

N° d'ordre :

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

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

**Quantification des Polyphénols et des Flavonoïdes totaux
contenus dans les extraits de Marrubium vulgare L. et l'étude
de leurs activités biologiques**

Présenté par M^{lles}:

**AIT ABDESSLAM TAOUS
KHELIL TAOUS**

Soutenu publiquement, le 16/ 07/ 2019, devant le Jury composé de :

SELLAM	DJAMILA	MCB	UMMTO	Présidente
TALBI	OUARDA	MAA	UMMTO	Promotrice
ABDOUN	AMAR	PH.BIOLOGISTE	CHU M.NEDIR (TO)	Co-promoteur
IGHILAHORIZ	KARIMA	MCB	UMMTO	Examinatrice

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à Madame Talbi Oaurda, notre promotrice, pour avoir proposé ce thème et accepté de nous encadrer. Soyez assurée Madame, de toute notre gratitude et de notre profond respect.

Nous remercions également le docteur Abdoun Amar, notre Co -directeur de recherche pour s'être si gentiment proposé à nous co-encadrer et pour sa contribution aux travaux d'expérimentation.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères à Madame Sellam Djamila qui nous fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et de présider ce jury. Trouvez ici Madame, l'expression de notre profonde reconnaissance.

Toute notre gratitude à Madame Ighilahriz Karima, qui nous fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et de participer à ce jury. Trouvez ici Madame, l'expression de notre profonde reconnaissance.

Nous tenons aussi à remercier tous nos amis ainsi que tous ceux, qui de près ou de loin nous ont soutenu dans

la réalisation de ce mémoire dans les meilleures conditions.

Dédicace

Ce mémoire est dédié à mes parents, ma sœur Amira et mon frère Arezki, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

Merci d'avoir été là dans les moments de doute.

Merci pour toute la confiance que vous m'avez accordée.

K.Taous

Dédicace

Ce mémoire est dédié à mes parents, mes frères Salem et Mayass, mon fiancé Ahcène, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études.

Merci d'avoir été là dans les moments de doute.

Merci pour toute la confiance que vous m'avez accordée.

A .Taous

Liste des abréviations

Na₂CO₃: Carbonate de sodium.

MeOH-eau: hydrométhanolique.

EtOH-eau: hydroéthanolique.

H₃PW₁₂O₄₀: Acide phosphotungstique

H₃PMo₁₂O₄₀: Acide phosphomolybdique.

DPPH: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl

DMSO: Diméthylsulfoxyde

Mg EAG/g ES : mg équivalent en acide gallique par gramme d'extrait sec.

Mg EQ/g ES : mg équivalent en quercétine par gramme d'extrait sec.

Abs: Absorbance.

H%: Teneur en eau exprimée en pourcentage.

°C : Degré Celsius.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane.

I(%) : Pourcentage d'inhibition.

ATCC: American type culture collection.

DO: Densité optique.

UV-VIS : Ultraviolet-visible.

HPLC : La chromatographie en phase liquide à haute performance.

MH: Mueller-Hinton

Liste des figures

- Figure1** : Marrubium vulgare L 4
- Figure2** : Structure de la marrubiine 5
- Figure3** : Structure du marubéno1 5
- Figure4** : Structure de la prémarubiine 5
- Figure5** : Structure de base des flavonoïdes 9
- Figure6** : Structure de base des différentes classes de flavonoïdes 11
- Figure7** : Structure des tanins hydrolysables 12
- Figure8** : Structure des tanins condensés 12
- Figure9** : Acide hydroxybenzoïque12
- Figure10** : Acide hydroxycinnamique 13
- Figure11** : Structure de la coumarine 13
- Figure12** : Structure des stilbènes14
- Figure13** : Organigramme récapitulatif des étapes de l'extraction 18
- Figure14** : Schéma d'une chaîne d'HPLC 24
- Figure15** : Structure chimique du radical libre du DPPH et de sa forme réduite 25
- Figure16** : Taux d'humidité et de matière sèche du marrube blanc 29
- Figure17** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique 32
- Figure18** : Courbe d'étalonnage de la quercétine 33
- Figure19** : Chromatogramme HPLC de l'extrait MeOH-eau 35
- Figure20** : Chromatogramme HPLC de l'extrait EtOH-eau 35
- Figure21** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait aqueux 37
- Figure22** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait MeOH-eau 37
- Figure23** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait EtOH-eau 37
- Figure24** : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique 37
- Figure25** : Zone d'inhibition des trois extraits vis-à-vis de staphylococcus aureus 39

Figure26 : Zone d'inhibition des trois extraits vis-à-vis de *Escherichia coli*

39

Liste des tableaux

- Tableau 1:** Classification systématique du marrube blanc 3
- Tableau2:** Produits et équipements utilisés 16
- Tableau3:** Eléments constitutifs de l'HPLC 24
- Tableau4:** Souches bactériennes utilisées. 26
- Tableau5 :** Relation entre sensibilité du germe et taille du diamètre d'inhibition 28
- Tableau6:** Rendement des extraits secs des feuilles de marrube blanc
29
- Tableau7 :** Résultats du screening phytochimique 31
- Tableau8:** Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux 33
- Tableau9:** Temps de rétention des standards 36
- Tableau10:** Temps de rétention des standards présents dans les extraits
36
- Tableau 11:** Valeurs des IC50 des extraits secs et du standard 38

Sommaire

Introduction 1

Chapitre1 : Synthèse bibliographique

1. Informations sur le Marrubium vulgare L 3

- 1.1. Historique 3
- 1.2. Classification systématique de la plante 3
- 1.3. Description botanique 3
- 1.4. Origine et habitat 4
- 1.5. Culture et récolte 4
- 1.6. Composition chimique 4
- 1.7. Effets pharmacologiques 5
- 1.8. Usage traditionnel 6
- 1.9. Usage actuel et formes pharmaceutiques employées 7
- 1.10. Contre indications 7
- 1.11. Travaux antérieurs 7

2. Métabolites secondaires 8

- 2.1. Composés phénoliques 8
 - 2.1.1. Flavonoïdes 9
 - 2.1.2. Tanins 11
 - 2.1.3. Acides phénoliques 12
 - 2.1.4. Coumarines 13
 - 2.1.5. Lignanes 13
 - 2.1.6. Stilbènes 13

Chapitre2 : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal 15

- 1.1. Récolte et identification du matériel végétal 15
- 1.2. Séchage et broyage 15
- 1.3. Taux d'humidité de la plante 15

2. Réactifs et équipement utilisés 15

3. Extraction des composés phénolique 16

4. Rendement des extraits 19

5. Screening phytochimique des extraits 19

6. Dosage des composés phénoliques 21

- 6.1. Dosage des polyphénols totaux 21
- 6.2. Dosage des flavonoïdes totaux 22

7. Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance(HPLC) 23

8. Activités biologiques 25

8.1. Activité antioxydante 25

8.2. Activité antibactérienne 26

Chapitre3 : Résultats et discussion

1. Taux d'humidité du marrube blanc 29

2. Rendement des extraits 29

3. Résultat du screening phytochimique 30

4. Teneurs en composés phénoliques 32

5. Résultats de l'analyse HPLC 35

6. Activités biologiques 37

6.1. Activité antioxydante 37

6.2. Activité antibactérienne 39

Conclusion générale 41

Références bibliographiques

Glossaire

Annexe

Résumé

Le Marrubium Vulgare de la famille des lamiaceae, communément appelé marrube blanc est une plante herbacée vivace renommée pour ses propriétés thérapeutiques. Dans ce sens une étude phytochimique a été réalisé sur les extraits (aqueux, MeOH-eau, EtOH-eau) obtenus après macération des feuilles de marrube blanc récoltées dans la région de Bouira « ath laksar ».les activités antioxydante et antibactérienne ont été également déterminées.

Les tests phytochimiques ont montré la richesse des extraits hydroalcooliques en tanins et en flavonoïdes. La quantification des composés phénoliques a révélé que l'extrait MeOH-eau a la teneur la plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes totaux respectivement 2.212 ± 0.010 mg eq AG/g ES et 1.321 ± 0.004 mg eq QE /g ES .L'analyse qualitative par HPLC a pu confirmer ces résultats. Quant à l'activité antioxydante, elle a montré que l'extrait MeOH-eau est plus actif que les autres extraits. L'activité antibactérienne des trois extraits s'est révélée négative vis-à-vis des deux souches bactériennes testées Escherichia coli et Staphylococcus aureus.

