| Type d'extrait | Souches fongiques | Zone d'inhibition (mm) | Références |
|----------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Extrait méthanolique | <i>Aspergillus flavus</i> | 14±0.5 | Zarai <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>Aspergillus niger</i> | 16±1 | (Tunisie) |
| Huiles essentielles | <i>Botrytis cinerea</i> | 12.6 ± 0.5 | Chedia <i>et al.</i> , 2014 |
| | <i>Fusarium solani</i> | 6.9 ± 0.5 | (Algérie) |
| | <i>Penicillium digitatum</i> | 6.6 ± 0.4 | |
| | <i>Aspergillus niger</i> | 6.4 ± 0.0 | |
| Extrait tannique | <i>Candida albicans</i> | 13 ±0,23 | Djahra, 2014 |
| | <i>Candida parapsilosis</i> | 29 ±0,41 | (Algérie) |
| | <i>Cryptococcus neoformans</i> | 22 ±0,30 | |

L'action antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits se déroule en trois phases: (I) attaque de la paroi bactérienne par les extraits, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires; (II) acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure; (III) destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie. (Chedia *et al.*, 2014).

D'après les résultats obtenus dans l'étude de Djahara *et al.* (2014), les extraits de la plante étudiée présentent un effet inhibiteur vis-à-vis les souches bactériennes examinées mais le pouvoir inhibiteur est plus ou moins important selon le type de souche. Les tanins et les flavonoïdes exercent un effet bactériostatique sur les trois souches. Cependant ; l'extrait tannique est présente un fort pouvoir inhibiteur vis-à-vis *E. coli* 12 et *S. aureus* ; par ailleurs *K. pneumoniae* semblent être très sensible à l'extrait flavonoïdique et *S.aureus* elle semble très résistante à ce dernier. Des résultats similaires ont été obtenus par Ulukanli et Akkaya, (2011).

Selon **Doss et al. (2009)** les tanins exercent un effet bactériostatique sur différentes souches et notamment *E.coli* et *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Les résultats présentés dans l'étude de **Zarai et al. (2011)** montrées que les bactéries de gram (+) :(*S. aureus* et *M. luteus*) sont plus sensibles à l'huiles essentielles de la plante étudiées tandis que aucun activité antibactérienne d'huiles essentielles testées contre les souches de gram(-) ; cela était confirmée par **Lopez et al. (2005)** et **Celyanet Fung, (2004)** sur d'autres épices et herbes. **Zhao et al. (2001)** expliquant que la résistance des souches gram (-) à les huiles essentielles pourraient être attribuées à la présence d'une membrane externe entourant la paroi cellulaire qui restreint la diffusion des composés hydrophobes à travers son revêtement lipopolysaccharide. L'absence de cette barrière dans les souches de gram (+) permet le contacte directe des constituants hydrophobes avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire ; ce qui induit soit à l'augmentation de la perméabilité aux ions et des fuites aux niveaux des constituants intracellulaires ; soit une altération des systèmes enzymatiques bactériennes.

Une étude réalisée par **Boudjelal et al. (2013)** sur l'extrait phénolique de *M.vulgare* a montré l'efficacité de cet extrait en tant que inhibiteur de la croissance bactérienne de sorte que son efficacité est supérieur contre les bactéries de gram (+); ce qui à été constaté aussi par **Al-Bakri et Affi. (2007)**.

Les travaux antérieurs de **Sarker et al. (2005)**, montrent également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement.Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les térapénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (**Seidel, 2005**).

Zarai et al. (2011) ont montrés que les deux souches fongique examiné (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*) étaient sensible aux huiles essentielles issus de la plante étudiée, les zones d'inhibition maximales ont été obtenus pour *Botrytis cinerea*. En se référant à la littérature, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testées peut être liée à la contribution du mélange entre le (g-eudesmol, b-citronellol, citronellyl formate et germacrene D) et (camphene, borneol). (**Kadri et al., 2011**) en plus germacrene-D est connu pour avoir une activité antibactérienne et antifongique (**Sahin, 2004**).

Chadia et al., (2014) ont montrés que l'extrait phénolique de *M.vulgare* est présente une activité antimicrobienne importante vis-à-vis *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*, par contre **Kanyonga et al. (2011)** ont montré que l'extrait de *M.vulgare* avait un effet plus faible que celui observée dans cette étude.

Cette variabilité dans l'activité antimicrobienne peut être dû à la différence dans la teneur en polyphénols et la méthode d'extraction ; la région de récolte ; la partie de la plante utilisée (la réparation des polyphénols) comme montré plusieurs auteurs (**Zarai et al., 2011**).

