



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 الابراهيمي

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

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارضوالكون

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 : Analyse et contrôle de qualité des denrées alimentaires

## Thème

**Évaluation des effets biologiques (Activité  
antioxydante, antibactérienne et antifongique) de  
*Marrubium vulgare***

Présenté par :

- Benahmed Amel
- Chergui Messaouda
- Rebai Khalil

Devant le jury :

|                                 |     |  |
|---------------------------------|-----|--|
| <b>Président :</b> Dr Akbache.A | MCB | Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A |
| <b>Promoteur :</b> Dr Diafat.A  | MCB | Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A |
| <b>Examineur :</b> Mr Meribai A | MAA | Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A |

Année universitaire : 2015/2016

## REMERCIEMENTS

*Avant toute chose, nous remercions Allah, notre Dieu qui nous a donné la force et la patience pour accomplir ce travail.*

*Nous tenons à exprimer nos remerciements à notre promoteur monsieur Diafat Abdelouahab qui a mis toute sa compétence à notre disposition et pour son suivi régulier à l'élaboration de ce modeste travail.*

*Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à monsieur Akbache Abderrazak d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Nous adressons un grand merci à monsieur Meribai Abelmalek pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant à examiner ce mémoire.*

*Nos remerciements vont aussi aux  
Mr Deghima Amirouche, Mr Sadrati Nouari, Mr Messis Abdelaziz,  
pour leur soutien et leurs conseils.*

*Nos derniers remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*



*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents qui me couvrent de leur  
soutien, affection et encouragement*

*A mon frère*

*A mes sœurs*

*Et à tous mes amis.*

*KHALIL*

*Marrubium vulgare* L (Le marrube blanc), famille des Lamiacées, est une plante herbacée vivace, spontanée très répandue dans la région méditerranéenne. La présente étude a pour but d'évaluer les différentes activités biologiques, l'activité antioxydante ainsi que l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de cette plante.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test de DPPH, la chélation de Fer, le pouvoir réducteur et la réduction de radical-cation ABTS<sup>+</sup>.

La détermination de l'activité antioxydante, a montré que tous les extraits ont une forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH, un pouvoir réducteur important et un effet piègeur significatif du radical-cation ABTS<sup>+</sup>.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en puits. Les extraits ont été testés sur six bactéries pathogènes pour l'être humain, cinq champignons phytopathogènes et une levure.

Il en ressort que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, la concentration du produit testé. Le résultat le plus intéressant est celui de l'extrait aqueux contre la bactérie *Bacillus cereus* (22 mm).

Pour l'activité antifongique, toutes les souches testées ont été résistantes vis-à-vis tous les extraits de la plante.

### **Mots clés :**

*Marrubium vulgare* L, métabolites secondaires, activité antioxydante, activité antimicrobienne, chélation de fer, dosage des polyphénols totaux et de flavonoïdes.

*Marrubium vulgare* L (White horehound), Lamiaceae family, is a perennial herb spontaneous, very responded in the Mediterranean region. The present study is carried out by the evaluation of the different biological activities ; antioxidant, antibacterial and antifungal activities of different extracts of this plant.

The antioxidant activity was determined using the test of DPPH, iron chelating activity, reducing power and radical cation-reduction ABTS +.

The determination of antioxidant activity showed that the extracts have a strong anti-radical activity against the radical DPPH, an important the reducing power. And also a significant ABTS<sup>+</sup> radical-cation scavenging effect.

The antimicrobial activity was determined by agar well diffusion method. The extracts were tested against six human pathogenic bacterial strains, five phytopathogenic fungi and one yeast.

It shows that the inhibition of the growth of microorganisms tested varies depending on the microbial species, the concentration. The highest zone of inhibition recorded by the aqueous extract against *Bacillus cereus* (22mm).

For the antifungal activity, all tested strains were resistant against all the extracts of this plant.

**Keywords :**

*Marrubium vulgare*, secondary metabolites, antimicrobial activity, antioxidant activity, iron chelating activity, determination of total polyphenols and flavonoids.

يعتبر نبات *Marrubium vulgare* (النعناع الأبيض) من بين النباتات الطبية التي يستفاد من شهرتها العلاجية وتحتاج الى أبحاث جادة للتعرف على صفاتها الكيميائية والبيولوجية، وهو نبات من عائلة الشفوية، عشبة معمرة وعفوية، تتواجد في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

تهدف هذه الدراسة الى تقدير مختلف الأنشطة البيولوجية (المضادة للأكسدة، المضادة للبكتيريا، والمضادة للفطريات) لمستخلصات هذه النبتة .

قدرت النشاطية المضادة للأكسدة لهذه النبتة باستعمال ثلاث طرق مختلفة: اختبار إرجاع الجذر الحر DPPH ، اختبار القدرة الإرجاعية واختبار إرجاع جذر  $ABTS^+$ .

أظهرت نتائج النشاطية المضاد للأكسدة أن جميع المستخلصات لديها كفاءة عالية لإرجاع الجذر الحر DPPH وقدرة إرجاعية مهمة جدا.

تقدير النشاطية المضادة للمكروبات تم باستعمال طريقة الانتشار في الحفر وذلك باختبار مستخلصات هذه النبتة على ستة أنواع من البكتيريا الممرضة للإنسان وخمس أنواع من الفطريات الممرضة للنباتات، وكذلك على نوع واحد من الخمائر.

أظهرت النتائج أن تثبيط نمو الميكروبات يختلف حسب نوع السلالة، وتركيز المستخلص، حيث أن أحسن نتيجة تثبيط تم تسجيلها هي 22 مم والتي كانت مع المستخلص المائي ضد البكتيريا *Bacillus cereus* أما بالنسبة لنتائج النشاطية المضادة للفطريات، فقد كانت جميع السلالات المجهرية مقاومة لجميع مستخلصات هذه النبتة.

### الكلمات المفتاحية:

*Marrubium vulgare*، المستقبلات الثانوية، النشاطية المضادة للميكروبات، النشاطية المضادة للأكسدة، إلتقاط أيونات الحديد، التقدير الكمي للمركبات متعددة الفينول الكلية والفلافونويدات.

# Sommaire

---

|                        |    |
|------------------------|----|
| Liste des abréviations |    |
| Liste des tableaux     |    |
| Liste des figures      |    |
| Résumé                 |    |
| Abstract               |    |
| الملخص                 |    |
| Introduction .....     | 01 |

## Partie 1. Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Les compléments alimentaires

|   |    |
|---|----|
| I.1. Définition .....   | 03 |
| I.2. Marché des compléments alimentaires .....  | 03 |
| I.3. Rôle des compléments alimentaires.....   | 03 |
| I.4. Classification des compléments alimentaires .....  | 03 |
| II. Le stress oxydatif .....  | 05 |
| II.1. Définition .....  | 05 |
| II.2. Les radicaux libres.....  | 05 |
| II.3. Conséquences de la production des Espèces réactives de l'oxygène sur (ERO) l'organisme..... | 05 |
| II.4. Les antioxydants .....  | 06 |
| II.4.1. Antioxydants endogènes .....  | 06 |
| II.4.2. Antioxydants exogènes.....  | 06 |
| II.4.3. Antioxydants d'origine végétale .....   | 07 |

### Chapitre II : Les plantes médicinales

|   |    |
|---|----|
| II.1. Médecine traditionnelle .....                             | 08 |
| II.2. Les plantes médicinales .....                             | 08 |
| II.2.1. Définition.....   | 08 |
| II.2.2. Utilisation traditionnelle des plantes médicinales..... | 08 |
| II.3. Les principaux métabolites secondaires.....               | 11 |
| II.3. 1. Polyphénols .....                                      | 11 |
| II.3. 2. Les flavonoïdes.....                                   | 12 |
| II.3. 3. Les alcaloïdes.....                                    | 12 |
| II.3. 4. Les tanins.....  | 12 |

### Chapitre III : *Marrubium vulgare*

|  |    |
|--|----|
| III.1. Généralités sur le Genre <i>Marrubium</i> .....           | 14 |
| III.2. L'espèce : <i>Marrubium vulgare</i> .....                 | 14 |
| III.2.1. Description botanique de <i>Marrubium vulgare</i> ..... | 14 |
| III.2.2. Systématique de la plante .....                         | 15 |
| III.2.3. Distribution et culture.....                            | 15 |
| III.2.4. Composition chimique.....                               | 15 |
| III.2.5. Utilisation de <i>Marrubium vulgare</i> .....           | 16 |
| III.2.6. Etudes scientifiques sur <i>Marrubium</i> .....         | 16 |

## Partie 2. Etude expérimentale

### Chapitre IV : Matériel et méthodes

|  |    |
|--|----|
| IV. Matériel.....  | 18 |
| IV.I.1. Produits et réactifs.....                                    | 18 |
| IV.I.2. Appareillages .....  | 18 |
| IV. I. 3. Matériel végétal.....                                      | 18 |
| IV.II. Méthodes .....  | 19 |
| IV.II.1. Extraction .....  | 19 |
| IV..II.1.1. Extraction par les solvants.....                         | 19 |
| IV.II.1.2. Détermination du rendement.....                           | 21 |
| IV. II.2. Analyses quantitatives des extraits .....                  | 21 |
| IV. II.2.1. Dosage des polyphénols .....                             | 21 |
| IV.II.2.2. Dosage des flavonoïdes .....                              | 21 |
| IV. I.3. Activités biologiques de la plante.....                     | 22 |
| IV. II.3.1 Activité anti oxydante .....                              | 22 |
| IV.II.3.1.1 Inhibition du radical DPPH .....                         | 22 |
| IV.II.3.1.2 Réduction des ions métalliques (Pouvoir réducteur) ..... | 23 |
| IV.II.3.1.3 Réduction du radical-cation ABTS+ .....                  | 24 |
| IV.II.3.2 Chélation du fer.....                                      | 24 |
| IV.II.3.3 Activité antimicrobienne.....                              | 25 |
| IV.II.3.4 Activité antifongique.....                                 | 26 |

### Chapitre V : Résultats et discussion

|  |    |
|--|----|
| V.1. Résultats.....                      | 27 |
| V.1.1 Rendement d'extraction.....        | 27 |
| V.1.2 Dosage des polyphénols totaux..... | 27 |
| V.1.3. Dosage des flavonoïdes .....      | 28 |
| V.1.4 Activités biologiques .....        | 29 |
| V.1.4.1 Activité anti oxydante.....      | 29 |
| V.1.4.2 Chélation du fer .....           | 34 |
| V.1.4.3Activité antimicrobienne .....    | 35 |
| V.1.4.4 Activité antifongique .....      | 36 |
| V.2. Discussion .....                    | 37 |
| Conclusion.....                          | 45 |
| Références bibliographiques              |    |
| Annexe                                   |    |



|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau N° 1</b> : Données géographiques de site de récolte.....   | 19 |
| <b>Tableau N° 2</b> : Rendement d'extraction .....  | 27 |
| <b>Tableau N° 3</b> : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits de <i>Marrubium</i><br><i>vulgare</i> .....                | 28 |
| <b>Tableau N° 4</b> : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de <i>Marrubium</i><br><i>vulgare</i> .....                       | 28 |
| <b>Tableau N°5</b> : Diamètres des zones d'inhibition en mm des souches microbiennes vis-à-vis l'antibiotique Amoxicilline..... | 36 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure N°1</b> : <i>Olea europaea</i> : « feuille d'Oliver » .....  | 09 |
| <b>Figure N°2</b> : <i>Ajuga iva</i> .....   | 10 |
| <b>Figure N°3</b> : <i>C. Artemisia herba alba</i> .....   | 11 |
| <b>Figure N°4</b> : Description botanique de <i>Marrubium vulgare</i> .....  | 14 |
| <b>Figure N°5</b> : <i>Marrubium vulgare</i> .....   | 16 |
| <b>Figure N°6</b> : Le site de la récolte.....   | 18 |
| <b>Figure N°7</b> : Méthode d'extraction.....  | 20 |
| <b>Figure N°8</b> : Forme libre et réduite du DPPH .....   | 22 |
| <b>Figure N°9</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....   | 28 |
| <b>Figure N°10</b> : Courbe d'étalonnage de Quercétine.....  | 29 |
| <b>Figure N°11</b> : Inhibition de radical DPPH pour les extraits de <i>Marrubium vulgare</i> .....                              | 30 |
| <b>Figure N°12</b> : Inhibition de radical DPPH pour les standards .....   | 30 |
| <b>Figure N°13</b> : Pouvoir réducteur d'extrait chloroformique .....  | 31 |
| <b>Figure N°14</b> : Pouvoir réducteur d'extrait méthanolique .....  | 31 |
| <b>Figure N°15</b> : Pouvoir réducteur d'extrait hexanique .....   | 31 |
| <b>Figure N°16</b> : Pouvoir réducteur d'extrait aqueux .....  | 31 |
| <b>Figure N°17</b> : Pouvoir réducteur d'extrait d'acétate d'éthyle .....  | 32 |
| <b>Figure N°18</b> : Pouvoir réducteur des standards utilisés ; l'acide gallique et l'acide ascorbique.....                      | 32 |
| <b>Figure N°19</b> : Inhibition du radical cationique ABTS <sup>+</sup> de différents extraits de <i>Marrubium vulgare</i> ..... | 33 |
| <b>Figure N°20</b> : Activité chélatrice des ions ferreux par les extraits de <i>Marrubium vulgare</i> .....                     | 34 |
| <b>Figure N°21</b> : L'effet de l'antibiotique Amoxicilline.....   | 35 |
| <b>Figure N°22</b> : L'activité inhibitrice de l'extrait aqueux contre la bactérie <i>Bacillus cereus</i> .....                  | 36 |
| <b>Figure N°23</b> : Activité antifongique .....   | 36 |

- **ABTS** : Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline) -6-sulfonique.
- **AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium.
- **C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>** : Quercétine.
- **C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>** : Ferrozine.
- **C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>** : Acide Ascorbique.
- **C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>** : Acid gallique.
- **CH<sub>4</sub>O** : Méthanol.
- **CLA** : Acides Linoléique Conjugués.
- **DMF** : Diméthylformamide.
- **DPPH** : Diphényl picryl-hydrayl.
- **e<sup>-</sup>** : Electron.
- **EAct** : Extrait Acétate d'éthyle.
- **EAQ** : Equivalents d'Acide gallique.
- **Eaq** : Extrait Aqueux.
- **ECh** : Extrait Chloroformique.
- **EH<sub>x</sub>** : Extrait Hexane.
- **EMet** : Extrait Méthanolique.
- **EQ** : Equivalents de Quercétine.
- **ERO (ROS)** : Espèces réactives de l'oxygène.
- **FDA** : Food and drug administration.
- **FeCl<sub>2</sub>** : Chlorure de fer.
- **FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure ferrique.
- **G<sup>-</sup>** : Gram négative.
- **G<sup>+</sup>** : Gram positive.
- **H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** : Acide phosphorique.
- **Hcl** : Acides chlorhydrique.
- **HE** : Huiles essentielles.
- **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : Potassium phosphate dibasique.
- **K<sub>3</sub>Fe(CN<sub>6</sub>)** : Ferricyanure de potassium.

- **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Potassium phosphate monobasique.
- **M** : Marrubium.
- **M** : Molaire.
- **MH** : Muller Hinton.
- **mM** : Mili molaire.
- **Nacl** : Chlorure de sodium.
- **nm** : Unit de mesure d'absorbance, nanomètre.
- **OH** : Hydroxyles.
- **OMS** : Organisation mondiale de la Santé.
- **PDA** : Potato Dextrose Agar.
- **pH** : Potentiel Hydrogène.
- **PM** : Plantes Médicinales.
- **R<sup>2</sup>** : Coefficient de corrélation.
- **Rpm** : Rotation par minute
- **TCA** : Acide trichloracétique.
- **TEAC** : Trolox équivalent antioxydant capacité.

Le stress oxydant a été décrit comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation, diabète mellitus et vieillissement. L'intérêt pour les antioxydants (non toxiques) normaux et particulièrement d'origine végétale, a considérablement augmenté ces dernières années (**Ghedadba et al., 2015**).

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques (**Boutlelis Djahra., 2014**).

Le recours aux plantes médicinales pour se guérir a pris naissance depuis bien longtemps en médecine traditionnelle grecque, romaine, indienne, chinoise et arabomusulmane (**Hmamouchi., 1999**). Le nombre de produits naturels, de médicaments à base de plantes ou de substances végétales ne cesse de croître à l'échelle mondiale. De même, la recherche scientifique ne cesse de nous fournir de nombreux principes actifs à partir de plantes (**Aid et al., 2003**). Jusqu'à présent, sur les 300000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (**Verpoorte., 2002**), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré.

L'Algérie, un pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (**Gaussen., 1982**). Néanmoins, il faut noter que, d'une part, le nombre d'espèces végétales diminue et que d'autre part, le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement.

Il en résulte une urgence à connaître et protéger ces espèces et les savoirs qui leur sont associés. La recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue d'ailleurs un des axes prioritaires de l'industrie pharmaceutique algérienne mais également des médecins et des chimistes cherchent à mieux connaître le patrimoine des espèces spontanées utilisées en médecine traditionnelle (**Boutlelis Djahra., 2014**).