Mots clés: Marrubium vulgare L., tests phytochimiques , polyphénols , flavonoides, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Abstract

The marrubium vulgare of the Lamiaceae family which is commonly called white horehound is a perennial herb known for its therapeutic properties. In this sense, a phytochemical study was carried out on the extracts (aqueous, MeOH-water, EtOH-water) obtained after maceration of the white horehound leaves harvested in the Bouira region "ath laksar" .The antioxidant and antibacterial activities were have also been determined. Phytochemical tests have shown the richness of hydroalcoholic extracts in tannin and flavonoids. Quantification of the phenolic compounds revealed that the MeOH-water extract had the highest content of polyphenols and total flavonoids respectively 2.212 ± 0.010 mg eq AG / g ES and 1.321 ± 0.004 mg eq EQ / g ES Qualitative analysis by HPLC was able to confirm these results. As for the antioxidant activity, it showed that the MeOH-water extract is more active than the other extracts. The antibacterial activity of the three extracts was negative with respect to the two bacterial strains tested Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

Key words: Marrubium vulgare L., phytochemical tests, polyphenols, flavonoids, antibacterial activity, antioxidant activity.

Introduction générale

Depuis l'antiquité l'intérêt pour les plantes médicinales reste vivace dans la médecine traditionnelle. Ainsi, au fil des siècles, les sociétés ont su développer ce savoir faire populaire en savoir scientifique pour l'amélioration de la santé humaine [1].

De par la richesse de sa flore représentée par environ 3000 espèces et 1000 genres, l'Algérie possède un véritable réservoir phytogénétique [2].

La valorisation des plantes médicinales représente un potentiel économique énorme pour l'industrie pharmaceutique et parapharmaceutique.

Les végétaux sont constitués par un large éventail de composés, entre autres les métabolites secondaires dont les composés phénoliques représentent la classe la plus importante.

En raison de toutes leur potentialités notamment leur caractère antioxydant et antibactérien, les composés phénoliques suscitent aujourd'hui un intérêt considérable dans le domaine de la chimie et de la médecine [3].

Notre choix s'est porté sur le marrube blanc pour sa grande richesse en composés phénoliques [4].

Si cette plante est largement utilisée dans la médecine traditionnelle, on en sait très peu sur ses composants et leur mode d'action pharmacologique.

Les premières recherches ont permis d'isoler et d'identifier de nombreux métabolites secondaires et les essais pratiqués sur les animaux ont pu apporter la preuve que le marrube blanc présente un intérêt certain dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies. Cependant, les essais cliniques en cours sur le modèle humain n'ont pas encore pu confirmer cette hypothèse [5].

Peut-on dire que l'usage traditionnel du marrube blanc serait lié à la quantité de polyphénols qu'il contient et peut-on établir un lien scientifique entre son utilisation et les effets thérapeutiques plébiscités par la médecine traditionnelle? Tel est l'objectif recherché dans notre mémoire, lequel s'articule autour de la quantification des polyphénols et des flavonoïdes totaux et l'étude de deux de leurs activités biologiques correspondantes à savoir l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne.

Pour ce faire nous avons structuré notre travail comme suit:

Une première partie où nous avons présenté une approche bibliographique sur le marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et les principaux métabolites secondaires qui existent dans les plantes médicinales en général, notre intérêt s'est porté particulièrement sur les composés phénoliques.

La deuxième partie porte sur le travail expérimental axé sur l'étude phytochimique des extraits hydroalcooliques et aqueux des feuilles du marrube blanc ainsi que leurs activités antioxydante et antibactérienne correspondantes.

Dans la troisième partie nous avons présenté et discuté les résultats obtenus.

Une conclusion générale vient ensuite clôturer notre mémoire.

1. Informations sur le *Marrubium vulgare* L.

1.1. Historique

L'appellation marrube serait dérivée de l'Hébreux et signifierait suc amer, l'appellation anglaise horehound serait quant à elle apparentée au dieu Egyptien Horus.

Le marrube blanc de par sa richesse en composés phénoliques, était couramment employé en médecine traditionnelle dans de nombreuses civilisations, notamment dans l'Egypte ancienne et la Grèce antique où il était considéré comme le remède spécifique des affections de l'appareil respiratoire ou encore comme insectifuge et antidote contre plusieurs poisons [5].

1.2. Classification systématique de la plante

Le **tableau 1** énumère la systématique du marrube blanc.

Tableau 1: Classification systématique du marrube blanc [6].

Règne	Végétal
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
genre	<i>Marrubium</i>
Espèce	<i>M. vulgare</i>
Nom binomial	<i>M. vulgare</i>
Nom vernaculaire	Merrioua

1.3. Description botanique

Le *Marrubium vulgare* L. (**figure 1**) est une plante herbacée pérenne, d'aspect blanchâtre. Elle présente une légère ressemblance avec la menthe. De 30 à 80 cm de hauteur, ses tiges quadrangulaires sont blanches et cotonneuses. Ses feuilles duveteuses, ovales et arrondies, ridées et blanchâtres sont opposées deux à deux et à leurs aisselles poussent de petites fleurs blanches à corolle [5].

Elle exhale une odeur forte, aromatique et légèrement musquée, sa saveur est à la fois chaude et amère [7].



Figure1: Marrubium Vulgare L.

1.4. Origine et habitat

C'est une plante cosmopolite qui est répandue aussi bien en Europe, qu'en Afrique du nord et en Asie et également sur tout le continent américain [8].

On la trouve dans les bords des chemins, dans les prés secs, les décombres et les terrains vagues [5].

1.5. Culture et récolte

Elle se cultive facilement, plus particulièrement sur un sol pauvre et sec et nécessite une forte exposition au soleil.

Sa récolte se fait entre Juin et Septembre [5].

1.6. Composition chimique

Le Marrubium vulgare L. est une plante riche en principes actifs. En effet, des recherches phytochimiques ont signalé la présence de plusieurs métabolites secondaires notamment :

- ✓ des traces d'huiles essentielles ;
- ✓ des saponines;
- ✓ des stéroïdes;
- ✓ des flavonoïdes;
- ✓ des phénylpropanoïdes;
- ✓ des tanins;
- ✓ des diterpènes, notamment la marrubiine (**Figure2**) et le marrubénol (**figure3**) [9].

Figure2 : Structure de la marrubiine.

Figure3 : Structure du marrubénol.

Le principe actif principal de cette plante a été identifié en tant que marrubiine[4] , elle est présente à des concentrations élevées dans les parties aériennes où elle est majoritaire [9]. Elle se présente en partie sous la forme de son précurseur préfuranique, la prémarrubiine (**figure4**) [10].

Figure4 : Structure de la prémarrubiine.

1.7. Effets pharmacologiques

Les métabolites secondaires du marrube blanc présentent de nombreuses propriétés pharmacologiques [8] notamment :

1.7.1. Anti-inflammatoire

La marrubiine et les phénylpropanoïdes présents dans la plante seraient à l'origine des effets anti-inflammatoires et auraient des propriétés expectorantes et fluidifiantes.

La présence d'huile essentielle pourrait éventuellement avoir une action sur la toux [10].

1.7.2. Antidiabétique

La richesse de l'extrait aqueux en flavonoïdes connus dans la littérature comme agents antidiabétiques pourraient être à l'origine de l'effet antidiabétique du marrube blanc [10].

1.7.3. Antioxydant

La richesse du marrube blanc en glycosides de phénylpropanoïdes pourrait expliquer ses propriétés antioxydantes. En effet, l'effet antioxydant des glycosides de phénylpropanoïdes est largement décrit [5].

1.7.4. Antibactérien

D'après ce qui a été annoncé par la littérature, il ressort que les flavonoïdes et les tanins contenus dans le marrube blanc possèdent un pouvoir antibactérien important sur les germes multi résistants responsables des maladies infectieuses [2].