L'étude de **Djahra, (2014)** sur l'extrait tannique a montré la sensibilité des souches fongiques examinées à ce dernier ; dont le potentiel antifongique est très important pour *Candida parapsilosis* et *Cryptococcus neoformans* (**Sarac et Ugur, 2007; Khalili et al ., 2009 ; Kanyonga et al., 2011; Zarai et al., 2011**)

Des études réalisées aussi par **Djahra et al. (2014)** sur l'extrait flavonoïdique sur les mêmes souches fongiques montre que l'extrait tannique des feuilles de *M.vulgare* est plus efficace que l'extrait flavonoïdique avec des zones d'inhibition plus élevés.

Dans la littérature ; il a été indiquée que l'activités antimicrobienne des extraits des plantes dépendent de la nature et de la structure des composés phénoliques par leur groupe hydroxyle, les composés phénoliques ont une capacité de se lier aux protéines des membranes bactériennes pour former des complexes (**Zongo et al., 2011 ; Cown, 1999**).

Les tanins est reçu plus d'attention dû à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autre polyphénols à son capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne telle que l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques (**Daglia, 2011**).

Plusieurs chercheurs rapportent que les mono et sesqui-terpénoides sont les principaux composants des huiles essentielles qui sont de nature phénolique (**Oyedeji et Afolayan, 2005**) donc il est raisonnable de supposer que leur activité antimicrobienne pourrait être liée à l'abondance des composés phénoliques (**Zarai, 2011**).

III.3. Activité antidiabétique

C'est le pouvoir des principes actifs des plantes à traité les troubles glucidiques (l'hyperglycémie) lié à un déficit d'insuline ou à une résistance anormale des tissus à cette hormone. Cette étude est s'intéressent à la recherche des nouvelles substances d'origine végétale peuvent avoir une effet antidiabétique.

Les rats ont été injectés par voie intra péritonéale avec du monohydrate d'Alloxane (Sigma-Aldrich, USA) dissous dans l'eau saline stérile à une dose de 150 mg/kg de poids corporel (Matteucci *et al.*, 2008). Après 3 jours, l'hyperglycémie a été confirmée en utilisant un glucomètre.

Pour ce faire, quatre lots de cinq rats chacun ont été constitués :

CS : contrôle sain ; DNT : Diabétiques non traités ; DTM : Diabétiques traités par 5 mg/kg de glibenclamide ; DT 100 mg : Diabétiques traités par 100 mg/kg p.c. de plante ; DT 200 mg : Diabétiques traités par 200 mg/kg p.c. de plante ; DT 300 mg : Diabétiques traités par 300 mg/kg p.c. de plante.

Les préparations (médicament, infusé et eau) sont données oralement aux rats des six groupes deux fois par jour pendant 15 jours.

Le pourcentage de diminution de la glycémie est calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de diminution de la glycémie} = \frac{[\text{glycémie finale} - \text{glycémie initiale}]}{\text{glycémie initiale}} \times 100.$$

III.3.1. Résultats obtenus

L'effet de différentes doses de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare* sur la glycémie des rats diabétiques est présenté dans le tableau 12.

Tableau 12 : Effet de l'extrait aqueux du *Marrubium vulgare* sur la glycémie (**Boudjelal et al., 2013**).

| Lots / Dose (mg/kg) | Glycémie (mg / dl) | | | | | | | | % diminution glycémie |
|-------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------------|
| | Nombre de jours | | | | | | | | |
| | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | | |
| CS | - | 100,00 | 99,83 | 98,83 | 98,16 | 100,50 | 99,66 | 99,16 | 0,84 |
| DNT | - | 301,33 | 345,17 | 398,00 | 414,83 | 445,17 | 472,33 | 484,33 | (+) 60,73 |
| DTM | 5 | 379,8 | 332,8 | 286,17 | 225,17 | 179,17 | 149,17 | 129,50 | (-) 65,90 |
| | 100 | 387,50 | 360,50 | 301,15 | 287,00 | 247,17 | 229,67 | 190,83 | (-) 50,75 |
| | 200 | 320,17 | 283,00 | 211,00 | 171,33 | 146,83 | 13 | 124,67 | (-) 61,06 |
| DT <i>M. vulgare</i> | 300 | 381,00 | 360,67 | 288,00 | 198,33 | 163,50 | 155,33 | 142,67 | (-) 62,55 |

Les résultats montrent que dans le groupe diabétique non traité, les taux de glucose sont 3 à 4 fois plus élevés que ceux du groupe contrôle sain. La diminution de taux du glucose sanguin a été observé a partir du 5ème jour après le traitement des rats diabétiques tant pour les doses 200 que 300 mg/kg p.c, aussi dans le groupe traité avec le médicament de référence, le glibenclamide. Le traitement par l'extrait à la dose de 300 mg/kg p.c. a montré une baisse plus efficace de la glycémie (- 62.5%) comparable au médicament de référence (-65,90%).