*Marrubium vulgare* L, est parmi les plantes médicinales recensées auprès des populations et bénéficiant de bonnes renommées thérapeutiques qui devront être mises à l'épreuve d'investigations sérieuses de décryptages chimiques et biologiques. Cette espèce, très riche en tanins et flavonoïdes, est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est employée par les tradipraticiens contre le diabète,

les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les affections bronchiques aiguës bénignes et les rhumes (**Sijelmassi., 2000**).

C'est dans ce contexte, que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est de faire l'extraction des différents métabolites secondaires de *Marrubium vulgare* afin d'évaluer les différentes activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et antifongique).

*Synthèse*

---

*Bibliographique*



# *Chapitre I*

---

## *Les compléments alimentaires*



## **I. Les compléments alimentaires**

### **I.1. Définition**

Un complément alimentaire est défini comme étant un produit destiné à compléter le régime alimentaire (**Martinez et al., 2012**) pour améliorer la santé (**Halsted., 2000**), il contient un ou plusieurs ingrédients alimentaires (y compris les vitamines, les minéraux, les herbes, et acides aminés) et à être pris par voie orale sous forme de comprimé, gélule, ou liquide (**Martinez et al., 2012**).

### **I.2. Marché des compléments alimentaires**

En 2014, le marché mondial des compléments alimentaires approche les 200 milliards de dollars qui se répartissent ainsi : 44,2 % en Asie, 32,6 % en Amérique du Nord et 14,4 % en Europe occidentale. (**Dupuy., 2015**).

### **I.3. Rôle des compléments alimentaires**

Selon **Baillet, (2012)** un complément alimentaire comme son nom l'indique, sert à compléter un régime alimentaire normal, son but est :

- ✓ D'aider notre organisme à garder la santé, voire à l'améliorer.
- ✓ Il est destiné aux personnes souhaitant compléter leur apport en certains nutriments du fait d'un mode de vie particulier.
- ✓ Il peut être utilisé pour corriger des déficiences nutritionnelles ou maintenir un apport approprié de certains nutriments.

### **I.4. Classification des compléments alimentaires**

Les compléments alimentaires sont classés en vitamines, minéraux, protéines, acides aminés, plantes et préparation des plantes.

#### **I.4.1. Les vitamines et minéraux**

Les vitamines et les minéraux sont couramment utilisés comme suppléments alimentaires pour promouvoir la santé et prévenir les maladies chroniques.

Une multivitamine est le supplément le plus fréquemment utilisé (**Fortmann et al., 2013**). La plupart des multivitaminés et des suppléments minéraux contiennent au moins 10 vitamines ou minéraux avec une large gamme de doses. De nombreuses personnes utilisent des multivitaminés et des suppléments minéraux pour des buts prophylactiques ou d'atténuation de la maladie (**Huang et al., 2007**).

Les vitamines les plus utilisées sont B, (B1, B2, B3, B5, B6, B9 et B12) la vitamine C, et la vitamine E, ainsi que la vitamine A et la vitamine D (**Lauzanne., 2006**).

Du côté des minéraux, c'est le sélénium et le magnésium qui sont aussi bien connus. L'un pour ses immenses propriétés anti-oxydantes et l'autre pour son aptitude à redonner l'énergie et le moral. Mais nombreuses sont ces petites molécules utilisées dans la composition des compléments alimentaires : calcium, chrome, cuivre ou fer, à chacun sa place pour la beauté de la peau, la solidité des os ou le bien-être des articulations (**Lauzanne., 2006**).

### I.4.2. Les protéines, acides gras et acides aminés

Plus originales, mais tout aussi plébiscitées, les compositions à base d'acide gras comme les fameux oméga 3, issus d'huiles de poissons ou d'huiles végétales, dont l'action sur l'humeur et le cœur n'est plus à démontrer. Mais la liste des protéines, des acides aminés et des acides gras est longue, on y trouve les CLA (acides linoléiques conjugués) qui sèchent la musculature en empêchant les graisses de se fixer mais également toutes sortes de protéines et d'acides gras (**Lauzanne., 2006**).

### I.4.3. Les plantes et préparation de plantes

L'utilisation des plantes pour leurs propriétés sur la santé remonte à l'antiquité et est ancrée dans toutes les cultures (**Caro et al., 2010**).

Les plantes à usage traditionnel détiennent une place importante dans les ingrédients utilisés dans les compléments alimentaires. Les utilisations de plantes dans les compléments alimentaires s'appuient sur des usages traditionnels (poudres, extraits secs ou aqueux) ou sur des techniques d'extraction plus modernes permettant l'obtention de substances isolées de plantes (ex : lutéine, lycopène...) (**Caro et al., 2010**).

La liste des plantes utilisées dans les compléments alimentaires est sans fin. Il suffit de piocher dans le patrimoine traditionnel pour découvrir mille et un actifs utiles à la santé. Au rayon plantes, c'est la minceur qui draine le plus de références : fenouil, artichaut, reine des prés pour drainer, thé vert et guarana pour brûler les calories, ou encore gingembre et radis noir pour se débarrasser des toxines.

## **II. Le stress oxydatif**

### **II.1. Définition**

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003).

### **II.2. Les radicaux libres**

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié dans leur orbite extrême tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ), et le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ) (Wu et Cederbaum., 2003). Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule.

Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (ERO) (Gutteridge., 1993).

### **II.3. Conséquences de la production des ERO sur l'organisme**

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces (Gutteridge., 1993).

Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons, l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (Favier., 2003).

En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les ERO sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Gutteridge., 1993). Parmi les, nous citons, les maladies d'Alzheimer (Smith *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 2004), de Parkinson (Boltn *et al.*, 2000), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (Jha *et al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti *et al.*, 2003) et le cancer (Ali *et al.*, 2008).

## **II.4. Les antioxydants**

Toutes les formes de vie maintiennent un environnement réducteur dans les cellules. L'entretien de cet environnement est réalisé par le système de défense antioxydant, qui protège l'homéostasie cellulaire contre les ERO nocifs produits normalement par le métabolisme cellulaire, ou dans les états physiopathologiques.

Les substances antioxydants sont des petites molécules qui peuvent neutraliser les radicaux libres en acceptant ou en donnant un électron. Typiquement, ceci signifie que la molécule antioxydant neutralise un ERO (ROS) en une molécule plus stable et moins réactive **(Toro et Rodrigo., 2009)**.

Les molécules antioxydants peuvent être produites de manière endogène ou apportées à l'organisme de manière exogène à travers le régime alimentaire.

### **II.4.1. Antioxydants endogènes**

Les principales enzymes antioxydants endogènes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GSH-Px). La SOD convertit l'anion super oxyde en eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), qui est un substrat pour la CAT et le GSH-Px. La catalase métabolise  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et oxygène et la GSH-Px réduit  $H_2O_2$  et les hydroperoxydes organiques en réagissant avec le glutathion (GSH).

Le glutathion réduit est présent à des concentrations élevées dans toutes les cellules des mammifères, particulièrement dans les hépatocytes, les érythrocytes et les cellules rénales. Ce tripeptide protège les groupes thiols des protéines contre l'oxydation non-enzymatique ou agit comme Co-substrat de GSH-Px. **(Toro et Rodrigo., 2009)**.

### **II.4.2. Antioxydants exogènes**

Les antioxydants exogènes, tels que les vitamines E et C, sont localisés sur la membrane cellulaire, dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ils réagissent avec les ROS et les neutralisent. L'intérieur lipidique hydrophobe des membranes exige un éventail différent d'antioxydants. La vitamine E liposoluble est l'antioxydant le plus important dans cet environnement et qui préserve l'intégrité membranaire **(Toro et Rodrigo., 2009)**.

Les antioxydants liposolubles sont importants, ils empêchent les acides gras polyinsaturés membranaire (AGPI) de subir la peroxydation lipidique.

Les antioxydants hydrosolubles comprenant la vitamine C qui jouent un rôle principal dans la neutralisation des ROS dans la phase hydrophile **(Toro et Rodrigo., 2009)**.

D'autres petites molécules antioxydants sont également naturellement présentes dans le plasma, tel que l'acide urique et la bilirubine. Récemment, on a constaté que les poissons, les huiles de poisson, et quelques légumes contiennent les acides gras furannes qui neutralisent les radicaux libres (**Toro et Rodrigo., 2009**).

#### **II.4.3. Antioxydants d'origine végétale**

Les herbes et les épices ont été identifiées comme sources de divers composés phytochimiques, dont certains possèdent une puissante activité antioxydant. Les antioxydants d'origine végétale existent sous diverses formes, avec les polyphénols et les caroténoïdes comme les plus grands groupes de composés. Ceux-ci ont différentes fonctions et sont produits par les plantes pour protéger leurs cellules contre des dommages oxydants (**Toro et Rodrigo., 2009**).

## *Chapitre II*

---

### *Les plantes médicinales*

## **II. Plantes médicinales**

### **II.1. Médecine traditionnelle**

#### **II.1.1. Définition**

La médecine traditionnelle est définie par l’OMS comme « la somme totale des connaissances, compétences et pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales. Dans certains pays, les appellations médecine parallèle, alternative et douce sont synonymes de médecine traditionnelle. » (OMS., 2014).

### **II.2. Les plantes médicinales**

#### **II.2.1. Définition**

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. (Farnsworth *et al.*, 1986).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj *et al.*, 2007).

#### **II.2.2. Utilisation traditionnelle des plantes médicinales**

Malgré le développement du médicament de synthèse, le médicament végétal sous ses différentes formes continues à occuper une place de choix ainsi, l’OMS estime que la médecine traditionnelle couvre les besoins en soins de santé primaire de 80% de la population mondiale. Ce phénomène n’est pas seulement limité aux pays en développement. Une analyse des prescriptions médicales menée aux Etats-Unis entre 1959 et 1980, a montré que 25% d’entre elles contenaient un principe issu du règne végétal, tandis que près de 60 % des prescriptions en Europe de l’Est proviennent directement ou indirectement de plantes (Hmamouchi *et al.*, 2012).

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l’organisme. On les utilise aussi en médecines classique qu’en phytothérapie ; elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (Iserin., 2001).

Les plantes aussi utilisées comme source de nutrition, des apéritifs, des stimulants énergétiques ainsi que pour l'arôme dans le thé (Maundu et al., 2001).

### II.2.3. Quelques exemples des plantes médicinales

#### a. *Olea europaea* : « feuille d'Olivier »

L'olivier est un arbre cultivé pour son fruit, l'olive, qui donne une huile recherchée « l'huile d'olive ». Cette dernière, mais aussi les olives de table, sont des éléments importants de la diète méditerranéenne et sont consommées en grande quantité dans le monde entier. (Aouidi., 2012).

L'extrait de feuille d'olivier (*Olea europaea*) est une version moderne d'un remède traditionnel employé pour prévenir la fièvre dans les pays méditerranéens. L'extrait d'huile d'olivier se trouve dans de nombreux magasins d'aliments naturels. La feuille d'olivier peut être séchée et infusée, et on la trouve également sous forme d'extrait en capsules. (Lyons et Nambiar., 2005).



Figure N°1 : *Olea europaea* « feuille d'Oliver » (Bouabdallah, 2014)

#### b. *Ajuga iva L.*

Le genre *Ajuga* appartient à la famille des lamiacées avec plus de 300 espèces différentes. Cette plante est largement distribuée dans les régions arides d'Europe, d'Asie, d'Afrique et d'Australie. En médecine traditionnelle, *Ajuga iva* est utilisé pour traiter le diabète et l'hypertension (Ziyyat et al., 1997), ainsi que les troubles gastro-intestinales et l'ulcère de l'estomac (Bellakhdar et al., 1991).



*Ajuga iva* L (L'ivette) est efficace contre la fièvre, la diarrhée, les gaz, les maux de tête et les maux de dents. En usage externe, elle est souvent employée en applications locales contre les rhumatismes, comme antiseptique et cicatrisante sur les plaies (**Baba Aissa et al., 1999**).

La richesse de l'ivette lui donne plusieurs propriétés prouvées scientifiquement. C'est un agent antioxydant (**Taleb Senoucia et al., 2009**), antidiabétique et hypolipidémique (**El-Hilaly et al., 2006**), antiarthritique (**Arrar et al., 2013**). L'étude de toxicité de la plante a été effectuée par **El-Hilaly et al., (2004)** et confirmé par **Diafat et al., (2016)** que la plante n'est pas toxique.



Figure N° 2 : *Ajuga iva*

### c. *Artemisia herba alba*

*Artemisia* est l'un des plus importants genres de la famille des Astéracées, il comporte plusieurs centaines d'espèces (de 200 à 400 espèces selon les auteurs). Il est composé d'un grand nombre d'herbacées de petite taille dont quelques 280 espèces se rencontrent dans l'hémisphère nord. Elles sont très répandues dans les zones arides, y compris notamment l'ouest des Etats-Unis et les steppes asiatiques. On en trouve également en Afrique du sud et en Amérique du sud (**Quezel et Santa., 1963**).

L'*Artemisia herba alba* est très utilisé en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (**Ghrabi et Sand., 2008**).

Plusieurs études scientifiques ont également prouvé l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique (**Astekin et al., 2006**), leishmanicide (**Hatimi et al., 2001**), antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, anti-malarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (**Yin et al., 2008**).



Figure N° 3 : *Artemisia herba alba*

### II.3. Principaux métabolites secondaires

Les métabolismes secondaires sont les polyphénols, flavonoïdes, les alcaloïdes, les tanins.

#### II.3. 1. Polyphénols

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina., 2002**). Ils appartiennent à leur métabolisme secondaire et participent à leur défense contre les agressions environnementales. Ce sont des phytomicronutriments et généralement des pigments responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (**Edeas., 2007**).

##### ✚ Propriétés physicochimiques des composés phénoliques

Les polyphénols sont solubles dans les solvants polaires tels que le méthanol, l'éthanol et l'eau. Cependant cette solubilité varie d'une classe de composés à une autre, selon leur nature chimique, la polarité des solvants utilisés, les substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyles, ainsi que leur degré de polymérisation et leur interaction avec d'autres composés, qui peuvent mener à la formation des complexes insolubles (**Macheix et al., 2005 ; Naczki et Shahidi., 2006**).

##### ✚ Propriétés biologiques des composés phénoliques dans la plante

Les composés phénoliques sont synthétisés par les plantes, pendant leur développement normal et en réponse à certaines conditions de stress, telles que les radiations UV et l'infection par des phytopathogènes (**Dembitsky., 2005**).

### II.3. 2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Les flavonoïdes sont rencontrés dans les fruits (notamment du genre *Citrus* où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais) et les légumes. Des boissons telles que le thé et le café contiennent également des quantités importantes.

Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant des flavonoïdes ont été utilisés en médecine traditionnelle.

Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydants, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives (**Ghedira., 2005**).

### II.3. 3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (**Delille., 2007**). Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (**Judd et al., 2002**).

Les propriétés médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine...). Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (**Beddou., 2015**).

### II.3. 4. Tanins

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (**Bruneton., 1999**). Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau. En outre, ils ont certaines propriétés spéciales telles que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et des autres protéines.

Au plan thérapeutique, les tanins ont des propriétés astringentes prononcées qui hâtent la guérison des blessures et des muqueuses enflammées. Ils sont utilisés, en usage externe, pour traiter les ulcères variqueux, les hémorroïdes, les engelures et les brûlures, et comme bains de bouche pour le traitement de l'inflammation et des maladies périodontales. En usage interne ils traitent la diarrhée et l'hypersécrétion des muqueuses intestinales (**Sereme et al., 2010**).

## *Chapitre III*

---

*Marrubium vulgare*

### III. *Marrubium vulgare*

#### III.1. Généralités sur le Genre *Marrubium* :

Le genre *Marrubium* comprend environ 75 espèces répandues dans une grande partie du globe : l'Europe, la Méditerranée et l'Asie ; 50 espèces poussent sur le pourtour de la Méditerranée (Greuter et al., 1986). L'aspect général de la plante est tomenteux, laineux. Les feuilles sont crénelées et dentelées. Les fleurs sont blanches, petites, disposées en verticilles axillaires et munies de bractéoles (Coste., 1998).

En Algérie, il existe 7 espèces du genre *Marrubium* : *Marrubium vulgare*, *M. spinum*, *M. peregrinum*, *M. alysson*, *M. alyssoides*, *M. willkommii* et *M. deserti* (Quezel et Santana., 1963).

#### III.2. L'espèce : *Marrubium vulgare*

##### III.2.1. Description botanique de *Marrubium vulgare*

Le marrube est une plante herbacée, à tiges dressées, portant souvent de nombreuses pousses courtes et stériles, de 40 à 60 cm de long. Les feuilles sont ovales, arrondies, souvent un peu cordées à la base, feutrées à la face intérieure. Il possède de petites fleurs blanches de 12 à 15 mm de long, une corolle à deux lèvres dont l'inférieure est trilobée et la supérieure dilobée ainsi qu'un calice à 10 dents courtes et crochues (Quezel et Santa., 1962).