1.8. Usage traditionnel

En vue des nombreuses propriétés que possède cette plante, les usages traditionnels qui en découlent sont nombreux. Elle est utilisée pour le traitement de divers maux.

La plante est utilisée en usage interne, principalement sous forme de décoction ou infusion comme expectorant ou pour traiter les rhumes. En usage externe la plante hachée est appliquée en cataplasme sur le front contre la fièvre ou mâchée contre les maux de dents [10].

En Algérie, le marrube blanc est utilisé en médecine traditionnelle contre la diarrhée, le diabète, le rhumatisme, le rhume et les douleurs respiratoires [7].

Il est aussi utilisé dans le traitement des dyspepsies et la perte d'appétit [11].

1.9. Usage actuel et formes pharmaceutiques employées

Le marrube blanc est à ce jour toujours employé dans ce qu'on appelle communément les remèdes de grands-mères. Son utilisation n'est pas très répandue dans l'industrie pharmaceutique.

Toutefois, le marrube est utilisé en complément dans les traitements de la toux, des affections bronchiques aiguës bénignes et/ou pour faciliter le confort respiratoire.

On le retrouve sous forme de **gélules** (Arkogélules marrube blanc ®), d'**infusions** (Marrube blanc COOPER ®, Marrube blanc FLORINA), de **teintures mères** (Ferrier marrubium vulgare ®, Lehning Marrubium vulgare ®) et d'**extrait fluide** (Phytoest marrube blanc ®) [5].

1.10. Contre-indications

L'utilisation de cette plante est cependant contre-indiquée chez la femme enceinte. En effet, selon les chercheurs, cette plante serait capable de stimuler l'utérus et d'avoir une action

abortive. Il est aussi contre indiqué chez les enfants de moins 12 ans et les femmes qui allaitent [5,10].

Dans tous les cas, la présence de diterpènes furaniques incite à une grande prudence dans son utilisation [2].

1.11. Travaux antérieurs

Plusieurs recherches ont été menées autour des propriétés du marrube blanc.

Au cours d'une de ces études, quatre glycosides de phénylpropanoïdes ont été isolés par **Martin-Nizard F. et al.** : Les verbascoside, forsythoside B, arénarioside et ballotétroside. Ils ont révélé par la suite avoir une activité antioxydante.

En outre il a été démontré par **Newall C.A. et al.** que la marrubiine possédait des propriétés expectorantes.

Le marrubénol obtenu après une réaction de réduction à partir de la marrubiine, fut isolé pour la 1ère fois par **Fulke J. et al.** .

L'effet hypoglycémiant d'un extrait hydro alcoolique de marrube blanc a été démontré sur des lapins et sur des rats, respectivement par **Román R.R. et al.** et **Novaes A.P. et al.** Ainsi, les résultats obtenus sur les lapins montrent une réduction de la glycémie de l'ordre de 25,8%. Pour le modèle humain, une étude menée au Mexique par **Herrera-Arellano A. et al.** a évalué l'effet d'un extrait de feuilles de marrube blanc sur des patients diabétiques en comparaison à une autre plante. Cette dernière a réduit cliniquement et statistiquement la glycémie, quant au marrube blanc, il n'y a pas eu de différence significative entre avant et après la prise [5].

Par ailleurs des chercheurs ont isolé quatre esters phénylpropaniques du marrube blanc: l'acide cafféoyl-malique, l'actéoside, le forsythoside B, l'arénarioside, le ballotétroside. Ils ont ensuite exploré in vitro leur capacité d'inhibition des cyclo-oxygénase 1 et 2.

Une étude sur l'activité antibactérienne d'un extrait méthanolique du *Marrubium vulgare* L. a révélé que l'extrait avait un effet dose dépendant contre plusieurs bactéries [10].

2. Métabolites secondaires

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est

cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent.

Les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Ils ne participent pas directement aux processus vitaux des cellules, mais assurent néanmoins des fonctions écologiques importantes.

On peut classer les métabolites secondaires en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [12].

Dans notre mémoire notre intérêt porte exclusivement sur les composés phénoliques.

2.1. Composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques sont une appellation générique qui désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement [13].

A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées. On peut distinguer les différentes classes de composés phénoliques en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base :

- ✓ les phénols simples et les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques);
- ✓ les flavonoïdes qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée;
- ✓ les tanins et lignines;
- ✓ et plus rares, les coumarines et les stilbènes [14].

2.1.1. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation de gènes et dans le métabolisme de croissance [15].

2.1.1.1. Structure

Tous les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- α -pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- α -pyrone [16].

Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes [17].

2.1.1.2. Classification des flavonoïdes

2.1.1.2.1. Les flavonols

Ce sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine. Ces derniers possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres.

2.1.1.2.2. Les flavones

Ils sont abondants chez les plantes supérieures sous les deux formes aglycones ou glycosylées. Certains sont responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets. Ils ont des activités physiologiques remarquables, notamment des propriétés antimicrobiennes et antivirales.

2.1.1.2.3. Les flavanones

Ils ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturations au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont fréquemment présents chez les Myrtacées (Wollenweber *et al.* 2000). Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les

agrumes. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hésperidine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron.

2.1.1.2.4. Les isoflavones

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, glycosylées ou non. On les retrouve aussi dans les légumineuses.

2.1.1.2.5. Les flavanols

Les flavanols existent sous forme de monomères : l'unité la plus simple est la catéchine, ou polymérique appelés proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme. Le chocolat et le thé restent les principales sources de ce composé.

2.1.1.2.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin) [14].

Flavonols	Flavanones
flavones	Flavonols

Isoflavones	anthocyanidines
-------------	-----------------

Figure 6 : Structure de base des différentes classes de flavonoïdes.

2.1.2. Tanins

Les tanins sont caractérisés par une saveur astringente et se trouvent dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [18]. On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétique, tanins hydrolysables (**figure 7**) et tanins condensés (**figure 8**) [19].

Figure 7: Structure des tanins hydrolysables.

Figure 8: Structure des tanins condensés.

2.1.3. Acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3):

- ✓ les acides hydroxybenzoïques, dont les plus répandus sont l'acide cinnamique, l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique (**figure 9**), base de médicaments connus.
- ✓ les acides hydroxycinnamiques, dont les plus abondants sont l'acide ρ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique (**figure 10**) [14].

R1=R4=H, R2=OCH₃, R3=OH

Acide vanillique

R1= H, R2=R3=R4 =OH

Acide gallique

R1=OH, R2=R3=R4=H

Acide salicylique

Figure 9 : Acide hydroxybenzoïque [20].

R1=R3=H, R2=OH

Acide p-coumarique

R1= R2=OH, R3 =H

Acide caféique

R1=OCH₃, R2=OH, R3=H

Acide férulique

Figure10 : Acides hydroxycinnamiques [20].

2.1.4. Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C₆-C₃, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- δ -pyrone et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin [3].

Figure 11 : Structure de la coumarine.

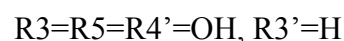
2.1.5. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles [13].

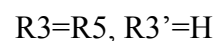
2.1.6. Stilbène

Les stilbènes ont une structure en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène.

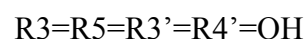
Ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides [21].



Trans resvératrol



Pinosylvine



Picéatannol

Figure12: Structure des stilbènes [17]

1. Matériel végétal

1.1. Récolte et identification du matériel végétal

La plante a été récoltée au cours du mois de Novembre dans la région de Bouira: "ath laksar". L'identification du matériel végétal a été faite par le Professeur MEDDOUR Rachid, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1.2. Séchage et broyage

La plante a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Le matériel végétal (les feuilles), une fois séché est réduit en poudre dans un mixeur, puis stocké dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

Le matériel végétal choisi est constitué de feuilles de *Marrubium vulgare* L. puisque c'est à leur niveau que se trouve la majorité des principales substances actives.

1.3. Taux d'humidité de la plante

La teneur en humidité est déterminée par perte à la dessiccation. Cette dernière a été réalisée par évaporation de 3g de matière végétale à 100 C° dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique, jusqu'à ce que le poids devienne pratiquement constant [21].

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

Où :

H% : teneur en eau exprimée en pourcentage.

M₁ : poids de la plante humide.