Novaes et al., (2001) montrent l'efficacité de l'extrait aqueux du *M. vulgare* dans la diminution du taux de glucose ; ce qui confirme que cette plante médicinale peut être considérée comme un puissant agent dans le traitement du diabète.

D'après **Jarald et al. (2008)**, l'activité antidiabétique est attribuée à la richesse de l'extrait aqueux du marrube en flavonoïdes et verbascosides connus pour leurs activités antidiabétique et dont le mécanisme pourrait être une stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots et / ou l'inhibition du processus de dégradation de l'insuline.

III.4. Activité hémostatique

L'hémostase est l'ensemble des phénomènes permettant l'arrêt de l'écoulement de sang. L'activité hémostatique : c'est la capacité des substances naturelles à arrêter le saignement et sa capacité d'être des alternatives naturel aux médicaments chimiques

L'objectif global de ce test est d'évaluer *in vitro* l'activité hémostatique des extraits des feuilles de *M. vulgare* par la méthode de recalcification du plasma décalcifié.

Le choix d'étudier l'activité hémostatique sur l'extrait aqueux de la plante *M. vulgare* est motivé en raison de son utilisation déclarée en médecine traditionnelle par macération ou décoction dans l'eau.

Ce test a été effectué *in vitro* sur le plasma sanguin provenant d'une personne saine adulte mâle (25 ans) avec l'extrait aqueux de la partie aérienne du *Marrubium vulgare* selon la méthode décrite par **Nabil *et al.*, (2014)**.

Le principe de ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma décalcifié après recalcification (**Brummel *et al.*, 2002**).

Le sang est recueilli sur citrate de sodium. Le plasma est obtenu à partir du sang centrifugé à 3600 tours par minute, pendant 10 minutes. À l'aide d'une micropipette des volumes de 10 µl à 500 µl, l'extrait aqueux (100 mg/1ml) reparti à raison de 10µl, 50 µl, 100 µl, et 200 µl dans des tubes à essai pour chaque volume.

Un autre tube à essai vide a servi de témoin n'a reçu aucune dose de l'extrait. Les tubes sont maintenus au bain marie à 37° C. on a ajouté dans chaque tube 200 µl de plasma et 200 µl de chlorure de calcium (CaCl₂) à 0,025M ; après le chronomètre a été déclenché dès la pénétration du plasma dans le tube. Les observations ont commencés dès toutes les 30 secondes au début, puis fréquemment par la suite, jusqu'à ce que l'on observe la prise en masse du caillot, en notant le temps de coagulation pour les 2 tubes de chaque dose.

L'évaluation de la coagulation a été faite en penchant le tube sous un angle de 45° afin de constater la présence ou non d'un coagula. Le test est positif si le temps de coagulation d'un sang contenant un extrait est inférieur à celui du sang témoin.

III.4.1. Résultats obtenus

L'effet de l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* sur la coagulation sanguin est présenté dans le tableau 13 :

Tableau 13 : Effet de l'extrait de *M.vulgare* sur la coagulation sanguin. **Nabil *et al.*, (2014)**.

| Volume de l'extrait (μ l) | Temps de coagulation (en second) | |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------|
| | Plasma avec l'extrait | Temoin |
| 20 | 1.33 (93s) | |
| 50 | 1.22 (82s) | |
| 100 | 1.19 (79s) | 1.51 (111s) |
| 200 | 1.16 (76s) | |

Un volume de 20 μ l, 50,100 et 200 μ l successivement de l'extrait lyophilisé des feuilles sèches de *M. vulgare* confère une diminution du temps de recalcification de plasma *in vitro* en tube. C'est une diminution dose dépendante de cet extrait, donc l'extrait de la plante étudiée accélère la coagulation du plasma. Ce résultat est une indication intéressante en faveur d'une activité hémostatique et astringente de l'extrait aqueux de *M. vulgare*. Il est important de souligner ici que cette activité astringente favorise la vasoconstriction, ce qui est un paramètre important dans l'hémostase. Cette vasoconstriction est due à la présence de tanins dans cette plante. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés par (**Aouissa, 2002**). Ce dernier a constaté que la propriété astringente est liée à la teneur des tanins dans les feuilles de *Mangifera indica*.