Figure N°4 : Description botanique de *Marrubium vulgare* (Bardet et al., 2008)

### III.2.2. Systématique de la plante

La position systématique de *Marrubium vulgare* est :

- Règne : *Plantae*
- Sous-règne : *Tracheobionta*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Sous-classe : *Asteridae*
- Ordre : *Lamiales*
- Famille : *Lamiaceae*
- Genre : *Marrubium*
- Espèce : *Marrubium vulgare*
- Nom binomial : *Marrubium vulgare*

🚩 Nom vernaculaire algérien : Meriweth

### III.2.3. Distribution et culture

#### a. Distribution

Elle pousse dans toute l'Afrique du nord, presque toute l'Europe, centre et sud-ouest de l'Asie. Au Canaries naturalisé dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud (**De Souza., 1998**).

#### b. Culture

Est une plante qui se cultive facilement. Plus particulièrement sur un sol pauvre et sec. Elle nécessite une forte exposition au soleil. La propagation peut se faire par semis au printemps, bouturage ou en divisant les racines (c'est la méthode qui est la plus utilisée). Les feuilles et les sommités fleuries sont récoltées entre juin et septembre (**Guiet., 2011**).

### III.2.4. Composition chimique

Sur le plan chimique, *Marrubium vulgare* L. est riche en diterpènes (**El Bardai et al., 2003**), en phenyléthanoïdes glucosidiques (**Sahpas et al., 2002**), en tanins, en saponins (**Kurbatova et al., 2003**) et en flavonoïdes (**Nawwar-Mahmoud et al., 1989**); on lui reconnaît des propriétés antioxydantes (**Matkowski et Piotrowska., 2006; Pukalskas et al., 2012**), hypoglycémiantes (**Vergara Galicia et al., 2012**) et antidiabétiques (**Boudjelal et al., 2003**), analgésiques (**Dejesus et Cechinel., 2000 ; Meyre Silva et al., 2005**) et anti-inflammatoires (**Sahpas et al., 2002**).

### III.2.5. Utilisation de *Marrubium vulgare*

- ✓ *Marrubium vulgare* L. est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie (Raynaud., 2007).
- ✓ Elle est également employée comme antinociceptif (Dejesus., 2000), antihypertenseur (El bardai et al., 2004), antispasmodique (Rigano et al., 2009), analgésique (Meyre Silva et al., 2005), insecticide (Pavela et al., 2004), antiinflammatoire (Sahpaz et al., 2002), antimicrobien (Warda et al., 2009), antioxydant (Weel et al., 1999), antifongique (Edziri et al., 2007), antileucémique (Alkhatib et al., 2010) et dans de nombreuses autres activités biologiques.
- ✓ En Algérie, le marrube blanc est utilisé en médecine traditionnelle contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme, le rhume et les douleurs respiratoires (Belhattab et Larous., 2006).



Figure N°5: *Marrubium vulgare* (Bernard., 2015)

### III.2.6. Activités thérapeutiques

#### ➤ Effets antispasmodiques / effets anti-inflammatoires / effets analgésiques

Schlemper et al., (1996) ont évalué les effets d'un extrait hydroalcoolique des racines et des parties aériennes de *Marrubium vulgare* dans plusieurs préparations musculaires lisses in vitro (Guinée iléon de porc, duodénum de rat, de l'utérus de souris, l'estomac de rat). Les résultats ont montré que l'extrait exerce une activité antispasmodique importante qui inhibe l'action de certains neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, la bradykinine, la prostaglandine E2, l'histamine et l'ocytocine. Les résultats suggèrent un profil d'inhibition non compétitive avec une inhibition dépendante de la concentration et une diminution de la réponse maximale selon le cas de l'interférence intracellulaire dans tous les cas par les agonistes.



➤ **Activités antimicrobiennes et anti-infectieuse**

**Kanyonga et al., (2011)** ont étudié l'activité antibactérienne *in vitro* d'un extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* par la méthode de diffusion sur disque. L'étude a révélé que l'extrait a montré un effet dépendant de la dose contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* et modérément efficace contre *Proteus vulgaris* et *E. coli* alors inefficace dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*.

➤ **Effets anti hyperglycémiant**

**Novaes et al., (2000)** ont étudié l'effet hypoglycémiant de *Marrubium vulgare* sur l'alloxane induit chez les rats diabétiques. Les résultats ont montré que *Marrubium vulgare* à causer des effets modérés, avec des taux de 30,3% d'inhibition.

➤ **Effets anticancéreux**

**Yamaguchi et al., (2006)** ont étudié les effets de l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* sur la lutte contre la tumorigénicité des cellules cancéreuses colorectales humaines, il a provoqué l'apoptose et de la suppression de la croissance cellulaire dans les cellules humaines du cancer colorectal et plus gène régulé pro-apoptotique non stéroïdien activé par anti-inflammatoire (NAG-1) à travers la transactivation du promoteur NAG-1.

*Etude*

---

*Expérimentale*



# *Chapitre IV*

---

## *Matériel et méthodes*



## IV. Matériel et méthodes

### IV.I. Matériel

#### IV.I.1. Produits et réactifs

- ✓ Hexane (95 %), méthanol (99.7 %), Quercétine, folin-Ciocalteu, DPPH, ABTS<sup>+</sup>, Trolox, DMF, Hcl (**Sigma Aldrich**).
- ✓ Chloroforme (**Carlo Erba**)
- ✓ Acétate d'éthyle (99.9 %) (**Prolabo Chimicals**).
- ✓ Acide gallique, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ALCl<sub>3</sub> (Biochem), Acide ascorbique (vit C), K<sub>3</sub>Fe(CN<sub>6</sub>), Nacl, TCA, Persulfate de potassium, Fecl<sub>3</sub>, ferrozine, Fecl<sub>2</sub> (**Biochem**).
- ✓ Muller Hinton (**HiMedia**).
- ✓ PDA.

#### IV.I.2. Appareillages

- ✓ Centrifugeuse (**Sigma Laborzentrifugen, Germany**).
- ✓ Spectrophotomètre (UVmini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan).
- ✓ Rota vapeur (**BUCHI, switzerland, 2011**).
- ✓ Autoclave (**SANOCLAV LaM-3-20-ECZ-J**).

#### IV.I.3. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles de *Marrubium vulgare* L. Celles-ci sont récoltées au mois d'octobre 2015, dans la région d'El Hammadia, Wilaya de Bordj Bou Arreridj, Algérie. Le séchage des feuilles est effectué à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

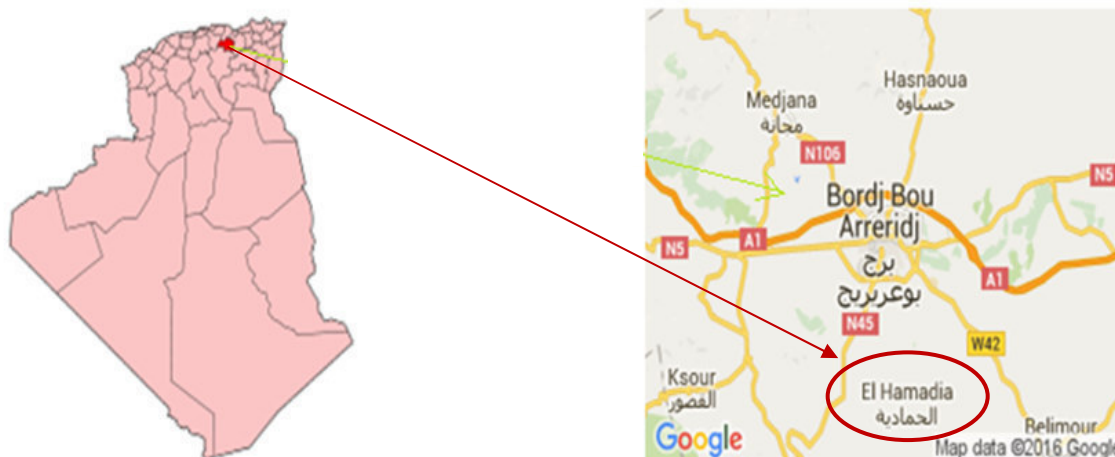


Figure N° 6 : Le site de la récolte

Tableau N° 1 : Données géographiques de site de récolte.

| Espèce                   | Site de récolte | Altitude | Latitude         | Longitude      | Date de récolte |
|--------------------------|-----------------|----------|------------------|----------------|-----------------|
| <i>Marrubium vulgare</i> | El Hammadia     | 841 m    | 35° 58' 47" Nord | 4° 44' 51" Est | Octobre 2015    |

## IV.II. Méthodes

### IV.II.1. Extraction

#### IV.II.1.1. Extraction par les solvants

Selon **Stanković, (2011)**, la poudre sèche broyée est d'abord mise en contact avec cinq solvants différents (Le méthanol, l'hexane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, et l'eau distillée) à raison de 200 ml de chaque solvant pour 50 g de poudre dans un Erlenmeyer en conservant au maximum les métabolites contre les effets de l'oxydation par les photons.

Une agitation manuelle simple a été effectuée au début pour assurer que toute la surface de la poudre est imprégnée par les solvants, puis une agitation mécanique a été effectuée pour accélérer le processus d'extraction.

Après 72 heures à température ambiante, le mélange est filtré sur un papier filtre, et le résidu de l'extraction précédente (retentât) a été repris par 200 ml de chaque solvant et dans les mêmes conditions, le résidu est à nouveau extrait par 200 ml de chaque solvant. Les extraits organiques (extrait chloroformique, extrait méthanolique, l'extrait hexanique, l'extrait à l'acétate d'éthyle, et l'extrait aqueux) sont évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif à températures 45°C.

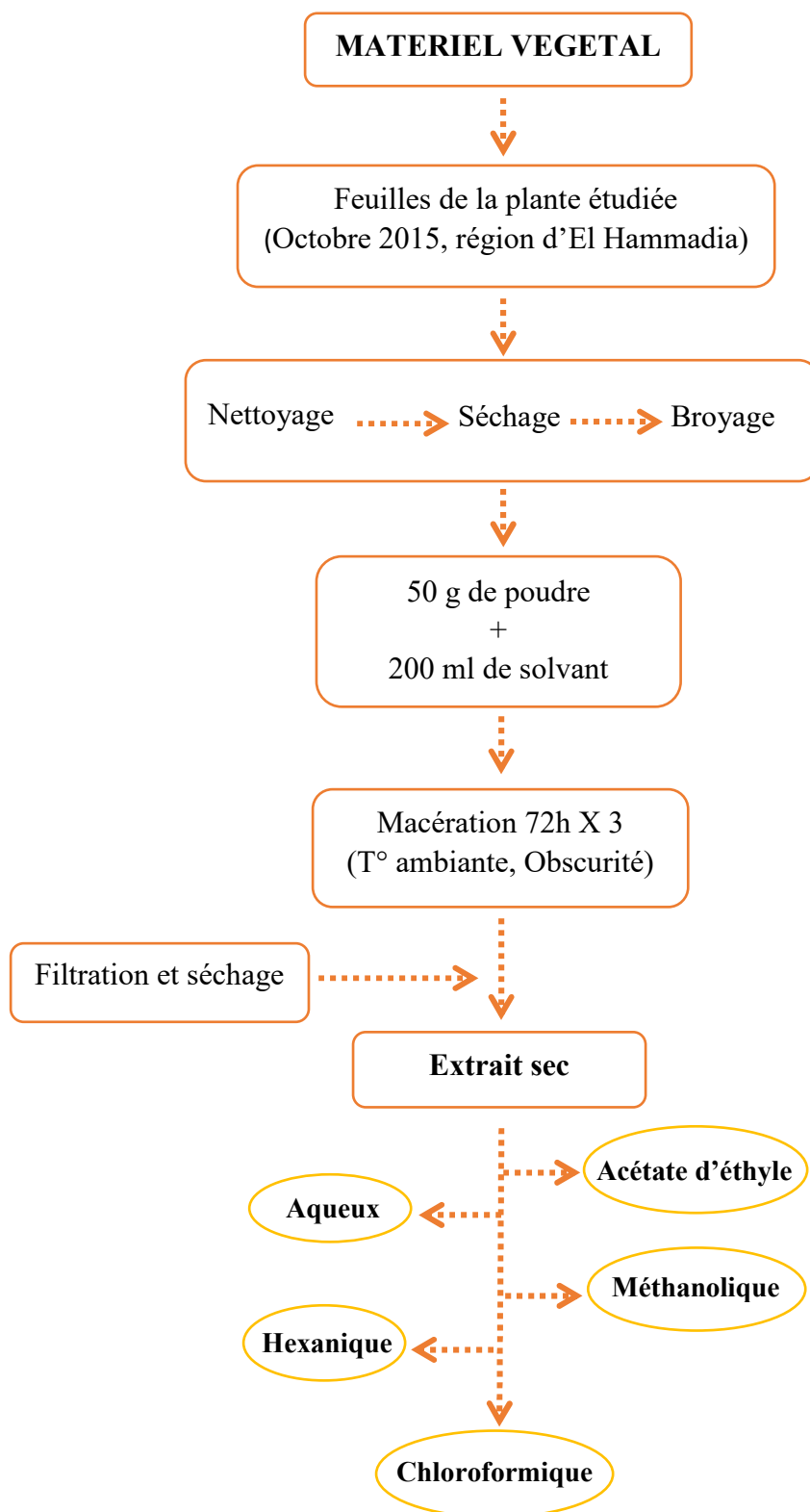


Figure N° 7 : Préparation des extraits bruts de *Marrubium vulgare*

#### IV.II.1.2. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

#### IV.II.2. Analyses quantitatives des extraits

##### IV.II.2.1. Dosage des polyphénols

- **Principe**

La teneur en composés phénoliques des différents extraits de notre plante a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (Singleton et Rossi., 1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique de réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

##### IV.II.2.2. Dosage des flavonoïdes

- **Le principe**

La technique repose sur la formation d'une liaison covalente entre l'AlCl<sub>3</sub> et les groupements OH des flavonoïdes produisent un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 nm (Huang et al., 2004).

- **Mode opératoire**

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux, méthanolique, chlorformique, hexanique et d'acétate d'éthyle de *Marrubium vulgare*. 1 ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de

l'échantillon (extraits ou standard) contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (5-50 µg/ml) et exprimée en (µg) d'équivalents de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

### IV.I.3. Activités biologiques de la plante

#### IV.II.3.1 Activité anti oxydante

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible. Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif.

##### IV.II.3.1.1 Inhibition du radical DPPH

- **Principe**

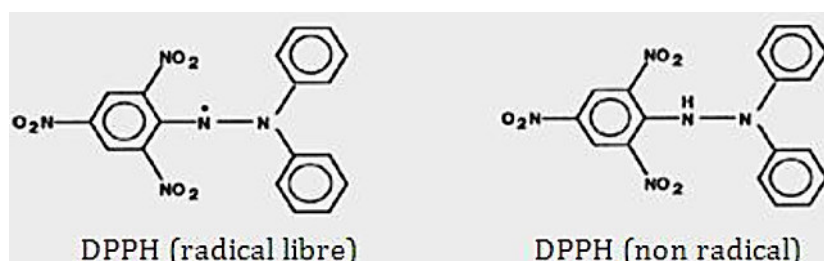
L'inhibition du radical libre 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est effectuée selon la méthode développée par **Blois en 1958**. Cette méthode permet de mesurer le pouvoir piégeur et de calculer la concentration inhibitrice médiane IC<sub>50</sub> des substances antioxydantes.

Le DPPH est un radical libre de couleur violette (Forme oxydée), qui devient jaune (Forme Réduite) sous l'effet des substances antioxydantes qui lui cède un proton

On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où (AH)<sub>n</sub> représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (**Brand Williams et al., 1995**).



**Figure N° 8 : Forme libre et réduite du DPPH (Brand-Williams et al., 1995).**



- **Mode opératoire**

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1.5 ml de la solution de l'extrait à tester de chaque concentration déjà préparée, on ajoute 0.5ml de solution au DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité, à la température ambiante pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance est faite par un spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc préparé pour chaque concentration qui est constitué de 1.5ml d'extrait et 0.5ml du méthanol. Parallèlement, le contrôle est préparé, il est composé de 1.5 ml de méthanol et 0.5ml de DPPH. Le test est réalisé en triplicata pour chaque concentration.

Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

$A_c$  : absorbance du contrôle.

$A_t$  : Absorbance du test.

#### **IV.II.3.1.2 Réduction des ions métalliques « Pouvoir réducteur »**

- **Principe**

Cette méthode est basée sur la réduction du Fer (III) ( $Fe^{3+}$ ) présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en Fer (II) ( $Fe^{2+}$ ). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des composés testés

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu en 1986**, 1.25ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 1.25ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 1.25ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 1.25ml d'acide trichloroacétique TCA à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (1.25ml) de surnageant est combinée avec 1.25ml d'eau distillée et 0.5ml d'une solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique et l'acide gallique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

#### IV.II.3.1.3 Réduction du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>

- **Principe**

En réagissant avec le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), l'ABTS (acide 2,2'-azinobis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical ABTS<sup>•+</sup>, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants. La méthode est généralement standardisée par rapport au TROLOX. (Re et al., 1999)



- **Mode opératoire**

Un stock d'une solution mère d'ABTS<sup>•+</sup> stable est préparé en mélangeant 7 mM d'une solution aqueuse d'ABTS avec 2.45 mM d'une solution de persulfate de potassium K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (concentration finale 3.5 mM), Le mélange est laissé à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16h pour former le radical cation ABTS<sup>•+</sup> avant l'utilisation, pour arrêter la réaction le mélange a été refroidit au réfrigérateur. Cette solution est par la suite diluée avec l'eau distillée afin d'avoir une absorbance de 0.700 (± 0.02) à 734 nm.