M₂ : poids de la plante sèche.

2. Réactifs et équipements utilisés

La liste des réactifs et des équipements utilisés est mentionnée dans le **tableau2**.

Tableau2: produits et équipements utilisés.

Produits	Equipements	
	Désignation	Marque
Méthanol (CH ₃ OH) Ethanol (C ₂ H ₅ OH) Iodure de potassium (KI) Iode (I)	Balance analytique	Denver
Chlorure de mercure (HgCl ₂) Chlorure de fer (FeCl ₃) Acide chlorhydrique (HCl) Tournure de magnésium (Mg)	Balance technique	Kern
Anhydride Acétique (C ₄ H ₆ O ₃) Chloroforme (CHCl ₃) Acide sulfurique (H ₂ SO ₄) Ammoniaque (NH ₄ OH)	Spectrophotomètre UV-VIS	ZUZI
Nitrite de sodium (NaNO ₂) Chlorure d'aluminium (AlCl ₃) Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃) Chlorure de sodium (NaCl)	HPLC	SHMADZU LC 20
Hydroxyde de sodium (NaOH) Réactif de Folin Acide gallique Quercétine Acide ascorbique DPPH	Rota vapeur	Laborota 4001- efficient heildolph

3. Extraction des composés phénoliques

3.1. Extraction par macération à froid

Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables de composés phénoliques. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction de ces derniers.

Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante.

Ayant ciblé les composés phénoliques dans notre étude, la macération à froid a été employée comme étant la méthode la plus appropriée à l'extraction de ces derniers. [23].

Elle consiste à la mise en contact du matériel végétal avec un solvant approprié, avec ou sans agitation à T° ambiante pour une durée déterminée. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction. L'intérêt de la macération est généralement la conservation des principes actifs durant le procédé [24].

Nous avons ainsi procédé à trois extraction avec 3 solvants différents à polarité croissante (extraction hydroéthanolique, extraction hydrométhanolique et extraction aqueuse).

3.2. Mode opératoire

Le volume du solvant d'extraction doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction. Les ratios optimums liquide/solide les plus souvent cités dans la littérature scientifique, sont généralement situés entre 1/10 et 1/50 [25].

Nous avons donc choisi le ratio 1/10(5g dans 50 ml) pour toutes les extractions effectuées.

Ainsi pour l'extrait aqueux, 5g de matière végétale (broyat) obtenue précédemment ont été mise à macérer avec 50 ml d'eau distillée pendant 24H, avec une agitation préalable d'une heure.

Cette opération est répétée 3 fois soit un renouvellement de solvant après chaque filtration et ce, toutes les 24h avec une agitation préalable d'une heure à chaque fois, ceci permet d'extraire le maximum de substances actives.

Les 3 filtrats obtenus sont mélangés et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Les extraits hydroalcooliques (hydrométhanolique et hydroéthanolique)sont préparés de la même manière en remplaçant l'eau distillée par un mélange alcool-eau (méthanol-eau ; éthanol-eau) à 70% d'alcool [3].

L'organigramme présenté dans la **figure13** résume les étapes suivies pour effectuer les différentes extractions.

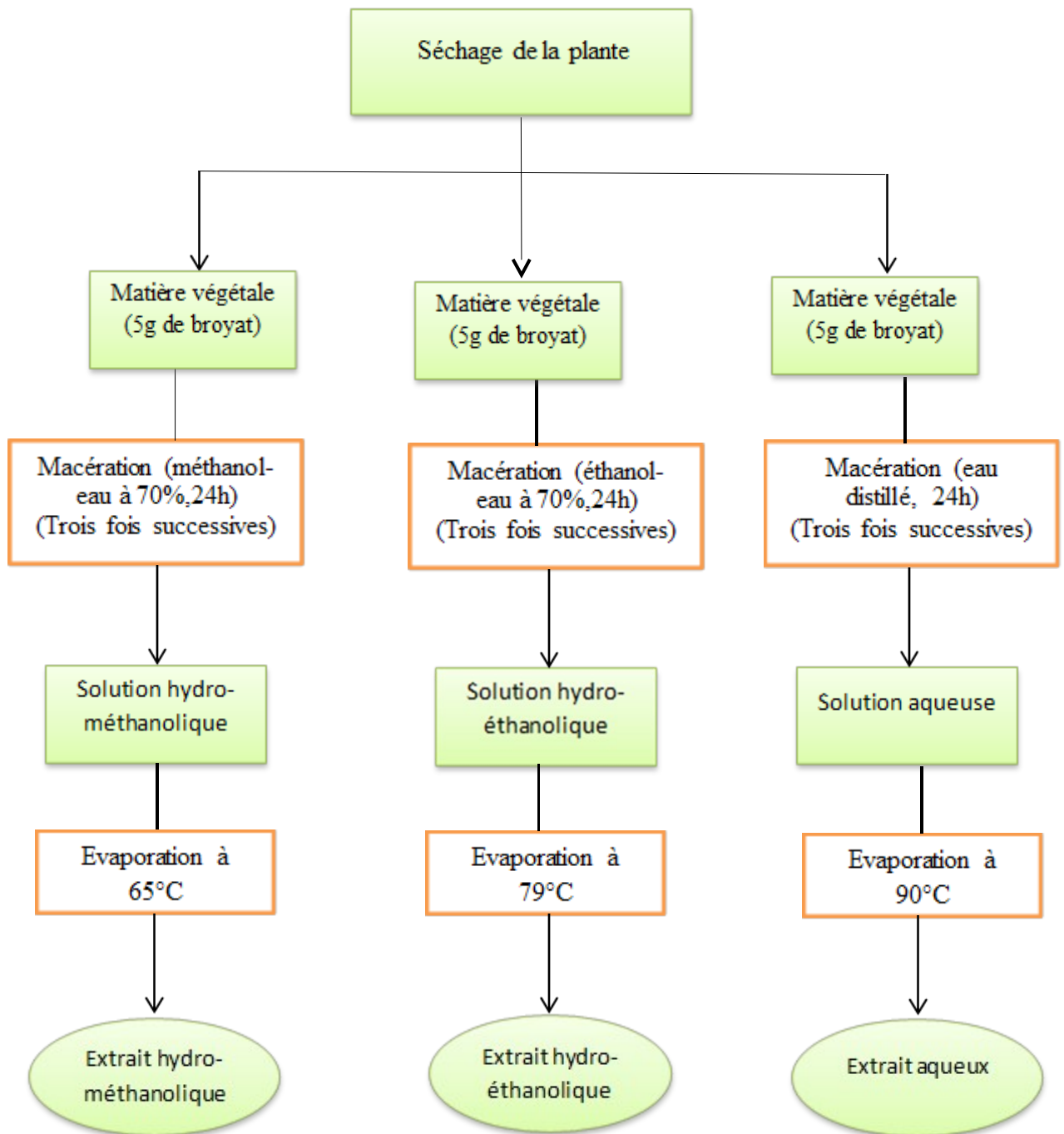


Figure13 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction

4. Rendement des extraits

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait sec obtenu après évaporation et celle de la plante sèche (broyat) [3].

Le rendement en extrait sec est donc calculé selon le rapport suivant :

$$R (\%) = \frac{M_{ext}}{M_{ech}} \times 100$$

Où :

R : le rendement en %;

M_{ext} : masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

M_{ech} : masse sèche de l'échantillon végétal en g.

5. Screening phytochimique des extraits

Ce sont des techniques qui permettent de d'identifier les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal . Ces tests sont basés sur des réactions de précipitation et de complexation avec formation de complexes insolubles et colorés [26].

Les tests phytochimiques ont été faits sur les trois extraits aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau.

Les tests effectués pour détecter les différents composés sont énumérés ci –dessous :

5.1. Détection de l'amidon

Le test effectué consiste à : chauffer 5 ml de chaque extrait avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à ébullition ; ajouter le réactif d'amidon .Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue violacée [27].

5.2. Détection des saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse .Leur détection est réalisée en ajoutant un volume d'eau à 2 ml de chaque extrait. Après agitation, le mélange est laissé au repos pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée comme suit :

Pas de mousse = test négatif;

Mousse de moins de 1cm = test faiblement positif;

Mousse de 1-2cm = test positif;

Mousse de plus de 2cm = test très positif [28].