Selon **Bruneton (2009)**, les tanins ont un effet hémostatique et vasoconstricteur sur les petits vaisseaux, ainsi que leur utilisation contre les varices et les hémorroïdes. Selon le même auteure les tanins utilisés par voie orale, sont vasoprotectrice; ils limitent la perte des liquides et favorisent la régénération des tissus en cas de blessure ou de brûlure superficielle.

III.5. Activité antiulcéreuse

L'activité antiulcéreuse a été évalué selon la méthode décrite par (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2005).

III.5.1. Protocol expérimental

- Ulcère induit par l'éthanol / HCl
- Après 12 h de à jeun, les souris ont été réparties au hasard en six groupes de six animaux dans chaque groupe.
- Le premier groupe a reçu 0,5 ml de véhicule (Solution aqueuse de Tween-80 à 1%), et le deuxième groupe était traités avec de l'oméprazole (30 mg / kg).
- Les groupes restants a reçu 25, 50 et 100 mg / kg d'extrait méthanolique de *M.vulgare* et 25 mg / kg de marrubine.
- Tous les traitements étaient administrés par voie orale par gavage.
- Une heure après le traitement, tous les souris ont reçu 0,5 ml d'un HCl 0,3 mol / l / éthanol à 60%solution (éthanol / HCl) pour induire des ulcères gastriques.
- Une heure plus tard, les animaux ont été sacrifiés par luxation cervicale, et les estomacs ont été enlevés et ouverts le long de la plus grande courbure.
- Les estomacs ont été doucement rincés à l'eau pour retirer le contenu gastrique et les caillots sanguins avant la numérisation.

III.5.2. Résultats obtenus

Tableau 14 : Effets de l'extrait méthanolique de *M.vulgare*, de la marrubiine et de l'oméprazole sur l'ulcère induit par l'éthanol chez la souris.

| Traitement | Dose (mg/kg) | Surface totale de la lésion (mm ²) | Pourcentage de la zone de lésion | Index des lésions ulcéreuses | Ratio curatif (%) |
|------------|-----------------|---|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Control | - | 33.97 ± 7.97 | 11.08 ± 2.94 | 28.80 ± 2.10 | - |
| Omeprazole | 30 | 4.13 ± 1.67** | 1.56 ± 0.56** | 5.80 ± 2.57** | 79.86 ± 0.59 |
| | 25 | 21.35 ± 5.25 | 5.78 ± 1.20 | 18.20 ± 2.57 | 36.81 ± 1.14 |
| Extrait | 50 | 11.90 ± 3.40 | 4.14 ± 1.15 | 14.60 ± 3.07** | 49.31 ± 0.57 |
| | 100 | 3.20 ± 0.76** | 1.41 ± 0.16** | 7.40 ± 2.01** | 74.31 ± 0.91 |
| Marrubiine | 25 | 3.32 ± 1.16** | 1.42 ± 0.58** | 11.00 ± 2.38** | 44.44 ± 11.09 |

D'après les résultats présentés dans le tableau 14 ; l'extrait méthanolique de *M. vulgare* (50 et 100 mg/kg) et oméprazole (30 mg/kg) réduit significativement l'indice de lésion, le total zone blessée et le pourcentage de zone blessée, par rapport à le groupe témoin. D'autre part, le composé principal isolée de la plante, la marrubiine diterpénique (25 mg/kg) réduit considérablement tous les paramètres par rapport au groupe de contrôle. Ces résultats indiquent que l'extrait est cytoprotecteur qui est corrélé avec la présence de marrubiine.

Conclusion

La phytothérapie peut constituer une médecine alternative ou au moins comme un complément à la pharmacie classique. La nécessité de trouver de nouvelles molécules reste une priorité de santé publique.

L'objectif principal de cette présente recherche bibliographique consiste à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles et des extraits de *M. vulgare*, plante aromatique appartenant à la famille des Lamiacées, largement utilisées en médecine traditionnelle et même et de les valoriser par la suite par une étude de leurs activités biologiques.

Les études ont montré la richesse de *M. vulgare* en composés bioactifs notamment les polyphénols, flavonoïdes et les huiles essentielles. Ce qui justifie la grande utilité de cette plante.

Les profils de différentes techniques d'analyse (chromatographie,,,) ont révélé la diversité de la composition chimique des huiles essentielles et d'extrait méthanolique de *M. vulgare*.