1,9 ml d'ABTS<sup>•+</sup> fraîchement préparée sont ajoutés à 0,1 ml d'extrait et l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 10 min pour chaque série d'analyses. Le blanc du test comprend (100µl du méthanol et 1.9 ml d'ABTS<sup>•+</sup>). Le Trolox est utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(Abs_c - Abs_t) / (Abs_c)] \times 100$$

**Abs<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle

**Abs<sub>t</sub>** : Absorbance du test.

#### IV.II.3.2 Chélation du fer

- **Principe**

La capacité chélatrice des extraits des plantes est déterminée selon la méthode de **Dinis et al., (1994)**. La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après le traitement des échantillons avec les ions Fe<sup>2+</sup>.

- **Mode opératoire**

Une prise de 100 µl d'extrait à différentes concentrations est ajoutée à 200 µl de Chlorure de fer (FeCl<sub>2</sub>, 0,2 mM), suivis de 500 µl d'eau distillée. Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 200 µl de ferrozine (5mM) sont ajoutés. Le mélange est agité et laissé au repos pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation du complexe Ferrozine-Fe<sup>2+</sup>. Un contrôle négatif (sans extrait) est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance du complexe Fe<sup>2+</sup>-ferrozine est mesurée à 562 nm.

L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

A<sub>c</sub> : absorbance du standard.

A<sub>t</sub> : absorbance de l'échantillon

#### IV.II.3.3 Activité antibactérienne

- **Les souches microbiennes testées**

Le matériel microbiologique est constitué de 6 souches bactériennes. Ce sont des bactéries à Gram positif et à Gram négatif pathogènes pour l'homme, Elles proviennent du laboratoire de microbiologie appliquée de l'université Ferhat Abbas -Sétif-(Algérie). Les souches bactériennes sont : *Escherichia coli* G<sup>-</sup>, *Bacillus cereus* G<sup>+</sup>, *Salmonella typhimurium* G<sup>-</sup>, *Staphylococcus aureus* G<sup>+</sup>, *Proteus mirabilis* G<sup>-</sup> et *Micrococcus luteus* G<sup>+</sup>.

- **Milieux de culture**

Le milieu de culture utilisé pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait sec de *Marrubium vulgare* : Mueller-Hinton.

- **Antibiotique**

Afin de comparer les effets antibactériens des extraits secs de *Marrubium vulgare* avec ceux des antibiotiques, on a utilisé l'Amoxicilline comme standard. C'est un antibiotique de la famille des β lactamine qui est utilisé pour la comparaison entre son effet antibactérien et celui des extraits secs de *Marrubium vulgare*.

- **Mode opératoire**

L'activité antibactérienne in vitro des différents extraits de *Marrubium vulgare* a été étudiée par la méthode de diffusion sur puits contre : *Escherichia coli* G<sup>-</sup>, *Bacillus cereus* G<sup>+</sup>, *Salmonella typhimurium* G<sup>-</sup>, *Staphylococcus aureus* G<sup>+</sup>, *proteus mirabilis* G<sup>-</sup>, *Micrococcus luteus*G<sup>+</sup>. En utilisant la gélose de Mueller-Hinton.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures et le diamètre de la zone d'inhibition est mesurée en mm.

Pour le témoin on a utilisé l'antibiotique Amoxicilline et le DMF. Les solutions des extraits sont préparées dans le DMF et les dilutions sont préparées de façon à obtenir des concentrations ½ à partir de la solution mère.

### IV.II.3.4 activité antifongique

- **Les souches fongiques testées**

L'activité antifongique des extraits de *Marrubium vulgare* a été déterminée contre les souches fongiques *Fusarium oxysporum* f.sp. *Albedinis*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, et une levure *Candida albicans*.

- **Milieux de culture**

Le milieu de culture utilisé pour l'évaluation de l'activité antifongique des extraits secs de *Marrubium vulgare* est la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA).

- **Mode opératoire**

- **Technique des puits**

Selon le protocole décrit par **Yollande., (2009)** l'inoculum a étéensemencé à l'aide d'un écouvillon stérile sur toute la surface du milieu, préalablement trempé dans la suspension microbienne, et déchargé au maximum, sur la totalité de la surface gélosée en stries serrés. L'opération a été répétée deux à trois fois, en tournant la boîte à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie du milieu.

Après 15 min, des puits ont été découpés à l'aide de pipettes Pasteur. Et une goutte d'extrait a été ajoutée dans chaque puit (une concentration différente pour chaque puit).

Ensuite, 25 µl de l'extrait sont distribués dans chaque puits. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 28°C pendant 72 heures.

Des essais témoins sont effectués in vitro pour le DMF pur vis-à-vis de chaque type de souche microbienne.

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm.

# *Chapitre V*

---

## *Résultats et discussion*



## V. Résultats et discussion

### V.1. Résultats

#### V.1.1 Rendement d'extraction

Les rendements ont été calculés en utilisant la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = \frac{\text{PF}}{\text{MS}} \times 100$$

**Rdt** : rendement en %

**PF** : produit final

**MS** : Matière sèche.

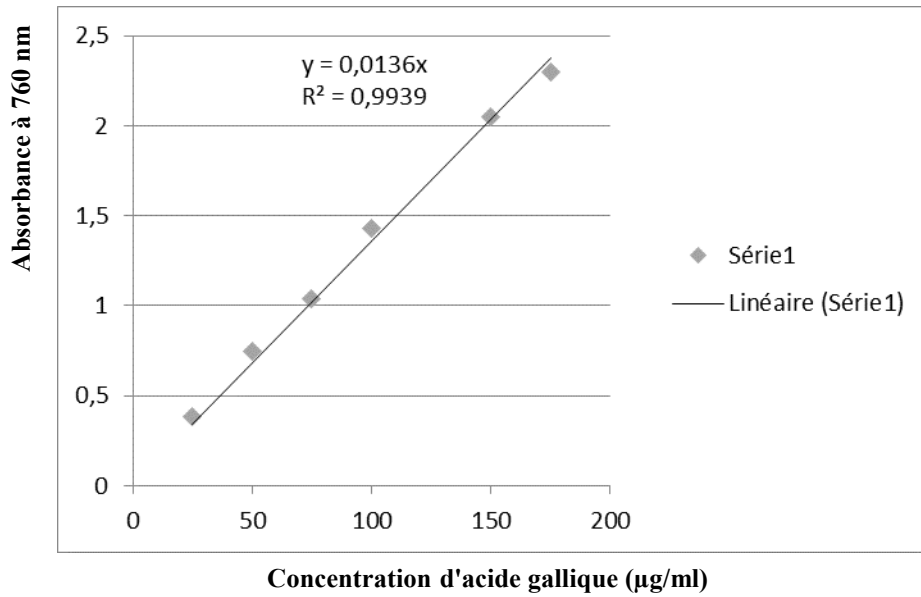
Les rendements obtenus pour les différents extraits sont représentés dans le tableau N°2.

**Tableau N°2** : Rendement d'extraction.

| Extraits              | Aqueux | Méthanol | Hexane | Chloroforme | Acétate d'éthyle |
|-----------------------|--------|----------|--------|-------------|------------------|
| <b>Rendements (%)</b> | 22,93  | 18,81    | 2,52   | 4,06        | 6,47             |

#### V.1.2 Dosage des polyphénols totaux

La concentration des polyphénols totaux est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard (Figure 13), la quantité de polyphénols totaux a été exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ ). En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage présente une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisée dans la gamme d'étalonnage,  $R^2 = 0,9939$ .



**Figure N° 9 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.**

La teneur en polyphénols de différents extraits de *Marrubium vulgare* sont présentés dans le tableau N°3

**Tableau N°3 : Teneur en polyphénols totaux dans les extraits de *Marrubium vulgare*.**

| Extraits                                 | EAq   | EMet   | ECh   | EHx    | EAct   |
|--|-------|--------|-------|--------|--------|
| <b>Polyphénols (µg EAG/mg d'extrait)</b> | 66,15 | 136,35 | 66,35 | 161,55 | 130,85 |

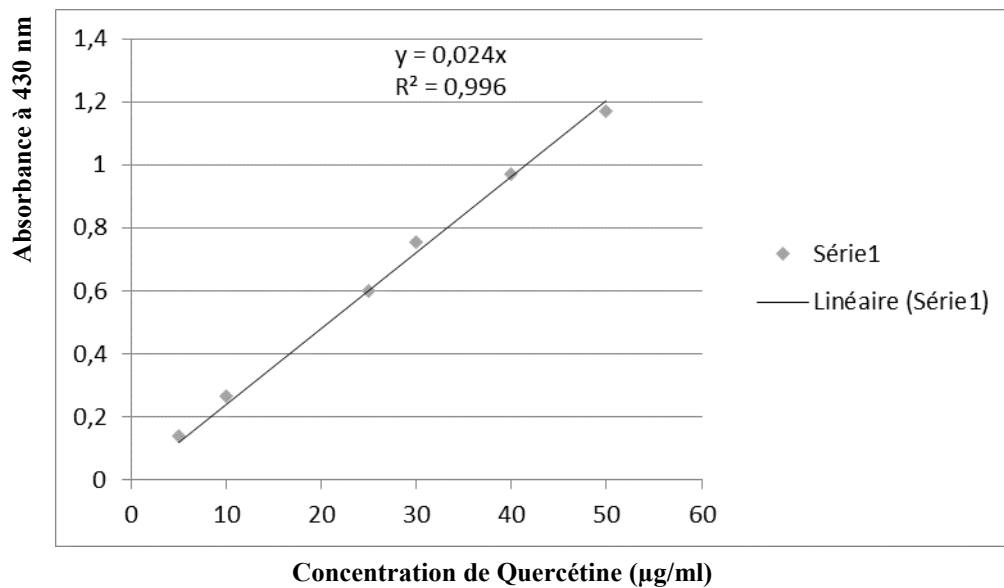
### V.1.3. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) en utilisant comme standard la quercétine figure 9. Les résultats sont représentés dans le tableau N°4

**Tableau N°4 : Teneur en flavonoïdes dans les extraits de *Marrubium vulgare*.**

| Extraits                                | EAq | EMet | ECh  | EHx  | EAct  |
|---|-----|------|------|------|-------|
| <b>Flavonoïdes (µg EQ/mg d'extrait)</b> | 0,1 | 7,35 | 8,75 | 9,32 | 14,86 |

Le dosage des flavonoïdes a révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle (EAct) est le plus riche en flavonoïdes 14,86 µg EQ/mg d'extrait, suivi par l'extrait hexanique (EHx) 9,32 µg EQ/mg d'extrait, l'extrait chloroformique (ECh) renferme 8,75 µg EQ/mg d'extrait, l'extrait méthanolique (EMet) contient 7,35 µg EQ/mg d'extrait, alors que l'extrait aqueux (EAq) ne contient que 0,1 µg EQ/mg d'extrait.



**Figure N° 10 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.**

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en µg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

#### V.1.4 Activités biologiques

##### V.1.4.1 Activité anti oxydante

###### a. Inhibition du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de *Marrubium vulgare vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* ont une activité anti-radicalaire concentration dépendante (Figure 11)

L'activité antioxydante des différents extraits ainsi que des standards utilisés est exprimée en  $IC_{50}$  (Concentration inhibitrice 50). C'est la concentration qui neutralise (réduit) 50% du radical libre (DPPH), plus la  $IC_{50}$  est faible est plus l'antioxydant est puissant. La figure 15 montre les différentes  $IC_{50}$  Obtenues pour nos extraits et les standards.

D'après les résultats on remarque que les différents extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* piègent les radicaux DPPH avec des  $IC_{50}$  de 23.222, 110.549, 140.811, 208,14 et 269,046 µg/ml pour EMet, EAct, EAq, ECh et EHx, respectivement (Figure 12). Une activité qui reste très inférieure à celles des standards : l'acide gallique (0.436µg/ml) et l'acide ascorbique (2.203µg/ml).



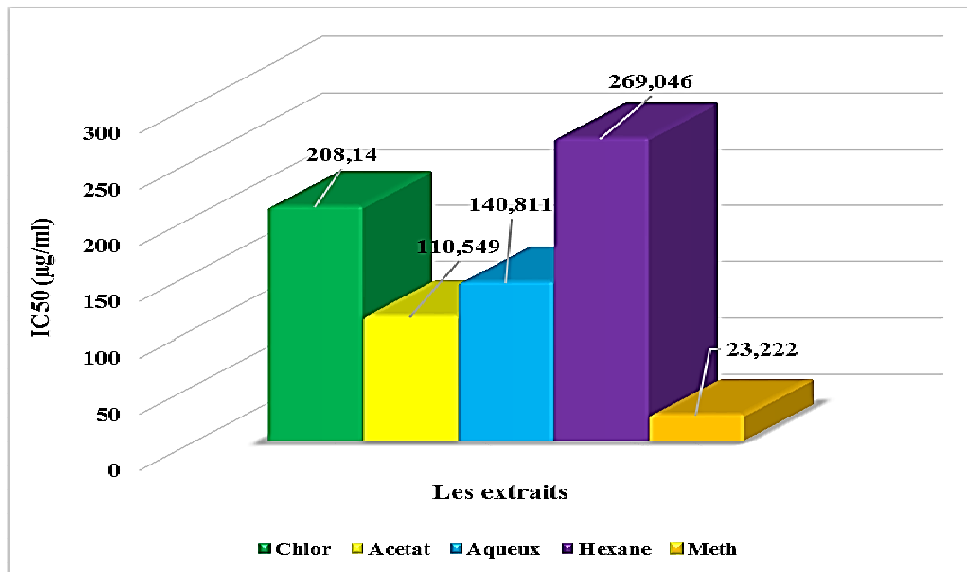


Figure N° 11 : IC<sub>50</sub> des différents extraits de *Marrubium vulgare*

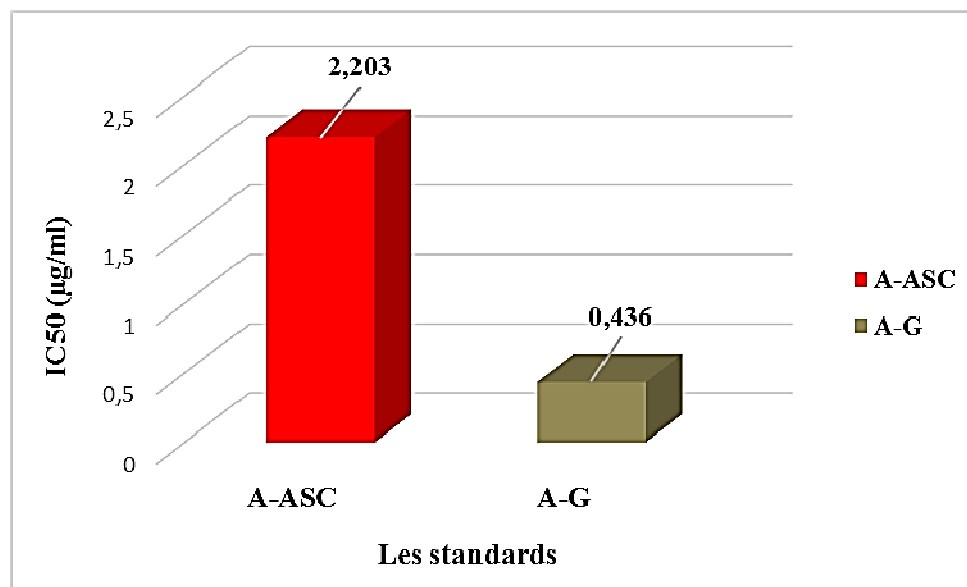
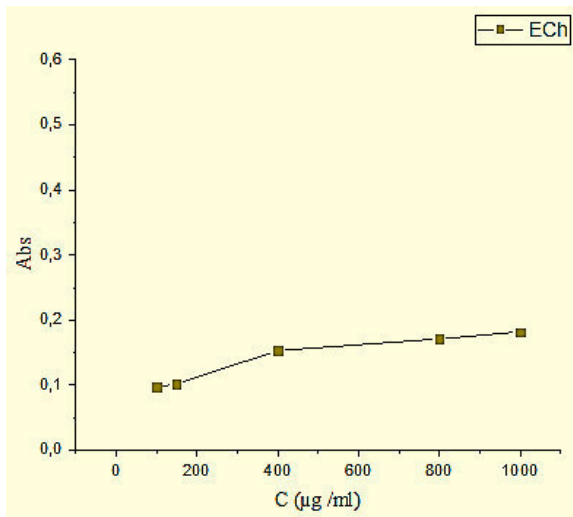


Figure N° 12 : Les standards de la IC<sub>50</sub>

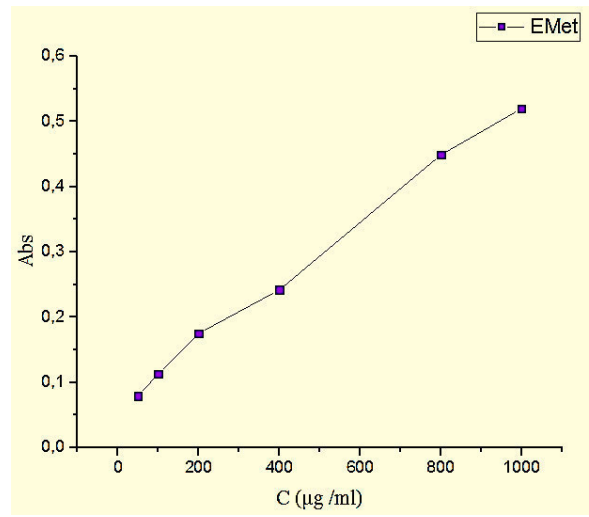
**b. Pouvoir réducteur**

C'est un test rapide, reproductible et facile à exécuter pour évaluer l'activité antioxydante. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ . La puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants.