5.3. Détection des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1 ml de chaque extrait 1ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl_3 diluée 10 fois.

L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins [29].

5.4. Détection des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5 ml de chaque extrait avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5g de tournure de magnésium [28].

La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes.

5.5. Détection des alcaloïdes

Dans deux tubes à essai, introduire 1 ml de chaque extrait. Acidifier le milieu par quelques gouttes d' HCl, et ajouter quelques gouttes du réactif de Mayer dans le premier tube, et quelques gouttes du réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence d'alcaloïdes [29].

5.6. Détection des stérols et triterpènes : La réaction de Lieberman Burchardt

Dans un tube à essai, introduire 5 ml de chaque extrait, ajouter 5ml d'anhydride acétique, 5ml de chloroforme et 1 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré dans la paroi du tube sans agiter et laisser reposer 20 min.

La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides, et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes [30].

5.7. Détection des terpénoïdes (Test de Slakowski)

Dans un tube à essai, ajouter à 2,5ml de chaque extrait 0,4ml de chloroforme et 0,6ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes [31].

5.8. Détection des glycosides cardiaques

1 ml de chaque extrait a été dissous avec 2 ml de chloroforme, l'apparition d'une coloration brun-rougeâtre après l'ajout de H_2SO_4 indique la présence des glycosides cardiaques.

5.9. Détection des anthocyanes

Les anthocyanes sont révélés par l'ajout à 1 ml de chaque extrait de 3 ml de H_2SO_4 concentré et 1 ml de NH_4OH . Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu en milieu basique, on peut conclure qu'il y a présence des anthocyanes [28].

5.10. Détection des stéroïdes

Dans un tube à essai, on introduit 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml de chaque extrait, auxquels on ajoute 0,5 ml de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive [28].

6. Dosage des composés phénoliques

6.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu total en polyphénols a été estimé selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu.

6.1.1. Principe

L'ensemble des composés phénoliques des trois extraits (aqueux, MeOH-eau, EtOH-eau) est oxydé par le réactif de Folin. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, et qui entraînent à leur tour la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue. La couleur bleue produite absorbe au voisinage de 765 nm et est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

La comparaison de l'absorbance observée par rapport à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en polyphénols [3].

6.1.2. Mode opératoire

A chaque 200 µl d'extrait, 1 ml de solution de Folin Ciocalteu est ajouté, suivi par l'addition de 0,8 ml d'une solution de carbonate de sodium (7,5%). Après 30 minutes d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre [32].

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires utilisant l'acide gallique comme standard (des solution filles à des concentrations allant de 0.01 mg/ml à 0.08 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'ES) selon la formule suivante :

$$T_p = \frac{C_0 \times V_0 \times F}{M_{ext}}$$

Où :

T_p : la teneur en polyphénols en mg EAG/ g d'extrait brut.

m_{ext} : la masse d'extrait solubilisé pour préparer la solution mère en mg.

C_0 : la concentration de l'extrait obtenue à partir de la courbe d'étalonnage en µg EAG/ml.

V_0 : le volume final de la solution (volume des réactifs +le volume de la solution fille) en ml.

F : le facteur de dilution= V_m / V_f dont V_m est le volume de la solution mère en ml et V_f est le volume de la solution fille prélevé en ml [33].

6.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes a été estimée selon la méthode colorimétrique utilisant les solution incolores de nitrite de sodium ($NaNO_2$) et chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

6.2.1. Principe

L'ensemble des flavonoïdes contenus dans les extraits (aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau) est oxydé par ces réactifs ce qui entraîne la formation d'un complexe rose qui absorbe au voisinage de 515 nm.

La comparaison de l'absorbance observée par rapport à celle obtenue par un étalon de quercétine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes [34].

6.2.2. Mode opératoire

1ml d'extrait (aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau) est mélangé à 4 ml d'eau distillée et 300 μ L d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après 6 minutes, 300 μ L de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) à 10% sont additionnés. Après 6 minutes d'incubation, 4 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% sont incorporés et le volume final est complété à 10 ml avec de l'eau distillée. L'ensemble est laissé au repos pendant 15 minutes. La lecture se fait à 515 nm contre un blanc [26].

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine comme standard (avec des solutions fille de concentration allant de 0.01 mg/ml a 0.05 mg/ml).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'ES).

7. Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

7.1. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [34].

Le schéma général d'une chaîne HPLC est représenté dans la **figure14**.

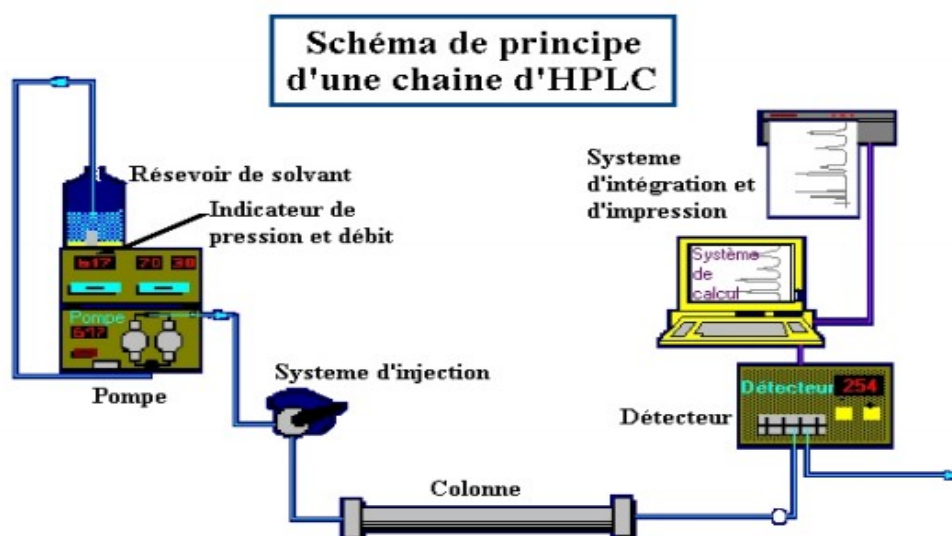


Figure 14 : schéma d'une chaîne d'HPLC

7.2. Mode opératoire

Les extraits à analyser (MeOH-eau et EtOH-eau) ont été dilués dans le méthanol, filtrés puis injectés à un volume de 10 μl . Le but de cette analyse dans notre étude est qualitative.

Le **tableau 3** représente les éléments constitutifs de l'appareil HPLC utilisé ainsi que leur spécification.

Tableau3: Eléments constitutifs de l'HPLC.

Appareillage		Spécification
Appareil HPLC (SHIMADZU LC 20)	Colonne	C18
	Pompe	LC20AT
	Injecteur automatique	SIL20A
	Contrôleur	CBM-20
	Compartiment de la colonne	CTO-20A
	Détecteur	Détecteur spectrophotométrique
	Logiciel d'exploitation	LC-solution

8. Activités biologiques

8.1. Activité antioxydante

8.1.1. Principe

La molécule de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH[•] est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène antioxydante, il y a formation de la forme réduite (**Figure15**). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm.

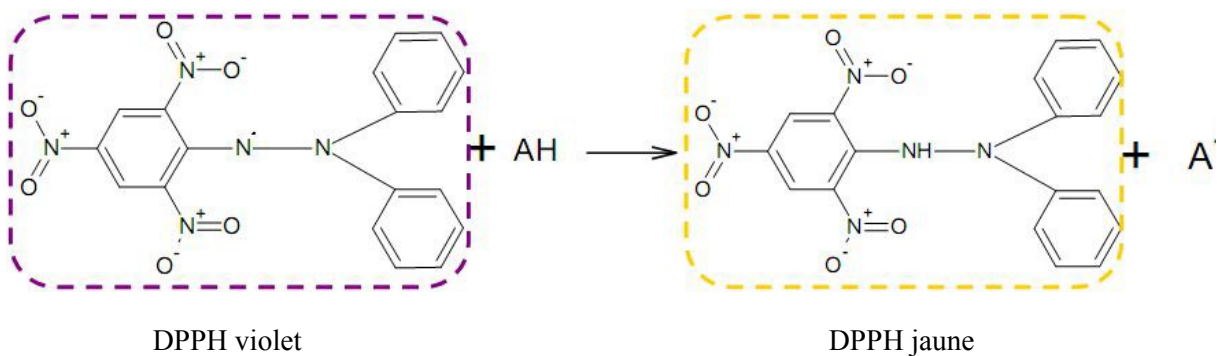


Figure 15 : Structure chimique du radical DPPH[•] et de sa forme réduite.