L'évaluation de certaines activités biologiques de *M. vulgare* a révélé que :

- Les extraits et les huiles essentielles de cette plante possèdent une activité antioxydante en piégeant les radicaux libres.
- Les extraits les huiles essentielles de cette plante présentent une forte activité antimicrobienne vis-à-vis des différentes souches bactériennes et fongiques testées.
- Les extraits de cette plante présentent aussi un pouvoir hypoglycémiant important.
- Les extraits de *Marrubium vulgare* ont un effet hémostatique considérable.
- Le test de l'activité anti-ulcéreuse de l'extrait et de marrubine a montré l'efficacité de ces derniers comme des anti-ulcéreux.

Les résultats et les données de cette étude bibliographique sont importants mais il sera intéressant de poursuivre ces recherches par d'autres études complémentaires afin d'illustrer les mécanismes d'actions et les composés impliqués dans les mécanismes moléculaires pour faciliter l'introduction de ces extraits dans l'industrie pharmaceutique et cosmétologique.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadi A. & Hassan A., 2013:** Essential oil composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Eastern Algeria. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* **9(1)**, 17-2.
- Al-Bakri A & Afifi F.U., 2007:** Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods* **68**, 19–25.
- Amri B., Emanuela M., Francesca V., Federica C., Leila B. B-K., Marta R., Daniela R., Michela M., Silvia. & Simona C., 2017 :** *Marrubium vulgare* L. Leave Extract: Phytochemical Composition, Antioxidant and Wound Healing Properties. *Tunis, Molecules* **22**, 1851,pp1-18.
- Ana P., José R. S., Marivane L., Luiz C.K. J., Angélica G. C., Christiane M. d. S. B., Valdir C. F. & Sérgio F. d. A., 2011 :** Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **63**, 1230–1237
- Aouadhi C., Hanene G., Hasnaoui B. & Maaroufi A., 2014:** Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of *Marrubium vulgare* methanolic extract; Tunis. *J. Med. Plants Nat. Prod* **11(1)**, 1-8.
- Aouadhi Ch., Ghazghazi H., Hasnaoui B., & Maaroufi A., 2013 :** Comparaison de l'activité antifongique d'extraits méthanoliques de trois plantes collectées du nord-ouest de la Tunisie *Microbiol. Hyg. Alim.-Vol* **25**.
- Aouissa I. W. R., 2002 :** Etude des activités biologiques et de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), Thèse de pharmacie. Bamako: Université de Bamako, 127.
- Asmat U., Abad K. & Ismail K., 2015:** Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **24**, 547-553.
- Avlessi F., Dangou J., Wotto V.D., Alitonou G.A., Sohounhloue D.K. & Menut C, 2004 :** Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie* 1057-1061.
- Balaban S., Nemoto S.& Finkel T., 2005:** Mitochondria, oxidants and aging. *Cell*, **120**, 483-495
- Bartosz G., 2003 :** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology* **9**, 5-21.
- Beecher G. R., Wu X., Holden J. M., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E. & Prior R. L., 2004:** Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agricultural and Food Chem* **52**, 4026–4037.
- Béjaoui A., Boulila A. & Boussaid M., 2013a :** Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *J. Med. Plants Res.* **7**, 2429-2435.
- 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.
- Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S. & Kalayci O., 2012 :** Oxidative stress and antioxidant

Références bibliographiques

defense. *WAO J* **5**, 9-19.

Blois M. S., 1958: Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.

Bonnefont R. D., Peynet J., Beaudoux J.L., Théron P., Legrand A & Delattre J., 2002 : Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nut Clin Metabol* **16**, 260-267.

Bordt E. A., Polster B.M., 2014: NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair. *Free Rad Biol Med* **76**, 34-46.

Bouchonnet S., 2009 : La spectrométrie e masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Ed Tec et Doc, *Lavoisier*, Parie, 194p.

Boudjelel A., 2013 : Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajuga iva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare*) de la région de M'Sila, Algérie ; ThèsePrésentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Algérie; 61p.

Brand W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **28**, 25-30.

Brigelius-Flohé R. & Maiorino M., 2013 : Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3289-3303.

Brummel K. E., Paradis S. G., Butenas S. & Mann K. G., 2002 : Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation, *Blood* **100**,148-152.

Bruneton J., 1999 : Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec and Doc. Lavoisier 3ème édition, Paris.

Bruneton J., 2009 : Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, 1288.

Calixto J. B., 2005: Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 131-134.

CCE., 2001 : Commission des Communautés Européennes: propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne. Bruxelles, vol 885.

Ceylan E., Fung DY., 2004 : Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **12**,1-55.

Chan K.L., 2003: Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion njury. *Curr Med Chem*, **1**, 1-13.

Chenni, M., 2016 : Thèse de Doctorat sur : Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum* L." extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. These de Doctorat Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. p 165.