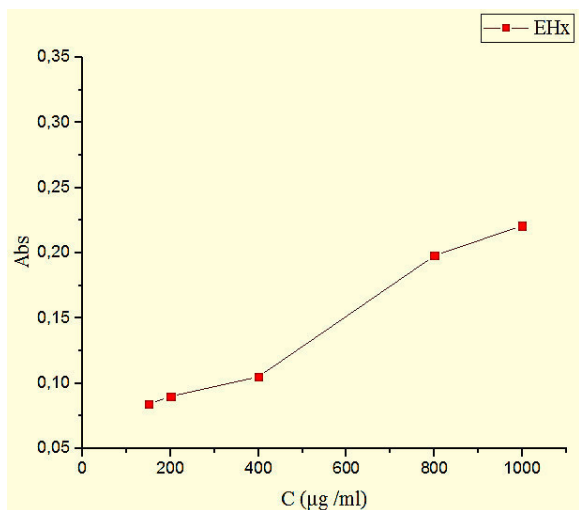
Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits de la partie aérienne pour la plante étudiée. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans les figures suivantes nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.



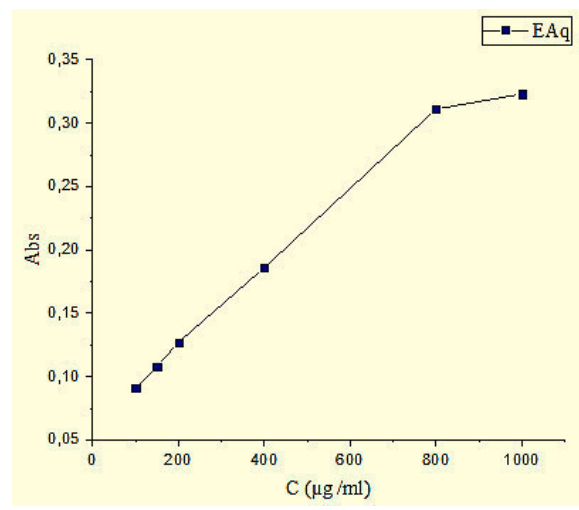
**Figure N°13 : Pouvoir réducteur d'ECh**



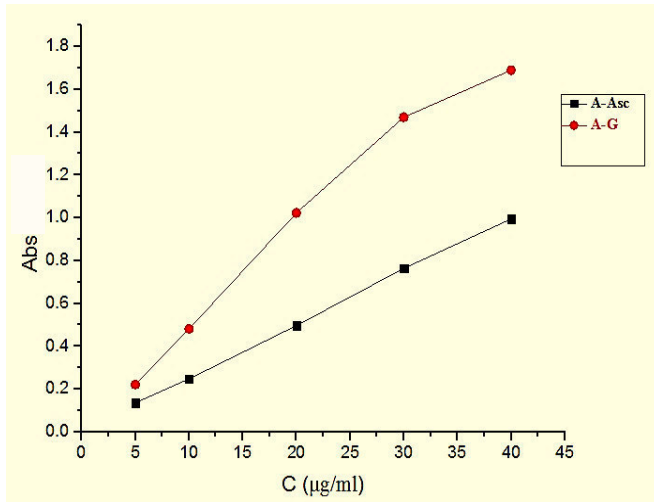
**Figure N°14 : Pouvoir réducteur d'EMet**



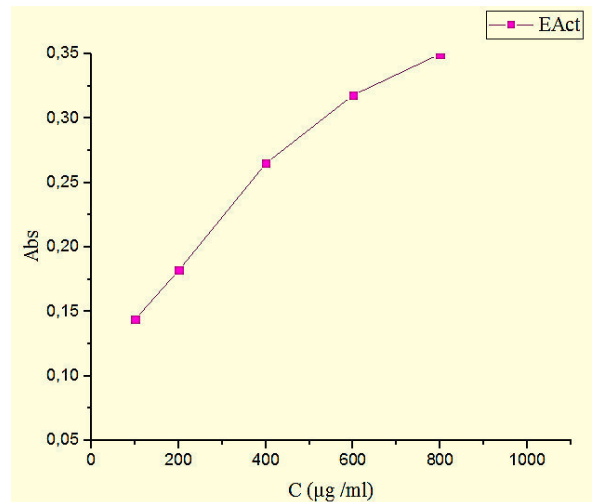
**Figure N°15 : Pouvoir réducteur d'EHx**



**Figure N°16 : Pouvoir réducteur d'EAq**



**Figure N°18 :** Pouvoir réducteur des standards utilisés ; l'acide gallique et l'acide ascorbique



**Figure N°17 :** Pouvoir réducteur d'EAct

### c. Réduction du radical-cation ABTS<sup>+</sup>

L'inhibition du radical cationique ABTS<sup>+</sup> a été évaluée pour tester l'activité antioxydante de la plante. Les extraits de la partie aérienne de la plante étudiée ont inhibé l'ABTS, comme le montre la Figure 18 et les calculs ont été faite à l'aide de l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition du radical cation ABTS}^+ = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : Absorbance du control

**A<sub>t</sub>** : Absorbance du test

Le Trolox a été utilisé comme standard et les résultats ont été représentés dans la figure 19

Les résultats montrent que l'extrait le plus actif est l'extrait méthanolique arrive à un pourcentage d'inhibition de 41.03 % à 500 µg/ml, leur activité est faible par rapport à celle du Trolox 92,857 % à la même concentration, ensuite viennent par ordre décroissant d'activité l'extrait chloroformique, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait d'hexane et enfin l'extrait aqueux qui a un pourcentage d'inhibition de 10.06 %.

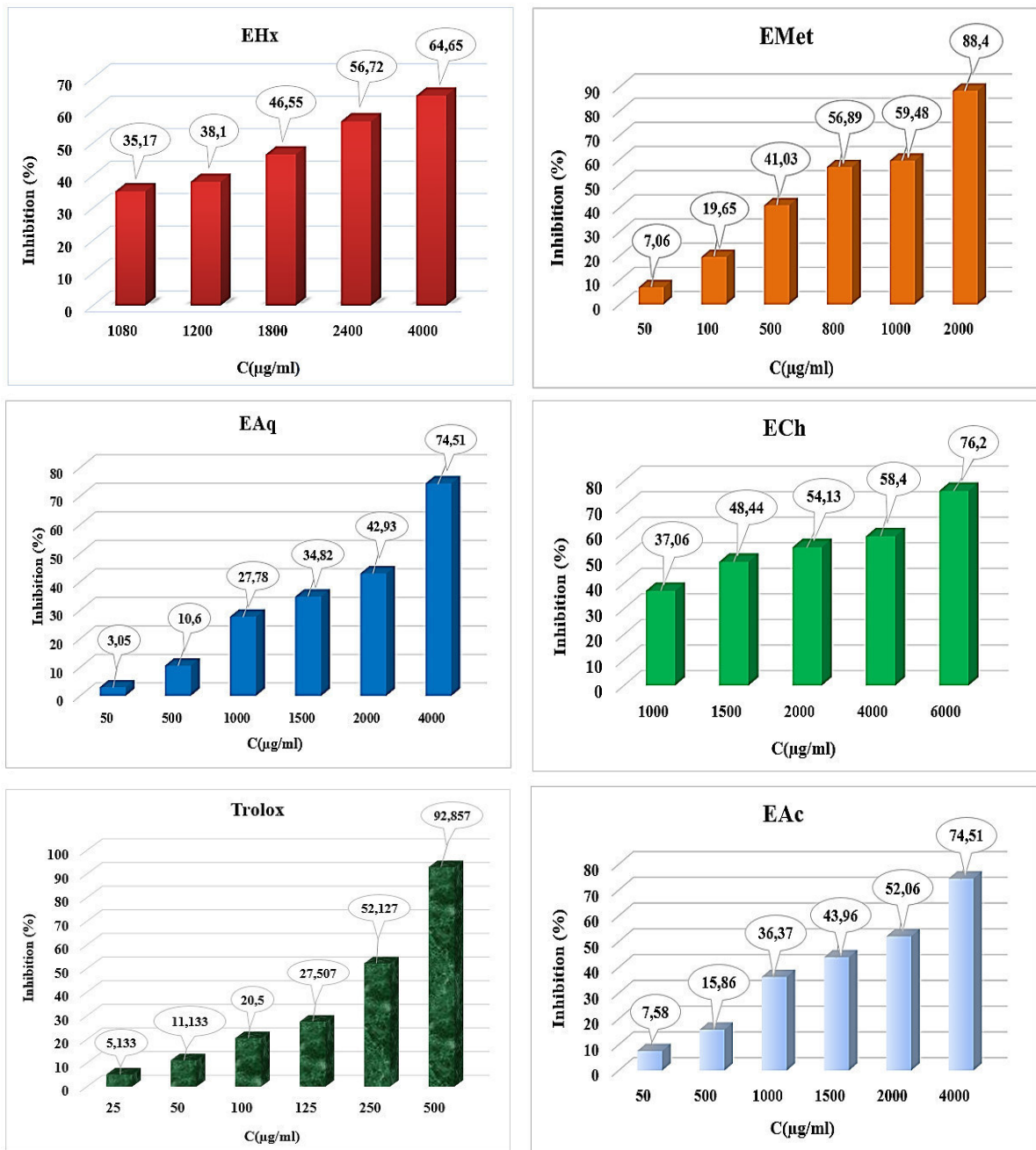


Figure N°19 : L'inhibition du radical cationique ABTS<sup>+</sup> par différents extraits de *Marrubium vulgare* et du Trolox

### V.1.4.2 Chélation du fer

La capacité chélatrice de l'extrait est estimée selon la méthode de **Dinis et al., (1994)** en comparaison avec l'EDTA. La complexation de la ferrozine avec le fer résiduel conduit à la formation d'un chromophore rouge (Fe<sup>+2</sup>-ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm.

L'activité chélatrice est exprimées en termes de mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait.

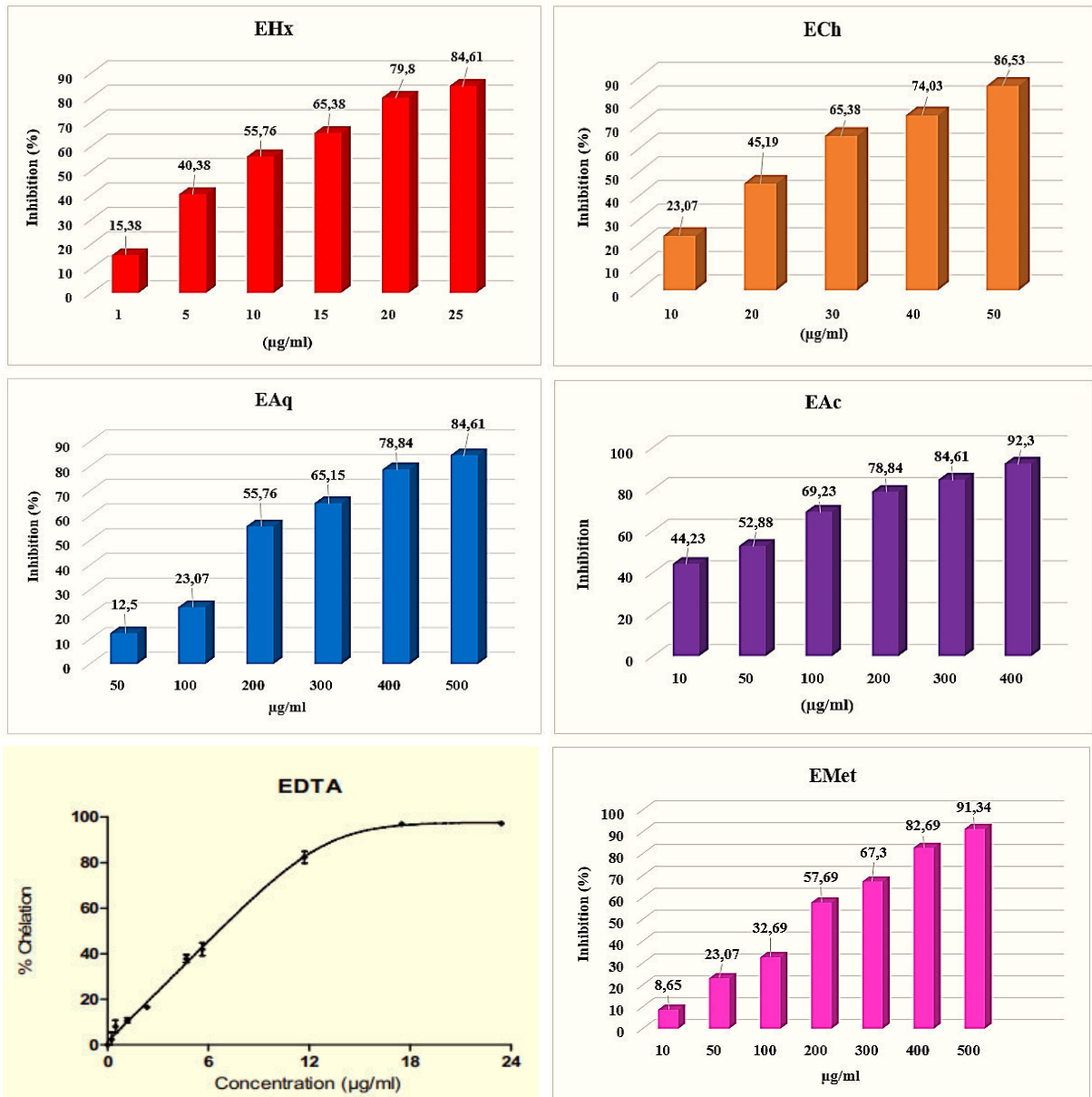


Figure N° 20 : Activité chélatrice des ions ferreux par les extraits de *Marrubium vulgare*

D'après les résultats obtenus nous avons trouvé que l'extrait EHX des feuilles d'*M. vulgare* chélate les ions ferreux plus efficacement que les autres extraits avec un pourcentage d'inhibition de 84,61% à 25 µg/ml. Le pouvoir chélateur de l'EDTA est très élevé (95 % à 25 µg/ml) par rapport à celui des autres extraits.

#### V.1.4.3. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne c'est la capacité des extraits de neutraliser les développements des bactéries dans un milieu de culture.

Les extraits de la plante ont été dissous dans du DMF de façon à obtenir une concentration de 500 mg/ml, à partir de cette concentration nous avons effectué une série de dilutions afin d'obtenir des concentrations ½ à partir de la solution mère.

Après une incubation de 24 H à 37C°, les résultats ont montré que la plupart des extraits n'exercent aucun effet inhibiteur contre les souches bactériennes utilisées, contrairement aux résultats de l'amoxicilline.