8.1.2. Mode opératoire

L'effet piègeur ou le pouvoir antiradicalaire des extraits (aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau) des feuilles de marrube blanc vis-à-vis du radical DPPH[•] est évalué selon la méthode suivante :

Chaque extrait a subi trois dilutions avec du méthanol afin d'obtenir trois concentrations différentes (15 ;10 ; 5 mg/ml) . Quant à la solution de DPPH[•], elle est préparée en solubilisant 1 mg de DPPH[•] dans 50ml de méthanol.

Un volume de 50µL de chaque solution d'extrait de chacune des trois concentrations est ajouté à 2ml de la solution de DPPH[•] Le mélange est secoué énergiquement et laissé pendant 30mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance du DPPH[•] est déterminée par spectrophotométrie visible à 517nm.

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µL de méthanol avec 2 ml de la solution méthanolique de DPPH^{*} puis laissé à T° ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30 mn.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard qui est l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les extraits. Plusieurs concentrations de solution d'acide ascorbique ont été testées.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique [36].

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%)

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Les valeurs des concentrations inhibitrices nécessaires pour le piégeage et la réduction de 50% de moles du radical libre DPPH^{*} (IC₅₀) sont calculées graphiquement par les régressions exponentielles des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande [14].

8.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de nos extraits aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau a été déterminée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Dans cette méthode, on utilise des disques de papier wattman imprégnés d'extraits à tester et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm [36].

8.2.1. Souches bactériennes utilisées

Deux souches bactériennes ont été utilisées: *Escherichia coli* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC (**tableau4**).

Tableau4: souches bactériennes utilisées.

Famille	Genre et espèce	gram
Enterobacteriacées	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	Négatif
Staphylococcacées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Positif

8.2.2. Milieu de culture utilisé

Nous avons utilisé un milieu de culture : Gélose Mueller Hinton.

8.2.3. Préparation du milieu de culture

Faire couler dans une zone stérile environ 20ml de gélose MH dans des boites de pétri et laisser à T° ambiante jusqu'à la solidification du milieu.

8.2.4 Préparation des suspensions microbiennes

A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. On peut utiliser un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes.

Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à une DO de 0.08 à 0.10 lu à 625 nm.

8.2.5. Ensemencement des boites de pétri

On imbibe un écouvillon stérile de la suspension bactérienne puis on l'essore en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée.

8.2.6. Préparation des extraits de marrube blanc

Les solutions des extraits sont préparées en diluant 51.2 mg de chaque extrait sec dans du DMSO.

8.2.7. Mode opératoire

Un disque de papier wattman imprégné de chaque extrait à tester est placé sur le milieu MH préalablement inoculée avec la souche, le produit diffuse radialement du disque dans la gélose en formant ainsi un gradient de concentration. Après un temps d'incubation à 37°C, la sensibilité a été évaluée en mesurant le diamètre d'inhibition. Il se forme une zone ou un halo autour du disque. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible (**tableau5**). Cette zone claire ou halo montre l'inhibition voire même la destruction du germe et évalue l'efficacité du produit testé.

Tableau5 : relation entre la sensibilité du germe et la taille du diamètre d'inhibition [37].

Taille du halo d'inhibition	Résultat
Diamètre inférieur ou égal 8 mm	La sensibilité du germe est nulle
Diamètre compris entre 8 et 14 mm	La sensibilité du germe est limitée
Diamètre compris entre 14 et 20 mm	La sensibilité du germe est moyenne
Diamètre supérieur ou égal à 20 mm	Le germe est très sensible

1. Taux d'humidité du marrube blanc

Le marrube blanc s'avère être riche en eau, son taux d'humidité s'élève à 73.24%. (figure 16)

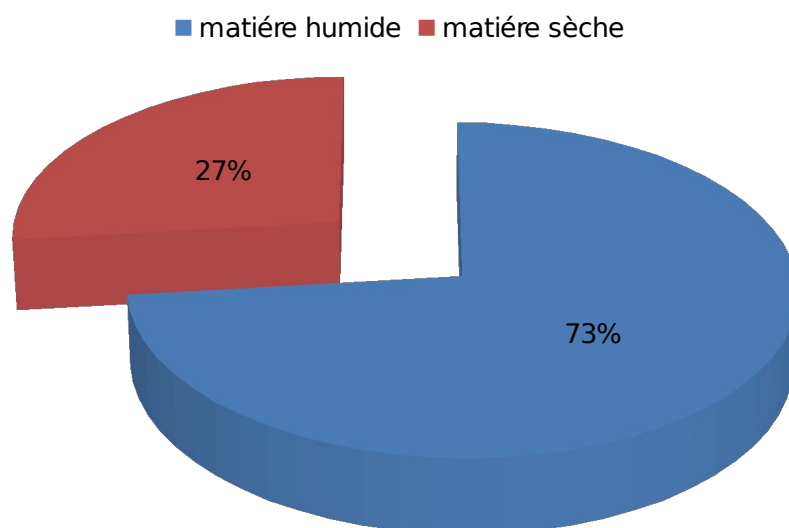


Figure16 : Taux d'humidité et de matière sèche du marrube blanc.

2. Rendements des extraits

2.1. Détermination des rendements

Dans cette étude, les rendements des extraits aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau ont été déterminés par rapport à 5 g de matière végétale (broyat).

Les résultats de cette manipulation sont représentés dans le **tableau6**

Tableau6 : Rendement des extraits secs des feuilles de marrube blanc.

Extraits bruts	Masse de l'extrait sec (g)	Rendement (%)
Extrait aqueux	1.88±0.228	37.73±4.560
Extrait MeOH-eau	1.13±0.058	22.73±1.157
Extrait EtOH-eau	1.46±0.082	29.2±1.655

2.2. Discussion

Nous avons obtenu des rendements plus ou moins acceptables, en effet Le solvant a été renouvelé 3 fois car dans le cas de la macération le solvant utilisé pour l'extraction peut arriver à un certain degré de saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé. Ces rendements varient considérablement.

L'extrait aqueux donne clairement le meilleur rendement (37.73 ± 4.560 %) suivi par l'extrait EtOH-eau et l'extrait MeOH-eau avec des rendements respectifs de 29.2 ± 1.655 % et de 22.73 ± 1.157 %.

Par ailleurs le rendement d'extraction est tributaire de plusieurs facteurs qui peuvent influencer les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et le degré d'agitation [3].

La quantité de molécules extraite dans l'eau est supérieure aux autres solvants .Ceci peut s'expliquer par le fait que l'eau soit un solvant fortement polaire connue pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques comme les glucides et les protéines [39].

Néanmoins, l'utilisation d'un mélange hydroalcoolique comme solvant donne des résultats satisfaisants dans un processus d'extraction [3].

3. Résultat du screening phytochimiques

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur l'extrait aqueux, l'extrait MeOH-eau et l'extrait EtOH-eau des feuilles de marrube blanc sont reportés dans le **Tableau 7**.

Tableau7 : Résultats du screening phytochimique.

Tests phytochimiques		Extraits des feuilles du marrube blanc		
Métabolites secondaires	Réactifs utilisés	Extrait aqueux	Extrait hydrométhanolique	Extrait hydroéthanolique
Flavonoïdes	Mg ⁺⁺	+	+++	++
Tanins	FeCl ₃	+	+++	++
Stérols et tritetrpène	Réaction de Lieberman et Burchardt	-	-	-
Amidon	NaCl	-	-	-
Saponosides	Test de mousse	+	+	+
Anthocyanes	H ₂ SO ₄ +NH ₄ OH	-	-	-
Glycosides cardiaque	Chloroforme+ H ₂ SO ₄	-	-	-
Terpenoides	Test de Slakowski	+	+	+
Alcaloïdes	Mayer	-	-	-
	Wagner	-	-	-

Les résultats obtenus ont été évalués comme suit :

+++ : Fortement positif ;

++ : Moyennement positif ;

+ : Faiblement Positif ;

- : Négatif.