Chérifa B., 2014 : Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques Université Mohamed Khider – Biskra Thèse page 47

Références bibliographiques

- Chu W.L., Lim Y.W., Radhakrishnan A.K & Lim P.E., 2010:** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complement Altern Med* **10** (53), 2-8.
- Congo M., 2012 :** Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliférative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica L.* (Salvadoraceae). Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso : 42p.
- Cowan M.M., 1999 :** Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12** (4), 564-582.
- Daels D., 1999:** Extraits phénoliques d'aubépine, de cola et d'églantier. Thèse de doctorat, université de Lille-II, France.
- Daglia M., 2011 :** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 1-8.
- Defraigne J. & Pincemail C., 2008 :** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège* **63**, 10-19.
- Del Río L.A. & López-Huertas E., 2016 :** ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol* **57**, 1364-1376.
- Delattre J., Beaudoux J.L. & Bonnefont-Rousselot., 2005 :** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales*, Paris, p 14, 93, 94.
- Deschepper R., 2017 :** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille. P 52 ; 72
- DJAHRA A., 2014 :** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L.* Université badji mokhtar – Annaba
- Doss A., Mohammed Mubarak H., Dhanabalan R., 2009 :** Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum L.* *Indian Journal of Science and Technology* **2**, 41- 43.
- El-Bardai S., Lyoussi B., Wibo M. & Morel N., 2004:** Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* **26(6)**, 465-474.
- Eline P., 2019 :** Phytothérapie - exemples de pathologies courantes à l'officine : Fatigue, Insomnie, Stress, Constipation, Rhume, Douleur et Inflammation. Thèse de doctorat. Lille.
- Favier A., 2003 :** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actual Chim* **11**, (12) ,108-115.
- Falleh H., Ksouri R., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., and Abdelly C. 2008 :** Phenolic composition of *Cyanara cardunculus L.* orange, and their biological activities .C.R. Biologies .**331** :372-379.
- Fukai T. & Ushio-Fukai M., 2011:** Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **15(6)**, 1583-1606.

Références bibliographiques

- Ghedadba N., H. Bousselsela L., Hambaba S., Benbia Y. & Mouloud., 2014 :** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *phytothérapie* 1-9.
- 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 *Rev Med Liege* 62, 628-638.
- Hansen S.S., Aasum E. & Hafstad A.D., 2018 :** The role of NADPH oxidases in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*.
- Haratymand W., Weryszko-Chmielewska E., (2017).** Ultrastructural and histochemical analysis of glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Flora*. 231, 11-20.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F., 2004 :** Polyphénols végétaux sources utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* 1, 3-6.
- Holmström K. M. & Finkel T., 2014 :** Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(6), 411-421.
- Jarald E., Balakrishnan J.S. & Chandra D.J., 2008 :** Diabetes and herbal medicines. *Iranian J Pharmacol Therap* 7, 97-106.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A. & Steven P., 2002:** Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. *Iere Ed* : Paris et Bruxelles. pp. 369-384.
- Kadri A., Zarai A. & Békir A., 2011:** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10, 3908-14.
- Kadri A., Zarai Z., Bekir 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(198), 3908-3914.
- Kalembe D., Kunicka A., 2003:** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr.Med. Chem* 10, 813-829.
- Kanyonga P.M., Faouzi M.A., Meddah B., Mpona M, Essassi E.M & Cherrah Y., 2011:** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3, 199-204.
- Khaled K.N., Boulekbache M. L., Khodir M., 2014:** Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products* 61, 41-48.
- khalil A., dababneh B.F., Al-gabbiesh A.H., 2009 :** Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal Jordanian plants. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 7 (2), 103-106.
- Kohen R., Nyska A., 2002 :** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *J Toxicol Pathol* 30, 620-650.