- Les résultats de l'antibiogramme sont montrés sur la figure 21 en dessous

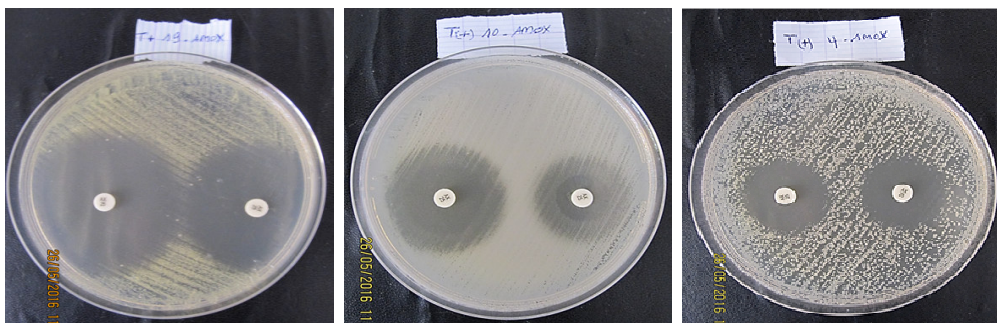


Figure N° 21 : L'effet de l'antibiotique Amoxicilline

- L'activité antibactérienne la plus significative a été enregistrée par l'extrait aqueux contre la bactérie *Bacillus cereus* avec un diamètre de zone d'inhibition (22mm). Comme il est montré sur la figure 22

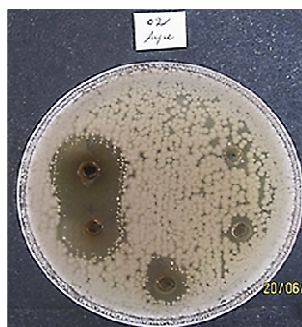


Figure N° 22 : L'activité inhibitrice de l'extrait aqueux contre la bactérie *Bacillus cereus*

**Tableau N°5 :** Diamètres des zones d'inhibition en mm des souches microbiennes vis-à-vis l'antibiotique Amoxicilline.

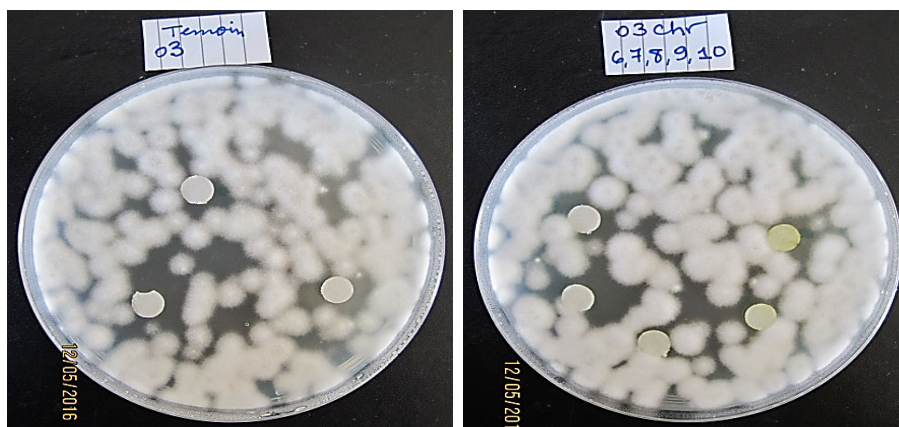
| Diamètres des zones d'inhibition (mm) |                           |                              |                          |
|---------------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Bactérie \ Antibiotique               | <i>Micrococcus luteus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>proteus mirabilis</i> |
| Amoxicilline                          | 46.5                      | 29.75                        | 27.25                    |

#### V.1.4.4. Activité antifongique

L'activité antifongique in vitro des différents extraits de *Marrubium vulgare* a été étudiée par la méthode de diffusion sur puits.

Nous avons dissous les extraits de la plante dans du DMF pour obtenir une concentration de 500 mg/ml, à partir de cette dernière nous avons fait des dilutions de façon à obtenir des concentrations  $\frac{1}{2}$  à partir de la solution mère.

Les résultats de l'activité antifongique montrent que les extraits de la plante *Marrubium vulgare* n'ont pas d'effet inhibiteur contre les souches fongiques utilisées.



**Figure N°23 :** Activité antifongique

## V.2. Discussion

Les plantes médicinales ont fait l'objet de beaucoup d'études à cause de leurs principes actifs qui diffèrent d'une plante à une autre créant ainsi une biodiversité remarquable. Plus de cinq milles substances naturelles différentes ont été identifiées (**Farombi., 2003**).

Parmi ces substances, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui sont surtout utilisés en thérapeutique. La pharmacopée utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (**Bahorun., 1997**).

Certaines plantes sont utilisées pour traiter le rhume et de la fièvre (*Marrubium vulgare* et *Rosmarinus officinalis*), les troubles d'estomac (*Mentha spicata*) (**Venderjagt et al., 2002**), les maladies rénales (*coriandrum sativum*) (**Aissaoui et al., 2008**), et plusieurs d'entre elles sont utilisées pour leurs effets analgésiques, antipyrétiques et anti inflammatoires (**Rasekh et al., 2001 ; kanko et al., 2004**).

*Marrubium vulgare* L. est une plante largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des troubles digestifs, la perte de l'appétit et la dyspepsie. Elle est également employée comme, antihypertenseur, antispasmodique, analgésique, insecticide, antiinflammatoire, antimicrobien, antioxydant, antifongique, antileucémique et dans de nombreuses autres activités biologiques (**Raynaud et al., 2007**).

Dans le but d'évaluer les activités biologiques de cette plante, nous avons utilisé plusieurs tests in-vitro.

Les composés phénoliques de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* se sont répartis entre les différents solvants d'extraction en fonction de leur solubilité et de leur polarité. Dans cette extraction des solvants de polarité différente ont été utilisés dont le plus polaire étant l'eau, méthanol suivi de l'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'hexane qui est le plus apolaire.

Le rendement d'extraction est effectivement variable en fonction du solvant utilisé. Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale a montré que l'EAq représente le rendement le plus élevé de (22,93 %) suivi par l'EMet (18,81 %), l'EAct (6,47%), l'ECh (4,06%) puis l'EHx (2,52%).

La majeure partie des composés de l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* se retrouvent dans l'EAq (22,93 %), contrairement aux extraits du chloroforme et de l'hexane pour lesquels de faibles taux d'extraction ont été enregistrés.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux des autres études, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés génétiques de la plante ainsi qu'à



l'origine géographique, aux conditions de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées (Lee *et al.*, 2003).

Dans la présente étude, la méthode d'extraction par macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bioactivité de ses constituants. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement d'extrait à pression réduite permettent d'obtenir le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

Afin d'analyser les extraits préparés à partir des feuilles de *Marrubium vulgare*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. (Li *et al.*, 2007)

Les composés phénoliques font actuellement l'objet de nombreuses études car ils sont reconnus pour leurs différentes activités biologiques (Trabelsi *et al.*, 2010) et ils ont été rapportés pour des propriétés pharmacologiques intéressantes et variées, à savoir leurs propriétés antioxydantes et anti-radicalaires (Ismail *et al.*, 2010 ; Troszyńska *et al.*, 2010), anti-inflammatoires (Narayana *et al.*, 2001), anticancéreuse (Zhang *et al.*, 2010), anti-allergique (Zhao *et al.*, 2005), antifongique (Harborne et Williams., 2000) et antibactérienne (Dembitsky., 2005 ; Kuate *et al.*, 2010).

Dans notre étude nous avons trouvé que l'EHx représente l'extrait le plus riche avec 161,55 µg EAG/mg d'extrait, suivi de l'EAct 136,85 µg EAG/mg d'extrait, l'EMet avec 130,35 µg EAG/mg d'extrait et l'ECh 66,35 µg EAG/mg d'extrait. L'EAq avec 66,15 µg EAG/mg d'extrait représente la fraction qui contient la plus faible teneur en polyphénols.

Ghedadba *et al.*, (2014) ont déterminé la teneur en polyphénols de l'extrait méthanolique de la même plante et l'ont estimé à 3,42 µg EAG/ mg, cette valeur est largement inférieure à celle que nous avons trouvé dans notre étude et qui est de 130,35 µg EAG/mg d'extrait. La teneur en polyphénols de l'extrait aqueux est de 03,07 µg EAG/ mg d'extrait selon la même étude, Cette valeur ne concorde pas avec la valeur que nous avons trouvé pour le même extrait et qui est 66.15 µg EAG/ mg.

Dans une étude qui a été faite sur la plante *Marrubium deserti*, Ghedadba *et al.*, (2015) ont déterminé la teneur en polyphénols totaux de la partie aérienne, ils ont trouvé que la teneur des polyphénols totaux est de 1,71 µg EAG/mg dans l'extrait aqueux et un taux plus

important (1,84 µg EAG/mg) dans l'extrait méthanolique, ces teneurs sont inférieures à celles obtenus dans la présente étude avec les feuilles de notre plante.

Pour ce qui est de la teneur en polyphénols du *Marrubium vulgare*, des résultats différents ont été obtenus aussi à partir des organes végétatifs de la même espèce de *Marrubium vulgare*. Un taux de 18,21mg EAG/ml d'extrait a été avancé par **Boudjelal, (2013)**. Une teneur extrêmement importante en composés phénoliques totaux de *Marrubium vulgare* a été notée lors d'une étude menée par **Matkowski et Piotrowska., (2006)**.

En effet, le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (environnement et stockage) (**Falleh et al., 2008**).

Les flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventifs et curatifs de plusieurs plantes médicinales. Ils sont connus par leurs remarquables activités pharmaco-biologiques comme entre autres des effets, antivirales, antimicrobiens (**Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006**) antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépato protecteurs (**Middleton et al., 2000**). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels.

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait hexanique sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de (14,86 µg EQ/mg d'extrait) et (9,32 µg EQ/mg d'extrait) respectivement. Par la suite vient l'extrait du chloroforme (8,75 µg EQ/mg d'extrait) suivi par l'extrait méthanolique (7,35 µg EQ/mg d'extrait). Cependant seulement (0,1 µg EQ/mg d'extrait) sont trouvés dans l'extrait aqueux.

Dans leur étude **Ghedadba et al., (2014)**, ont trouvé des teneurs en flavonoïdes de 18 mg EQ /g d'extraits et de 4.34 mg EQ /g pour les extraits méthanoïque et aqueux respectivement. Ces résultats sont supérieurs aux résultats qu'on a trouvés pour les mêmes extraits.

Plusieurs méthodes ont été utilisées, dans des travaux précédents, pour déterminer l'activité antioxydante des plantes (**Ghedadba et al., 2014 ; Ghedadba et al., 2015**). Dans la présente étude nous avons utilisé trois méthodes différentes pour évaluer l'activité antioxydante des feuilles de *Marrubium vulgare*. Ces méthodes sont basées sur des mécanismes antioxydantes différents : l'effet piègeur des radicaux libres, par le test DPPH et ABTS<sup>+</sup>, la mesure du pouvoir réducteur.

À des fins comparatives deux antioxydants standards sont utilisés ; l'acide gallique et l'acide ascorbique. Ils ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 0.436  $\mu\text{g/ml}$  et 2.203  $\mu\text{g/ml}$  respectivement.

Parmi les cinq extraits de feuilles de *M. vulgare*, l'EMet représente l'extrait le plus actif avec une  $IC_{50}$  de l'ordre de 23.222  $\mu\text{g/ml}$  suivi par l'EAct avec une  $IC_{50}$  de 110,549  $\mu\text{g/ml}$ .

L'activité anti radicalaire la plus faible a été exprimée par l'EHx et l'ECh avec des  $IC_{50}$ = 269,046  $\mu\text{g/ml}$  et 208,14  $\mu\text{g/ml}$  respectivement, qui sont moins actifs que l'EMet. Une activité intermédiaire a été obtenue avec l'EAq ayant une  $IC_{50}$  de l'ordre de 140.811  $\mu\text{g/ml}$ , soit 1/6 de l'activité exprimée par l'EMet.

En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. L'acide gallique est 53 à 253 fois plus actif que l'EMet et l'EAc, alors que l'acide ascorbique est 05 fois moins actifs que l'acide gallique.

L' $IC_{50}$  de l'EMet de la même plante a été déterminé par **Ghedadba et al., (2014)** à 1,5 $\mu\text{g/ml}$ , alors que **Khaled Khodja et al., (2014)** l'en déterminé à 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , ces valeurs sont bien inférieures aux valeurs que nous avons trouvé pour le même extrait et qui est de 23.222  $\mu\text{g/ml}$ .

Nos résultats sont différents de ceux de **Pukalskas et al., (2012)** qui ont prouvé que l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* de la Pologne s'est avéré à une activité antioxydante remarquable dans la neutralisation du radical DPPH ( $IC_{50}$ =1,15 $\mu\text{g/ml}$ ).

L'activité antiradicalaire des EMet et EAc pourrait s'expliquer par leurs teneurs élevés en composés phénoliques. Selon les travaux de **Ghedadba et al., (2014)** sur l'espèce *M. vulgare* cette activité est due aux phénylpropanoïdes glycosilés qui sont des puissants antioxydants.

La capacité de l'extrait à donner un électron en convertissant le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ , est évalué par le pouvoir réducteur, cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleu mesurable à 700 nm. Une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur.

Les résultats obtenus nous ont montré que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons, c'est-à-dire que le pouvoir réducteur des extraits est concentration dépendante. Ce qui est confirmé par plusieurs auteurs (**Ozturk et al., 2007 ; Su et al., 2008 ; Liuk et al., 2009**).

L'acide gallique a un pouvoir réducteur plus puissant que celui de l'acide ascorbique, et les deux standards ont montré un pouvoir réducteur bien plus puissant que les extraits et cela a une concentration plus basse.

D'après les résultats, nous avons remarqué que l'extrait méthanolique a un pouvoir réducteur inférieur à celui de l'acide gallique avec une absorbance maximale de 0.52 à 1000 µg/ml, par contre l'acide gallique donne une absorbance maximale de 0.955 à 40 µg/ml ; pour l'extraits d'acétate d'éthyle son pouvoir réducteur arrive à son maximum 0.372 à 1000 µg/ml mais reste inférieur de celle du EMet, la même remarque a été enregistrée pour l'EAq et l'EHx qui donnent une absorbance maximale de 0.323 et 0.221 à la même concentration respectivement, l'extrait chloroformique présente le pouvoir réducteur le plus faible avec une absorbance de 0.182 toujours à la même concentration.

Nos résultats peuvent être expliqués par l'existence de molécules ayant un potentiel réducteur donneur d'électron plus fort dans l'extrait méthanolique que les autres extraits de notre plante.

En générale, le potentiel réducteur des extraits végétaux est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les convertir en produits stables, terminant de ce fait les réactions en chaînes parmi lesquelles les polyphénols (Sousa *et al.*, 2008), ce qui explique le potentiel réducteur des extraits de la plante étudiée.

En ce qui concerne le test ABTS<sup>+</sup> les résultats obtenus montrent que l'extrait le plus actif est celui du méthanol avec une inhibition maximale de 88.44% à 2000 µg/ml, ensuite vient par ordre décroissant l'extrait chloroformique 54.13%, l'extrait d'acétate d'éthyle 52.06%, l'extrait d'hexane 47.26% et enfin l'extrait aqueux 42.93%.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de *Marrubium vulgare* ainsi que le standard agissent d'une manière concentration dépendante avec la formation du complexe (Fe<sup>2+</sup>-Ferrozine), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la Ferrozine.

Les pourcentages d'inhibitions des différents extraits testés montrent une grande variation allant de 12.5% à 84,61%. L'EHx semble avoir l'activité chélatrice la plus importante avec un pourcentage de 84,61% atteint à la concentration de 25 µg/ml, vient ensuite l'ECh avec une inhibition de 86,53% à 50 µg/ml, puis l'extrait EAc avec 52,88% à la même concentration. Le pouvoir chélateur des extraits EMet et EAq est le plus faible, avec des pourcentages de 23,07% et 12,5% respectivement à 50µg/ml.

La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration de métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne (Elmastaş *et al.*, 2006). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type  $\sigma$  avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh Kumar *et al.*, 2008).

Des travaux récents montrent que les composés phénoliques ne sont pas les principaux chélateurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange complexe d'acides organiques (acides citrique, malique, tartrique, oxalique, lipoïque et phytique..etc.), d'acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer également à la séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006). Les composés contenant le nitrogène sont généralement des chélateurs plus puissants que les composés phénoliques (Chan *et al.*, 2007). De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Van Acker *et al.*, 1996). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas des groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice.

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits de *Marrubium vulgare* par la méthode de diffusion sur puit en utilisant un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton pour les bactéries et PDA pour les champignons. L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de deux germes pathogènes dont six bactéries à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> et six champignons.

L'effet inhibiteur de la croissance de germe est réservé pour l'EAq à partir d'une concentration mère de 500 mg/ml, sur la bactérie *Bacillus cereus* et donne un diamètre d'inhibition maximal de 22 mm, Les diamètres d'inhibition sont en fonction de la dose déposée sur le puit. Par contre les résultats de l'activité antimicrobienne des EMet, ECh, EHx, et EAc sont négatifs, aucun extrait n'a eu d'effet contre les germes utilisés.

Les souches de bactéries à Gram<sup>+</sup> et à Gram<sup>-</sup> (*Micrococcus luteus*, *proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*) ont montré des sensibilités différentes vis-à-vis l'antibiotique standard testé : Amoxicilline.

La bactérie *Micrococcus luteus* est une bactérie à Gram<sup>+</sup>, c'est la plus sensible à l'Amoxicilline avec un diamètre de zone d'inhibition de 46.5 mm, suivi par *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 29.75 mm, et en fin *proteus mirabilis* présente un faible taux de sensibilité (27.25 mm).

L'efficacité optimale d'un extrait ne peut pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (**Essawi et Srour., 2000**). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse de l'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Jungkind., 1995**).

Les résultats ont indiqué que plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne comme : le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires (**Cushnie et Lamb., 2011**).

L'activité antibactérienne de différents extraits (EMet, EAq) de la même plante a été étudié par **Ghedadba et al., (2014)** contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, leurs résultats sont aussi négatifs.