Les résultats obtenus des tests phytochimiques, des différentes extraction de la partie aérienne(feuille) du marrube blanc , ont révélé la forte présence des tanins et des flavonoïdes dans les extraits hydro-méthanolique et hydro-éthanolique et leur faible présence dans l'extrait aqueux. Quant aux terpenoïdes et saponosides, il sont présents à des proportions égales.

On a constaté l'absence de l'amidon, des alcaloïdes, des glycosides cardiaques, des stérols et triterpènes dans tous les extraits.

4. Teneur en composés phénoliques

4.1. Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux

La concentration des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans les trois extraits(aqueux,MeOH-eau et EtOH-eau) a été calculée à partir des courbes d'étalonnage de l'acide gallique (**figure17**) et de la quercétine (**figure18**) et cela via les équations linéaires $y = 10.02x$ et $y=12.14x$. Ces concentrations ont été rapportées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg éq AG/g ES) pour les polyphénols et en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (éq mg QE/g ES) pour les flavonoïdes.

Les résultats sont indiqués dans le **tableau 8**.

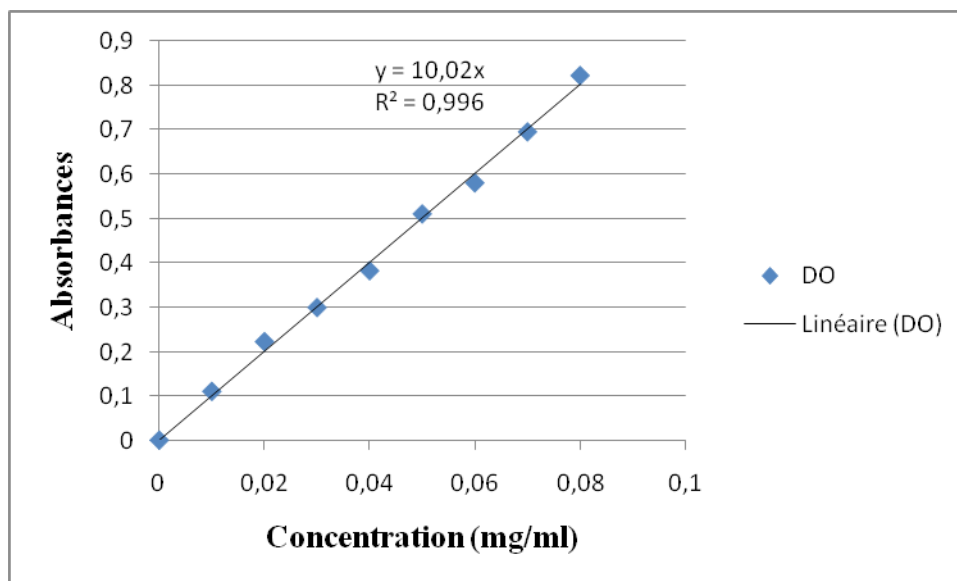


Figure17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

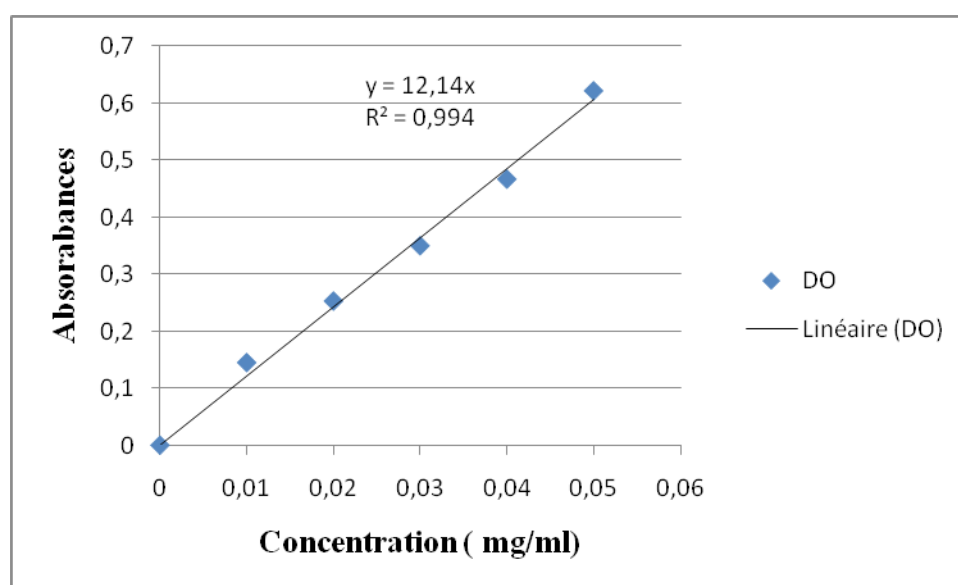


Figure18: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Tableau 8: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

Extrait sec (feuilles de marrube blanc)	Teneur en polyphénols totaux (mg éq AG /g ES)	Teneur en flavonoïdes totaux (mg éq QE /g ES)
Extrait aqueux	0.947±0.0025	0.767±0.024
Extrait MeOH-eau	2.212±0.010	1.321±0.004
Extrait EtOH-eau	1.988±0.006	1.290±0.018

4.2. Discussion

Les résultats présentés dans le **tableau8** montrent que les polyphénols sont présents dans tous les extraits à des concentrations variables.

Nous constatons que l'extrait MeOH-eau est le plus riche en polyphénols (**2.212±0.010mg eq AG/g ES**) suivi de l'extrait EtOH-eau qui présente une valeur assez proche (**1.988±0.006mg eq AG/g ES**) de celle obtenue avec l'extrait MeOH-eau et enfin la plus faible teneur est observé pour l'extrait aqueux (**0.947±0.0025 mg eq AG/g ES**).

Cependant, bien que le dosage par la méthode utilisant le réactif de Folin soit simple et nécessite peu de réactifs [3]. Le réactif de Folin-Ciocalteu ne réagit pas spécifiquement avec les composés phénoliques; il peut également être réduit par un certain nombre de composés non phénoliques, par exemple la vitamine C, le Cu (II), etc. La réaction exacte du réactif avec l'espèce réductrice n'est pas connue. Ce composé donne donc une évaluation brute de tous les composés de l'extrait [40].

Concernant les flavonoïdes, les extraits MeOH-eau et EtOH-eau présentent les teneurs les plus élevées respectivement 1.321 ± 0.004 mg éq QE /g ES et 1.290 ± 0.018 mg éq QE /g ES suivi de l'extrait aqueux (0.767 ± 0.024 mg éq QE /g ES). Cependant, le chlorure d'aluminium comme le réactif de Folin, n'est pas spécifique aux flavonoïdes mais réagit avec d'autres composés [41]. Pour cela, d'autres techniques sont nécessaires comme l'HPLC pour confirmer nos hypothèses.

La faible teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans l'extrait aqueux peut être expliquée par le fait que certains composés phénoliques ont des propriétés hydrosolubles extrêmement faibles [42].

Concernant l'extrait MeOH-eau, nos résultats concordent avec ceux trouvés par d'autres auteurs .En effet la richesse de l'extrait MeOH-eau en composés phénoliques a été rapportée par plusieurs auteurs [4,43,44,45].

Il a aussi été rapporté par la littérature scientifique que le MeOH-eau dans les proportions 70-30 en volume donne la teneur la plus élevée en polyphénols par rapport à d'autres solvants [3].

Cependant il est difficile de comparer les teneurs en composés phénoliques obtenues avec celles de la bibliographie car la teneur en composés phénoliques n'est que relative et semble être liée aux propriétés génétiques, nature des organes, origine géographique, conditions et période de la récolte et la méthode d'extraction utilisée [46].

4.3. Conclusion

L'examen de tous ces résultats nous a permis :

✓ de trouver une corrélation linéaire entre la quantité de flavonoïdes et la quantité de polyphénols totaux. Ce résultat peut être traduit par le fait que la quantité en flavonoïdes varie proportionnellement avec tout le contenu en phénols totaux d'un extrait à un autre [47].