Références bibliographiques

- Kubola J. & Siriamornpun S., 2008:** Phenolic contents and antioxydant activities of bitter gourd (*Momordicacharantia L.*) Leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry* **110(4)**, 881-8.
- Lanciano P., Khalfaoui-Hassani B., Selamoglu N., Ghelli A., Rugolo M. & Dalda F., 2013 :** Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochim Biophys Acta* **1827**, 1332-1339.
- Leila L., 2015 :** Evaluation de l'activite antibacterienne d'huiles Essentielles marocaines sur aggregatibacter Actinomycetemcomitans :Etude in vitro université mohammed 5 rebat . p 37
- Letchamo W. & Mukhopadhyay S., 1997:** Variability in chromosomes, herb yield, essential oil content and potentials of horehound for North American commercial production. *J Horti Sci* **72**, 741-748.
- Li A.N., Li S., Zhang Y.J., Xu X.R., Chen Y.M., & Li H.B., 2014 :** Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* **6**, 6020-6047.
- Limbach S., & Guiland J.C., 2007 :** Vitamines. *Dans: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 2eme éd, France, Springer- Verlag*, pp 127-143.
- Lismont C., Nordgren M., Van Veldhoven P.P.& Fransen M., 2015 :** Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **3**, 1-19.
- Louiza H., 2018 :** Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon*) encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée universite freres mentouri constantine 1. P 11
- Lopez P., Sanchez C., Batlle R., Nerin C., 2005:** Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **5**,6939-6946.
- Lucchesi M.E., 2005 :** Extraction sans solvant assistée par les micro-ondes. Thèse pour le diplôme de docteur en sciences (chimie). Université de la Réunion.
- Maataoui B. S., Hmyene A., Hilali S., 2006:** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal* **(1)**, 3-8.42
- Marie-Claude M., 2004 :** Les antioxydants. Actifs et additifs en cosmétologie .*Ed.Tec & Doc* , 337 -352.
- Martinez-Cayuela M., 1995 :** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147-161.
- Martins E., 2014 :** The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology* **4**,177-1.
- Matteucci E & Giampietro O., 2008:** Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol* **115**,163–172.
- Meyre S.C., Yunes R.A., Schlemper V., Campos-Buzzi F. & Cechinel-Filho V., 2005:** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene presentin *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *II Farmaco* **60**, 321-326.

Références bibliographiques

- Molyneux P., Songklanakarin J., 2004:** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *SciencesTechnology* **26 (2)** , 211-219.
- Moniczewski A., Gawlik M., Smaga I., Niedzielska E., Krzek J., Przegaliński E., Pera J., Filip M., 2015:** Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacol Reports* **67**, 560-568.
- Monteil C., Mulder P., Thuillez C., 2004:** Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique Inserm U64 2 2 : p. 79.
- Nabil G., Leila H., Aberkane S. M., Oueld-Mokhtar ., Nassima F ., Houas B., 2014 :** Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de Marrubium vulgare L. *Algerian Journal of Natural Products* **2**,64-74.
- Nébié R.H.C., Yaméogo R.T, Bélanger A., Sib F.S., 2004 :** Salicylate de méthyle, constituant unique de l'huile essentielle de l'écorce des racines de *Securidaca longepedunculata* du Burkina Faso. *C R Chimie* **7**, 1003-1006.
- Novaes A.P., Rossi C., Poffo C., Pretti E.J., Oliveira E.A. & Schlemper V., 2001 :** Preliminary evaluation of effect of some Brazilian medicinal plants. *Thérapie*
- Ortiz G.G., Pacheco-Moisés F.P., Bitzer-Quintero O.K., Ramírez-Anguiano A.C., Flores-Alvarado L.J., Ramírez-Ramírez V., Macias-Islas M.A., & Torres-Sánchez E.D., 2013 :** Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*1-14.
- Oyedéji O & Afolayan A., 2005:** Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L. ocymifolia* in the Eastern Cape. *African J Bot* **71**,114-116.
- Ozenda P. (2004)** .Flore et végétation des sahara. *3ème Ed : CNRS édition*. Paris. pp.399 -402.
- Panaiva L., 2006 :** Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. *Conférence Eurocopter*, pp 2-24.
- Pelt J.M. (2001)**. Les nouveaux actifs naturels. *Marabout*. Paris 219-124.
- Pisoschi A.M., Pop A., 2015:** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* **97**, 55-74.
- Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009:** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*.
- Poprac P., Jomova K., Simunkova M., Kollar V., Rhodes C. & Valko M., 2017:** Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences* **38**, 592-607.
- Pukalskas A., Venskutonis P.R., Salido S., Waard P. & van Beek T.A., 2012:** Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chem***130**, 695–701.
- Quezel P. & Santa S., 1963 :** La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Tome II, Ed : CNRS*. Paris. 360-361 p.