Selon **Ghedadba et al., (2014)** la paroi d'*Escherichia coli* (bactéries à Gram négatives) est très riche en lipopolysaccharides (LPS), qui empêchent les molécules comme les terpènes hydrophobes d'adhérer à lui. D'ailleurs, ces micro-organismes sont mobiles, il est probablement possible à ces bactéries d'être déplacées profondément dans l'agar nutritif de gélose, et par conséquent d'échapper ainsi à l'action des métabolites contenus dans les extraits du *Marrubium vulgare*. La plus grande résistance du Gram (+) de *Staphylococcus aureus* vers les extraits peut être expliquée par la structure de paroi hétérogène de la bactérie : la présence de l'exo polysaccharide contenant une couche externe (glycocalyx), la présence de certains composants comme l'acide teichoïque et quelques liens entre les divers composants donnent au polymère fortement réticulé de parois une structure tertiaire inconnue.

La détermination de l'activité antifongique a été estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, induit par les concentrations des différents extraits.

Les résultats de l'activité antifongique des feuilles du *Marrubium vulgare* obtenus sont négatifs. Aucun extrait n'a eu d'effet contre les champignons examinés ; *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* var. *coagulum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, et une levure *Candida albicans*.

**Bouterfas et al., (2016)** ont étudié l'effet des différents extraits des *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Candida albicans* et de *Aspergillus niger*, contrairement à nos résultats, tous les extraits ont montré un effet positif et des zones d'inhibition qui varie en fonction de la concentration des extraits.

La phytothérapie, proposant des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme. Elle connaît actuellement un renouvellement exceptionnel en occident du fait des effets secondaires induits par les médicaments inquiétant les utilisateurs qui font alors appel à une médecine plus douce.

En Algérie, comme dans tous les pays du Maghreb et les pays en voie de développement, le recours à la médecine traditionnelle est largement répandu, et plusieurs remèdes à base de plantes utilisés individuellement ou en combinaison sont recommandés.

Notre intérêt s'est porté sur *Marrubium vulgare* L ou Marrube blanc, espèce végétale utilisée en phytothérapie. Afin de vérifier l'efficacité de cette plante sur les activités antioxydante, antibactérienne et antifongique.

L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé que les différents extraits ont montré une très forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH, un pouvoir réducteur important, et un effet piègeur significatif du radical-cation ABTS<sup>+</sup>.

A travers l'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits de la plante *Marrubium vulgare* L. vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes, il apparaît que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, la concentration du produit testé et aussi du milieu de culture utilisé.

Concernant l'activité antifongique, tous les extraits n'ont montré aucune activité inhibitrice vis-à-vis les souches fongiques testées.

En perspective, il serait important

- De confirmer l'effet antioxydant in vivo (chez les animaux).
- Faire des études à l'échelle moléculaire pour déterminer, d'une part les composés de la plante *Marrubium vulgare*. (Notamment ce qui concerne l'identification et la purification des composés phénoliques et des flavonoïdes) qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs effets biologiques.
- D'évaluer l'activité de la plante contre d'autres maladies telles que le diabète, l'hypertension et l'arthrite...etc.
- D'approfondir les recherches sur une large gamme de souches microbiennes et d'identifier les constituants actifs responsables de l'activité antibactérienne.
- Faire l'étude de toxicité chronique chez les rats.
- Etude de l'effet tératogène.



*Références*

---

*bibliographiques*

1. **Aissaoui A., El-Hilaly J., Israili Z. H., Lyoussi B. ; 2008.** Acute diuretic effect of continuous intravenous infusion of an aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. in anesthetized rats. *Food Chemistry ; jj; 89-95.*
2. **Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. 2008.** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res Int, 41* : 1–15.
3. **Alkhatib R., Joha S., Cheok M., Roumy V., Idziorek T., Preudhomme C., Quesnel B., Sahpaz S., Bailleul F. & Hennebelle T., 2010.** Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*, *Planta Medica.*, Vol. 76 (1), 86-87.
4. **Arrar L., Diafet. A., Charef. N., Khennouf. S., Baghiani. A., 2013.** Preventive and curative effect of the methanolic extract of *Ajuga iva* on collagen induced arthritis in rats. *Pharmacognosy Communications.* Vol (3). Issue: 2. Pp: 17-23.
5. **Astekin. D., Atasever. M., Adigüzel. G., Keles. M., Tastekin A., 2006.** Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba-alba* in experimental hyperglycaemic rats. *Bull Vet Inst Pulawy.* Vol (50). Pp : 235-238.
6. **Baba Aissa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition librairie modern-Rouiba. Alger.
7. **Bahorun T. (1997).** Substances naturelles activités : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Ed. AMAS. Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius;* 83-94.
8. **Baillet. O., (2012).** Quelle place pour le complément alimentaire dans l'arthrose à l'officine ? Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Angers. Nb : 220.
9. **Bardet. O., Fedoroff. E., Causse. G., Moret. J., (2008).** Atlas de la flore sauvage de Bourgogne. Co-édition Parthénope / Muséum national d'Histoire naturelle. France. Pp : 754.
10. **Beddou, F.** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *Anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de Doctorat. Algérie : Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen , 2015.
11. **Belhattab R, Larous L (2006)** Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing wild in Algeria. *J Essent Oil Res* **18**: 369–73
12. **Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J. and Younos C. (1991).** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*, **35** : 123–143.
13. **Bernard. C., (2015).** Le marrube, l'énergie blanche. Magazine Plantes & Santé. Article N°154.
14. **Blois. M. S., (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*1958. Pp : 1199–1200.
15. **Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. 2000.** Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, **13**, 135.
16. **Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, et al. (2012)** Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoteparia* **2**: 286–92.
17. **Boudjelal. A., (2013).** Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées « *Ajugaiva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubium vulgare* » de la région de M'Sila, Algérie. Université Badji Mokhtar Annaba. Pp : 7- 61

18. **Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Aouad, L., Elaoufi, M. M., Khaled, M. B., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016).** La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*?. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*.
19. **Boyd B., Ford C., Koepke M.C., Gary K., Horn E., McAnalley S., and McAnalley B. 2003.** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. **4 (6)** :7. (cited in Mohammedi Z, 2005).
20. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol* 28:25–30.
21. **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
22. **Caro. L., Cayrol. C., Dalem. E., Esseghir. S., (2010).** Les compléments alimentaires. Dossier sante. Pp : 7-8.
23. **Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Mohammed, O. (2007).** Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *etlingera* species (Zingiberaceae) in peninsular Malaysia. *Food Chemistry*. **104**: 1586-1593.
24. **Cowan. M. M., (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Rev Clinique Microbiol*. Vol (12). Pp: 564-582.
25. **Cushnie. T. P. T., Lamb. A. J., (2011).** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Jornale Antimicrob Agents*. Vol (38). Pp: 99-107
26. **De Souza M. M., De Jessus R. A. P., Cechinel-Filho V., Schlemper V., 1998.** Analgesic profile of alcoholic extract obtained from *Marrubium Vulgare*. *Phytomedicine*, **5**, 103-107
27. **Dejesus RA, Cechinel Filho V (2000).** Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare* L. *Phytomedicine*, **7**: 111–5.
28. **Delille. L., (2007).** Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger. Pp : 122.
29. **Dembitsky. V. M., (2005).** Astonishing diversity of natural surfactants: 6. biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides- a review. *Lipids*, Vol (40). Issue : 9. Pp : 869–900.
30. **Dhaouadi. K., Raboudi. F., Estevan. C., Barrajon. E., Vilanova. E., Hamdaoui. M., Fattouch. S., (2010).** Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts *J Agric. Food Chem*. Vol (59). Pp: 402-406.
31. **Diafat. A., Arrar. L., Derradji. Y., Bouaziz. F., (2016).** Acute and chronic toxicity of the methanolic extract of *Ajuga iva* in rodents. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. Vol (9). Issue: 2. Pp: 9-16.
32. **Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida MLM (1994).** Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys*. **31 5** : 1 61 -1 69.
33. **Djahra, A. B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2012).** Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse : Revue des Sciences et de la Technologie*, **24**, 29-37.

34. **Dupuy M F., (2015).** Compléments alimentaires Démêler le vrai du faux. Grand angle. médecine générale. N° 23. Pp : 23-33.
35. **Edeas. M., (2007).** Les polyphénols et les polyphénols de thé. Phytothérapie. Vol (5). Pp: 264–270.
36. **Edziri H., Ammar S., Groh P., Mahjoub M.A., Mastouri M., Gutmann L., Zine M. & Aouni M., 2007.** Antimicrobial and cytotoxic activity of *Marrubium alysson* and *Retama retama* in Tunisia, *Pak. J. Biol. Sci.*, Vol. 10, 1759-1762.
37. **El Bardai S, Morel N, Wibo M, et al. (2003).** The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Planta Med* **69** : 75–7.
38. **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.*, Vol. 26 (6), 465-474.
39. **El Hilaly J., Israilib. Z. H., Lyoussia. B., (2004).** Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol (91). Pp: 43–50
40. **El-hilaly J., Tahraoui T., Israili Z.H., Lyoussi B. (2006).** Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacol*. Vol (105). Pp : 441–448.
41. **Elmastaş, M., Gülçin, İ., Işildak, Ö., Küfrevioğlu, Ö.İ., İbaoglu, K., Aboul-Enein, .H.Y. (2006).** Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **3**: 258-266.
42. **Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. 2007.** La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
43. **Essawi. T., Srour. M., (2000).** Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*. Vol (70). Pp: 343-349.
44. **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bourauoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities *C. R.-Biologies*. **331** : 372-379.
45. **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z. 1986.** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé.*, **64** (2) : 159 164.
46. **Farombi E.O. (2003).** African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African journal of biotechnology*, 2 (12): 662-671.
47. **Favier, A. 2003.** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, **11** : 108-115.
48. **Fortmann. P. S., Burda. U. B., Senger. C. A., Lin. J. S., Whitlok. E. P., (2013).** Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: an updated systematic evidence review for the U.S. preventive services task force. Review: *Annals of internal medicine*. Vol (159). N°12. Pp: 824

49. Ghedadba, N., Bousselfela, H., Hambaba, L., Benbia, S., & Mouloud, Y. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L. *Phytothérapie*, 12(1), 15-24.
50. Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselfela, H., & Ouled-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.
51. Ghedira, K., (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. Vol (4). Pp : 162-169.
52. Ghrabi Z., Sand R.L., (2008). *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa. Vol (49). Pp : 49
53. Greuter W., Burdet H.M., Long G., Eds. *Med-Checklist* ; Conservatoire et Jardins Botaniques : Genève, 1986, 3, 292-295.
54. Guet. A., (2011)., l'apport de *marrubium vulgare* L dans la prévention du risque cardiovasculaire. Diplôme de docteur en pharmacie. France.
55. Gutteridge, J.M. 1993. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, 19 :141-158.
56. Halsted H C., (2000). Dietary supplements and The American Journal of Clinical Nutrition. Editor-in-Chief, Editorial, the American Journal of Clinical Nutrition, USA. Vol (71). Pp: 399-400.
57. Harborne, J. B. et Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992-a review. *Phytochemistry*, 55: 481 -504.
58. Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, M., Chaib N., Guessous Idrissi N., (2001). B Soc Pathol, Vol (94). Pp : 29-31.
59. Hmamouchi, I., Rachidi, M., Abourazzak, F E., Khazzani, H., Bennani, L., Bzami, F., El Mansouri, L., Tahiri L., Harzy, T., Abouqal, R., Allali, F., Hajjaj-Hassouni, N., (2012). Article originale : Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales marocaines en rhumatologie. *Revue Marocaine de Rhumatologie Rabat – Maroc*. Vol (22). Pp : 52-6.
60. Huang, D.J., Lin, C.D., Chen, H.J., Lin, Y.H., 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 179-186.
61. Huang, H. Y., Caballero, B., Chang, S., Alberg, A. J., Semba, R. D., Schneyer, C., Wilson, R. F., Cheng, T. Y., Prokopowicz, G., Barnes II, G. J., Vassy, J., & Bass, E. B. (2007). Multivitamin/mineral supplements and prevention of chronic disease: executive summary. *The American journal of clinical nutrition*, 85(1), 265S-268S.
62. Iserin Paul (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*, Ed. Larousse-Bordas Paris, 14
63. Ismail, H. I.; Chan, K. W.; Mariod, A. A. et Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119: 643-647.
64. Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M., Yusuf, S. 1995. The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med*, 123: 860.

65. **Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P., 2002.** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1<sup>ère</sup> Ed : Paris et Bruxelles. Pp : 84-87- 369-384-399.
66. **Jungkind. D. L., (1995).** Antimicrobial resistance: a crisis in health care, [based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: A Crisis in Health Care Clinical Laboratory and Epidemiologic Considerations, held November 11 -12, 1993, in Philadelphia, Pennsylvania]. Edition Plenum Press, New York. Pp: 248.
67. **Kanko C., Swaliho B. E. H, Kone S., Koukoua G., N'Guessan Y. T. ; (2004).** Etude des propriétés physico-chimique des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, (*Jymbopogon nardus*, (*Jymbopogon giganteus*. *C. R. Chimie* ,• 7; 1039-1042.
68. **Kanyonga PM, Fauzi MA, Meddah B, et al. (2011)** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *J Chem Pharm Res* **3**: 199–204
69. **Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., & Madani, K. (2014).** Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial crops and products*, *61*, 41-48.
70. **Kuete, V.; Metuno, R.; Ngameni, B.; Mbaveng Tsafack, A.; Ngandeu, F.; Fotso, G. W.; Bezabih, M.; Etoa, F.-X.; Ngadjui, B. T.; Abegaz, B. M. et Beng, V. P. (2007).** Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treulia obovoidea* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **112**: 531-536.
71. **Kurbatova NV, Muzychkina RA, Mukhitdinov NM, Parshina GN (2003)** Comparative phytochemical investigation of the composition and content of biologically active substances in *Marrubium vulgare* and *Marrubium alternidens*. *Chem Nat Comp* **39**: 501–2.
72. **Lauzanne. J., (2006).** Tout savoir sur les compléments alimentaires. Doctissimo Nutrition., France.
73. **Lee et al. (2003).** Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine, *J Agric Food chem.*, *51* : 7292-7295.
74. **Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. **102** : 771-776.
75. **Liuk, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X. (2009).** Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* , *Food chemistry*, (112): 35-4.
76. **Macheix. J. J., Fleuriet. A., Jay-Allemand. C. H., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Pp: 1 -31.
77. **Martin S, Andriantsitohaina R. 2002.** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann. Cardiol. Angéiol.*, **51 (6)** : 304-15.
78. **Martínez. M. E., Jacobs. E. T., Baron. A. J., Marshall. R. J., Byers. T., (2012).** Dietary Supplements and Cancer Prevention: Balancing Potential Benefits Against Proven Harms. Vol (104). Issue: 10. Pp: 1.
79. **Matkowski A, Piotrowska M (2006)** Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia* **77**: 346–353.
80. **Maundu, P., Berger, D.J., Ole Saitabau, C, Nasieku, J., Kipelian, M., Mathenge, S.G., Morimoto, Y., Hoft, R., 2001.** Ethnobotany of the Loita Maasai: Towards Community Management of the Forest of the

- Lost Child—Experiences from the Loita Ethnobotany Project. People and Plants working paper 8. UNESCO, Paris.
81. **Meyre-Silva C, Yunes RA, Schlemper V, et al. (2005).** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Il Farmaco* **60**: 312–26.
  82. **Meyre-Silva C, Yunes RA, Schlemper V, et al. (2005).** Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Il Farmaco* **60**: 312–26.
  83. **Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharidies, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. **52**: 673- 751.
  84. **Naczk. M., Shahidi. F., (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis- a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol (41). Pp: 1523-1542.
  85. **Narayana, K. R.; Reddy, M. R.; Chaluvadi, M. R. et Krishna, D. R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, **33**: 2-16.
  86. **Nawwar-Mahmoud AM, El-Mousallamy AMD, Barakat HH, et al. (1989)** Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. *Phytochemistry* **28** : 3201–6.
  87. **Novaes, A. P., Rossi, C., Poffo, C., Pretti, J. E., Oliveira, A. E., Schlemper, V., ... & Bürger, C. (2000).** Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Thérapie*, *56*(4), 427-430.
  88. **Oyaizu, M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307–315.
  89. **Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M.E., Topcu, G. (2007).** Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant. *Food Chemistry*, **106**: 1264 1270.
  90. **Pavela R., 2004.** Insecticidal activity of certain medicinal plants, *Fitoterapia.*, Vol. 75, 745–749.
  91. **Pukalskas A, Rimantas Venskutonis P, Salido S, et al. (2012).** Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chem* **130**: 695–701.
  92. **Pukalskas A, Venskutonis PR, Salido S, et al. (2012).** Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania. *Food Chem* **130** : 695–701.
  93. **Quezel. P., Santa. S., (1962).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Tome I. Pp : 565.
  94. **Quezel. P., Santa. S., (1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol (2). CNRS, Paris.
  95. **Rasekh H. R., Khoshnood-Mansourkhani M. J., Kamalinejad M. ; (2001).** Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fitoterapia* ; .72 ; 937-939.
  96. **Raynaud J., 2007.** Prescription et conseil en phytothérapie. Ed. Tec & Doc. 215p.
  97. **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, *26*(9), 1231-1237.

98. **Rigano D., Aviello G., Bruno M., Formisano C., Rosselli S., Capasso R., Senatore F., Izzo A.A. & Borrelli F., 2009.** Antispasmodic Effects and Structure–Activity Relationships of Labdane Diterpenoids from *Marrubium globosum ssp. libanoticum*, *J. Nat. Prod.*, **Vol. 72**, 1477-1481.
99. **Sahpas S, Hennebelle T, Bailleul F (2002)** Marruboside, a new phenylethanoid glycoside from *Marrubium vulgare* L. *Nat Prod Lett* 16: 195–9.
100. **Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F (2002)** Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol* **79**: 389–392
101. **Schlemper, V., Ribas, A., Nicolau, M., & Cechinel Filho, V. (1996).** Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*, 3 (2), 211-216.
102. **Sereme, A., Milogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2011).** Propriétés thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso.
103. **Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K.(2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids . *Journal of phytochemistr* .**67**: 2058-2070.
104. **Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acids reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
105. **Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H., Hagen, T.M. 2004.** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, **11** : 1135– 1146.
106. **Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F., et al. 1996.** Oxidative damage in Alzheimer's [letter]. *Nature*, 382 : 120.
107. **Sousa, A., Ferreira, I. C., Barros, L., Bento, A., & Pereira, J. A. (2008).** Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “alcaparras”. *LWT- Food Science and Technology*, 41(4), 739-745.
108. **Stanković. M. S., (2011).** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac J Sci.* Vol (33). Pp: 63–72.
109. **Su, M.S., Shyu, Y.T., Chien, P.J. (2008).** Antioxidant activities of vetrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, 111: 892-896.
110. **Suresh Kumar, K., Ganesan, K., Subba Rao, P.V. (2008)** Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - an edible seaweed. *Food Chemistry*. **107**: 289-295.
111. **Taleb-Senoucia D., Ghomaria H., Kroufa D., Bouderbala S., Prost J., LacailleDubois M.A. and Bouchenaka M. (2009).** Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, **16**: 623–631.
112. **Toro, J., & Rodrigo, R. 2009.** Oxidative Stress: Basic Overview. In R. RODRIGO (Ed.), *OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS: THEIR ROLE IN HUMAN DISEASE* (pp. 1-17). New York: Nova Science Publishers.
113. **Trabelsi, N. ; Megdiche, W. ; Ksouri, R. ; Falleh, H. ; Oueslati, S. ; Soumaya, B. ; Hajlaoui, H. et Abdelly, C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*, **43**: 632– 639.



114. **Troszyńska, A. ; Narolewska, O. ; Robredo, S. ; Estrella, I. ; Hernández, T. ; Lamparski, G. et Amarowicz, R. (2010).** The effect of polysaccharides on the astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, **21**: 463–469.
115. **Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.L., Griffioen, D.H., Bennenkom, W.P.V., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (1996).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology & medicine*. **20**: 331-342.
116. **Vanderjagt, D. J., Harrison, J. M., Ratliff, D. M., Hunsaker, L. A., & Vander Jagt, D. L. (2001).** Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clinical biochemistry*, *34*(4), 265-270.
117. **Venderjagt T. J., Ghattas R., Venderjagt D. J., Crossey M., Glew R. H. ; (2002).** Comparisan of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Lfe Sciences*; *70*; 1035-1040.
118. **Vergara-Galicia J, Aguirre-Crespo F, Tun-Suarez A, et al. (2012)** Acute hypoglycemic effect of ethanolic extracts from *Marrubium vulgare*. *Phytopharmacology* **3**: 54–60.
119. **Warda K., Markouk M., Bekkouche K., Larhsini M., Abbad A., Romane A. & Bouskraoui M., 2009.** Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 3 (3), 101-104.
120. **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, *J. Fett/Lipid.*, Vol. 101 (10), 395-400.
121. **Wu D & Cederbaum A 2003.** Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alchol Research and Health*, **27** : 277-284.
122. **Yamaguchi, K., Liggett, J. L., Kim, N. C., & Baek, S. J. (2006).** Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. *Oncology reports*, *15*(1), 275-282.
123. **Yin Y., Gong F.Y., XinWu X., Sun Y., Li Y., Chen T. and Xu Q. (2008).** Antiinflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol*, **120** : 1–6.
124. **Yollande K. N., (2009).** Evaluation in vitro des pouvoirs antifongiques des extraits de feuille de papayer sur des souches de candidas albicans. ISTM Kinshasa - Gradué en techniques de laboratoire. Romain. Vol (11). Pp : 33-36.
125. **Yrjöen. T., (2004).** Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. Pp: 76.
126. **Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M. and Benjelloun W. (1997).** Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Moroccan. *J Ethnopharmacol*, **58** : 45–54.
127. **Bouabdallah. A., (2014).** feuille d’Oliver: Physico-Chimie, Synthèse et Activité Biologique. Université Abou BekrBelkaïd -Tlemcen-.
128. **Aouidi. F., (2012).** Etude et Valorisation des feuilles d’olivier Olea Europaea.
129. **Lyons. L., Nambiar. D., (2005).**, Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH., Tous droits réservés CATIE., Toronto, Ontario., Canada., Pp : 60.

# *Annexe*

---

## Annexe

### Dosage Flavonoïde :

Tableau N°1 : de l'absorbons de quercitrine dans défèrent concentration.

|                                    |      |       |     |       |      |      |
|------------------------------------|------|-------|-----|-------|------|------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 5    | 10    | 25  | 30    | 40   | 50   |
| Absorbance (à 430 nm)              | 0,14 | 0,265 | 0,6 | 0,754 | 0,97 | 1,17 |

Tableau N°2 : la quantité de flavonoïde dans l'extrait de *Marrubium vulgare*.

| Flavonoïde   |        |          |             |        |                  |
|--|--------|----------|-------------|--------|------------------|
| Extrait  | aqueux | méthanol | chloroforme | hexane | acétate d'éthyle |
| Concentration (mg/ml)                                    | 1      | 1        | 1           | 1      | 1                |
| Quantité de flavonoïde ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ) | 0,1    | 7,35     | 8,75        | 9,32   | 14,86            |

### Dosage polyphénol :

Tableau N°3 : l'absorbance de l'acide gallique dans défèrent concentration.

|                                    |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 25    | 50    | 75    | 100   | 150   | 175   |
| Abs (à 765nm)                      | 0,383 | 0,743 | 1,037 | 1,428 | 2,046 | 2,301 |

Tableau N°4 : la quantité de polyphénol dans l'extrait de la marrubium vulgure.

| Polyphénol  |        |          |             |        |                  |
|---|--------|----------|-------------|--------|------------------|
| Extrait   | aqueux | méthanol | chloroforme | hexane | acétate d'éthyle |
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )                        | 200    | 200      | 200         | 200    | 200              |
| Quantité de polyphénol ( $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ ) | 66,15  | 136,35   | 66,35       | 161,55 | 130,85           |

### Inhibition du radical DPPH :

#### Les standards :

Tableau N°5 : Inhibition du radical DPPH par l'acide gallique.

| Acide gallique     |       |       |       |       |      |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| Concentration mg/l | 0,2   | 0,4   | 0,6   | 0,8   | 1,2  |
| Inhibition %       | 39,69 | 50,33 | 56,92 | 59,45 | 73,9 |

## Annexe

Tableau N°6 : Inhibition du radical DPPH par l'acide ascorbique.

| Acide ascorbique   |       |      |       |       |       |       |
|--------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration mg/l | 0,5   | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     |
| Inhibition         | 20,19 | 26,6 | 46,79 | 64,03 | 85,22 | 94,82 |

Tableau N°7 : Inhibition du radical DPPH par la quercétine.

| Quercétine         |       |      |       |       |       |       |
|--------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration mg/l | 0,5   | 1    | 2     | 3     | 4     | 5     |
| Inhibition %       | 20,19 | 26,6 | 46,79 | 64,03 | 85,22 | 94,82 |

### Pouvoir réducteur :

#### Les standards :

Tableau N°8 : Pouvoir réducteur d'acide ascorbique.

| Acide ascorbique      |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration (µg/ml) | 40    | 30    | 20    | 10    | 5     |
| Absorbance (nm)       | 0,995 | 0,764 | 0,497 | 0,248 | 0,136 |

Tableau N°9 : Pouvoir réducteur de l'acide gallique.

| Acide gallique        |      |      |       |       |       |
|-----------------------|------|------|-------|-------|-------|
| Concentration (µg/ml) | 40   | 30   | 20    | 10    | 5     |
| Absorbance (nm)       | 1,69 | 1,47 | 1,023 | 0,481 | 0,221 |

#### Les tests :

Tableau N°10 : Pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique.

| Méthanol              |      |       |       |       |       |       |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration (µg/ml) | 1000 | 800   | 400   | 200   | 100   | 50    |
| Absorbance (nm)       | 0,52 | 0,449 | 0,242 | 0,175 | 0,113 | 0,079 |

Tableau N°11 : Pouvoir réducteur de l'extrait chloroformique.

| Chloroforme           |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration (µg/ml) | 1000  | 800   | 400   | 150   | 100   |
| Absorbance (nm)       | 0,182 | 0,171 | 0,153 | 0,102 | 0,097 |

## Annexe

Tableau N°12 : Pouvoir réducteur de l'extrait aqueux.

| Aqueux                             |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1000  | 800   | 400   | 200   | 150   | 100   |
| Absorbance (nm)                    | 0,323 | 0,311 | 0,186 | 0,127 | 0,108 | 0,091 |

Tableau N°13 : Pouvoir réducteur d'extrait hexanique.

| Hexane                             |       |       |       |      |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1000  | 800   | 400   | 200  | 150   |
| Absorbance (nm)                    | 0,221 | 0,198 | 0,105 | 0,09 | 0,084 |

Tableau N°14 : Pouvoir réducteur de l'extrait d'acétate d'éthyle.

| Acétate d'éthyle                   |       |      |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1000  | 800  | 600   | 400   | 200   | 100   |
| Absorbance (nm)                    | 0,372 | 0,35 | 0,318 | 0,265 | 0,182 | 0,144 |

### Test ABTS :

Tableau N°15 : inhibition de radical cation ABTS.

| Hexane                             |       |      |       |       |       |
|------------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1080  | 1200 | 1800  | 2400  | 4000  |
| Inhibition                         | 35,17 | 38,1 | 46,55 | 56,72 | 64,65 |

Tableau N°16 : inhibition de radical cation ABTS

| Méthanol                           |       |       |      |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 100   | 500   | 800  | 1000  | 2000  |
| Inhibition                         | 19,65 | 41,03 | 56,8 | 59,48 | 88,44 |

Tableau N°17 : inhibition de radical cation ABTS

| Chloroforme                        |       |       |       |       |      |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1000  | 1500  | 2000  | 4000  | 6000 |
| Inhibition                         | 37,06 | 48,44 | 54,13 | 58,44 | 76,2 |

## Annexe

Tableau N°18 : inhibition de radical cation ABTS

| Aqueux                             |      |      |       |       |       |       |
|------------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 50   | 500  | 1000  | 1500  | 2000  | 4000  |
| Inhibition                         | 3,05 | 10,6 | 27,78 | 34,82 | 42,93 | 74,65 |

Tableau N°19: inhibition de radical cation ABTS .

| Acétate d'éthyle                   |      |       |        |        |       |       |
|------------------------------------|------|-------|--------|--------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 50   | 500   | 1000   | 1500   | 2000  | 4000  |
| Inhibition                         | 7,58 | 15,86 | 36,379 | 43,967 | 52,05 | 75,51 |

### Chélation de fer :

Tableau N°20 : La capacité chélatrice de méthanol.

| Méthanol                           |      |       |       |       |      |       |       |
|------------------------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 10   | 50    | 100   | 200   | 300  | 400   | 500   |
| Inhibition                         | 8,65 | 23,07 | 32,69 | 57,69 | 67,3 | 82,69 | 91,34 |

Tableau N°21 : La capacité chélatrice.

| Aqueux                             |      |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 50   | 100   | 200   | 300   | 400   | 500   |
| Inhibition %                       | 12,5 | 23,07 | 55,76 | 65,15 | 78,84 | 84,61 |

Tableau N°22 : La capacité chélatrice.

| Chloroforme                        |       |       |       |       |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 10    | 20    | 30    | 40    | 50    |
| Inhibition %                       | 23,07 | 45,19 | 65,38 | 74,03 | 86,53 |

Tableau N°23 : La capacité chélatrice .

| Hexane                             |       |       |       |       |      |       |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 1     | 5     | 10    | 15    | 20   | 25    |
| Inhibition%                        | 15,38 | 40,38 | 55,76 | 65,38 | 79,8 | 84,61 |

Tableau N°24 : La capacité chélatrice.

| Acétate d'éthyle                   |       |       |       |       |       |      |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | 10    | 50    | 100   | 200   | 300   | 400  |
| Inhibition %                       | 44,23 | 52,88 | 69,23 | 78,84 | 84,61 | 92,3 |

يعتبر نبات *Marrubium vulgare* (النعناع الأبيض) من بين النباتات الطبية التي يستفاد من شهرتها العلاجية وتحتاج الى أبحاث جادة للتعرف على صفاتها الكيميائية والبيولوجية، وهو نبات من عائلة الشفوية، عشبة معمرة وعفوية، تتواجد في منطقة البحر الأبيض المتوسط. تهدف هذه الدراسة الى تقدير مختلف الأنشطة البيولوجية (المضادة للأكسدة، المضادة للبكتيريا، والمضادة للفطريات) لمستخلصات هذه النبتة. قدرت النشاطية المضادة للأكسدة لهذه النبتة باستعمال ثلاث طرق مختلفة: اختبار إرجاع الجذر الحر DPPH، اختبار القدرة الإرجاعية واختبار إرجاع جذر ABTS+. أظهرت نتائج النشاطية المضاد للأكسدة أن جميع المستخلصات لديها كفاءة عالية لإرجاع الجذر الحر DPPH وقدرة إرجاعية مهمة جدا. تقدير النشاطية المضادة للمكروبات تم باستعمال طريقة الانتشار في الحفر وذلك باختبار مستخلصات هذه النبتة على ستة أنواع من البكتيريا الممرضة للإنسان وخمس أنواع من الفطريات الممرضة للنباتات، وكذلك على نوع واحد من الخمائر. أظهرت النتائج أن تثبيط نمو المكروبات يختلف حسب نوع السلالة، وتركيز المستخلص، حيث أن أحسن نتيجة تثبيط تم تسجيلها هي 22 مم والتي كانت مع المستخلص المائي ضد البكتيريا *Bacillus cereus*. أما بالنسبة لنتائج النشاطية المضادة للفطريات، فقد كانت جميع السلالات المجهرية مقاومة لجميع مستخلصات هذه النبتة.

### الكلمات المفتاحية:

*Marrubium vulgare*، المستقلبات الثانوية، النشاطية المضادة للمكروبات، النشاطية المضادة للأكسدة، إنقراط أيونات الحديد، التقدير الكمي للمركبات متعددة الفينول الكلية والفلافونويدات.

## Abstract

*Marrubium vulgare* L (White horehound), Lamiaceae family, is a perennial herb spontaneous, very responded in the Mediterranean region. The present study is carried out by the evaluation of the different biological activities ; antioxidant, antibacterial and antifungal activities of different extracts of this plant.

The antioxidant activity was determined using the test of DPPH, iron chelating activity, reducing power and radical cation-reduction ABTS+. The determination of antioxidant activity showed that the extracts have a strong anti-radical activity against the radical DPPH, an important the reducing power. And also a significant ABTS+ radical-cation scavenging effect.

The antimicrobial activity was determined by agar well diffusion method. The extracts were tested against six human pathogenic bacterial strains, five phytopathogenic fungi and one yeast. It shows that the inhibition of the growth of microorganisms tested varies depending on the microbial species, the concentration. The highest zone of inhibition recorded by the aqueous extract against *Bacillus cereus* (22mm).

For the antifungal activity, all tested strains were resistant against all the extracts of this plant.

### Keywords :

*Marrubium vulgare*, secondary metabolites, antimicrobial activity, antioxidant activity, iron chelating activity, determination of total polyphenols and flavonoids.

## Résumé

*Marrubium vulgare* L (Le marrube blanc), famille des Lamiacées, est une plante herbacée vivace, spontanée très répondu dans la région méditerranéenne. La présente étude a pour but d'évaluer les différentes activités biologiques, l'activité antioxydante ainsi que l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de cette plante.

L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test de DPPH, la chélation de Fer, le pouvoir réducteur et la réduction de radical-cation ABTS+.

La détermination de l'activité antioxydante, a montré que tous les extraits ont une forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH, un pouvoir réducteur important et un effet piègeur significatif du radical-cation ABTS+.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion en puits. Les extraits ont été testés sur six bactéries pathogènes pour l'être humain, cinq champignons phytopathogènes et une levure.

Il en ressort que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, la concentration du produit testé. Le résultat le plus intéressant est celui de l'extrait aqueux contre la bactérie *Bacillus cereus* (22 mm).

Pour l'activité antifongique, toutes les souches testées ont été résistantes vis-à-vis tous les extraits de la plante.

### Mots clés :

*Marrubium vulgare* L, métabolites secondaires, activité antioxydante, activité antimicrobienne, chélation de fer, dosage des polyphénols totaux et de flavonoïdes.