Références bibliographiques

- Rahman I, Adcock I.M., 2006 :** Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* **28**, 219-242.
- Riché MD., 2008 :** Micronutrition, santé et performance: Comprendre ce qu'est vraiment la micronutrition. De Boeck Supérieur 386 p.
- Rigano D., Apostolides A. N., Bruno M., Formisano C., Grassia A., Piacente S., Piozzi F. & Senatore F., 2006:** Phenolic compounds of *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum* from Lebanon. *Biochemical Systematics and Ecology* **34**: 256-260.
- Roman Ramos.R., Alarcon-Aguilar F., Lara-Lemus .A . & Flores-Saenz JL., 1992:** Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch Med Res*, **23(1)**: 59- 64.
- Sahin F., Gulluc M., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M., Agar G & Ozer H., 2004 :** Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* **15**,549-557.
- Sahpaz S., Garbacki N., Tits M. & Bailleul F., 2002:** Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol* **79(3)**, 389-392.
- Saito S., Lin Y.C., Tsai M.H., Lin C.S., Murayama Y., Sato R., Yokoyama K.K., 2015:** Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells. *Kaohsiung J Med Sci*, **31**, 279-286.
- Sarac N & Ugur A., 2007:** Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some lamiaceae species growing in mugla, turkey. *Eurasian journal of biosciences* **4**, 28-37.
- Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I., 2005:** Natural products isolation. Humana Press (Totowa). Pp: 1-23.
- Schlemper V., Ribas A., Nicolau M.C.V., 1996:** Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine* **3(2)**, 211-216.
- Schmeda-Hirschmann G., Yesilada E., 2005:** Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *J Ethnopharmacol* **100**, 61–66.
- Seidel V., 2005 :** Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). pp: 27-37.
- Singh U., Devaraj S. & Jialal I., 2005:** Vitamin e, oxidative stress, andInflammation. *Annual Review of Nutrition* **25**, 151-175.
- Shrinivas B., Suresh R N., (2011) :** Identification of 3-carotene and 3-sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International Journal of Phytomedicine* (3): 20.
- Slauch J.M., 2011:** How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol* **80**, 580-583.
- Souza M.M., Jesus R., Cechinel-Filho V. & Schlemper V., 1998:** Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. *Phytomedicine* **5(2)**, 103-107.
- Stulzer H.K., Tagliari M.P., Zampirolo J.A., Cechinel-Filho V. & Schlemper V., 2006:** Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. *J. Ethnopharmacol* **108(3)**,

Références bibliographiques

379-392.

- Tabet Z.A., 2017 :** Caractérisations chimiques et étude biologiques d'extraits de quatre plantes aromatiques " *Daucus. carota* ssp. *sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballota nigra* et *Cynoglossum cheirifolium*" de la région de Tlemcen. thèse de doctorat en science Tlemcen – Algérie ,156p.
- Tanumihardjo S.A., 2013:** Carotenoids and Human Health. *Humana Press, Springer. USA.*
- Tsimikas S., Brilakis ES. & Miller ER., 2005:** Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* **353**, 46-57.
- Ulukanli Z., Akkaya A., 2011:** Antibacterial Activities of *Marrubium catariifolium* and *Phlomis pungens* Var. *Hirta* Grown Wild in Eastern Anatolia, Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology* **13**,105-109.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M., 2006 :** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol Inter* **160**, 1-40.
- Vincent A. M., Russell J. W., Low, P. & Feldman E. L., 2004 :** "Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy." *Endocrine reviews* **25(4)**, 612-628.
- Weel K.C.G., Venskutonis P.R., Pukalskas A., Gruzdiene D. & Linssen J.P.H., 1999:** Antioxidant activity of horehound(*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania. *Fett/Lipid* **101(10)**, 395-400.
- Ye Z.-W., Zhang J., Townsend D.M. & Tew K.D., 2015:** Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1850(8)**, 1607-1621.
- YousefiK., Sanaz H., Mohammadali T. & Fatemeh F., 2016:** Chromatographic Fingerprint Analysis of Marrubiin in *Marrubium vulgare* L. via HPTLC Technique. *Adv Pharm Bull* **6(1)**, 131–136.
- Yu R., Mandleka S. & Tony A.N., 2000:** "Molecular mechanisms of butylated hydroxyanisole induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology* **58**, 431- 437. EPHE
- Zarai Z., Kadri A., Ben Chobba I., Ben Mansour R., Bekir A., Mejdoub H., Gharsallah N., 2011 :** The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in Health and Disease* **10**, 161-
- Zaabat N., Darbour N., Bayet C., Michalet S., Doléans-Jordhem A., Chelr-Ghedlra L., ... & Dijoux-Franca M. G., 2010 :** Étude préliminaire de *Marrubium deserti* de Noé, une Lamiaceae endémique algérienne. *Phytothérapie*, **8(6)**, 353-358.
- Zhang D.X. & Gutterman D.D., 2007:** Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology.* **292(5)**, 2023-2031.
- Zhao WH., Hu ZO., Okubo S., Hara Y., Shimamura T., 2001 :** Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* **45**,1737-1742.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., 1999:** Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chem***64**, 555-559.

Références bibliographiques

Zongo C., Savadogo A., Somda K.M., Koudou J., Traore A.S., 2011: In *vitro* evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* H.B. & K. and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. *International Journal of Phytomedecine* **3**, 182-191.