✓ de constater que dans notre étude, la grande majorité des composés phénoliques n'est pas hydrosoluble. Par conséquent, pour obtenir des fractions riches en polyphénols et en flavonoïdes totaux, il est préférable d'employer des mélanges de solvants organiques appropriés avec de l'eau. L'éthanol et l'eau sont préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol [23].

5. Résultats de l'analyse HPLC

Les résultats obtenus pour les extraits hydroalcooliques (MeOH-eau et EtOH-eau) sont illustrés dans les deux chromatogrammes qui sont présentés dans les **figures 19** et **20**.

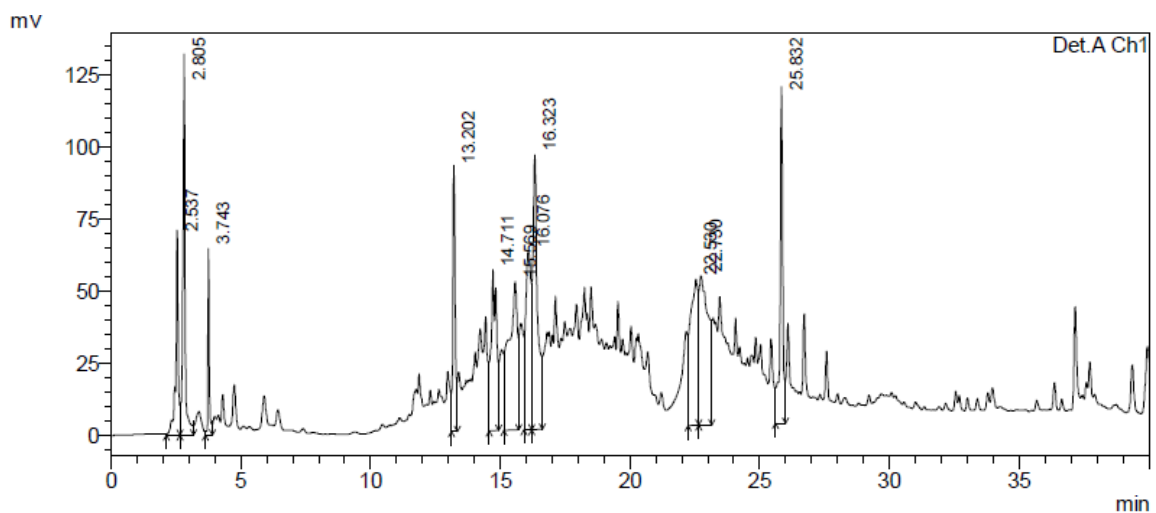


Figure19 : Chromatogramme HPLC de l'extrait MeOH-eau.

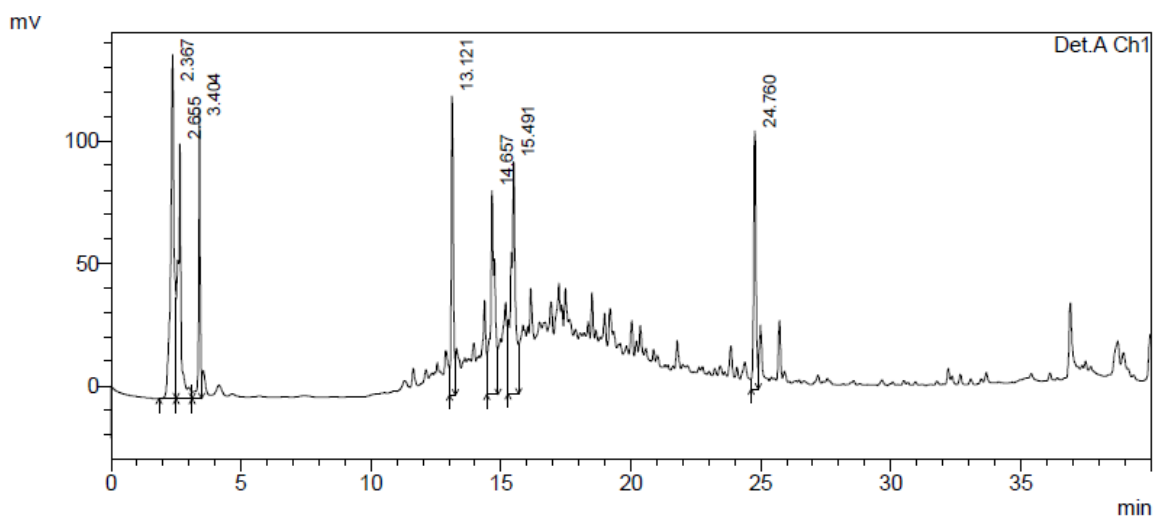


Figure20 : Chromatogramme HPLC de l'extrait EtOH-eau.

Les temps de rétention obtenus pour les standards sont présentés dans le **tableau 9**.

Tableau9 : temps de rétention des standards.

Standards	Temps de rétention
Acide caféique	15.199
Acide gallique	12.165
Quercétine	20.437
Acide cinnamique	21.728
Acide coumarique	16.921

Après comparaison entre les temps de rétention des standards et les temps de rétention obtenus avec les extraits hydroalcooliques, les standards présents dans les extraits sont identifiés et présentés dans le **tableau 10**.

Tableau10 : temps de rétention des standards présents dans les extraits.

Temps de rétention		Standards identifiés
MeOH-eau	EtOH-eau	
		/
15.569	15.491	Acide caféique
16.323	/	Acide coumarique

Les résultats présentés dans le **tableau10** ont montré la présence de l'acide caféique dans les deux extraits MeOH-eau et EtOH-eau et la présence de l'acide coumarique dans l'extrait MeOH-eau. On note aussi la présence d'autres composés non identifiés par manque de standards.

Le chromatogramme de l'extrait EtOH-eau est le moins étoffé en molécules. Nous constatons donc que ces résultats HPLC traduisent une concordance quant à l'analyse quantitative exprimée en nombre de composés phénoliques dans les extraits.

6. Activités biologiques

6.1. Activité antioxydante

6.1.1. Evaluation de l'activité du pouvoir antioxydant

La méthode utilisée dans cette étude est celle du piégeage du radical libre DPPH. L'activité antiradicalaire des différents extraits a été évaluée par leur activité inhibitrice sur une solution méthanolique de DPPH, mesurée à 517 nm. Le standard utilisé est l'acide ascorbique. L'activité antiradicalaire des différents extraits de marrube blanc, ainsi que du standard(acide ascorbique), a été illustrée dans les **figures 21, 22,23** et **24**.

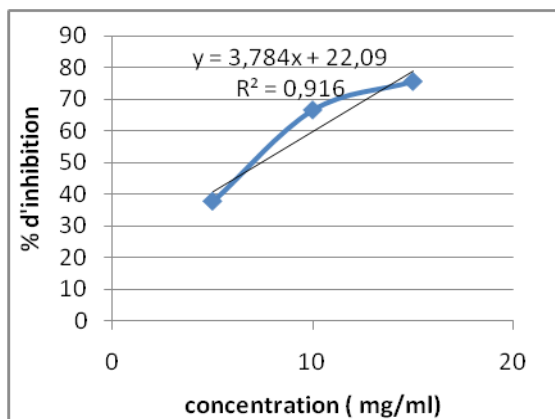
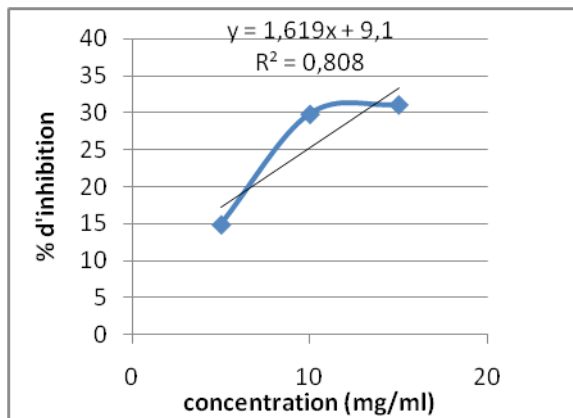


Figure21 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait aqueux.

Figure22 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait MeOH-eau.

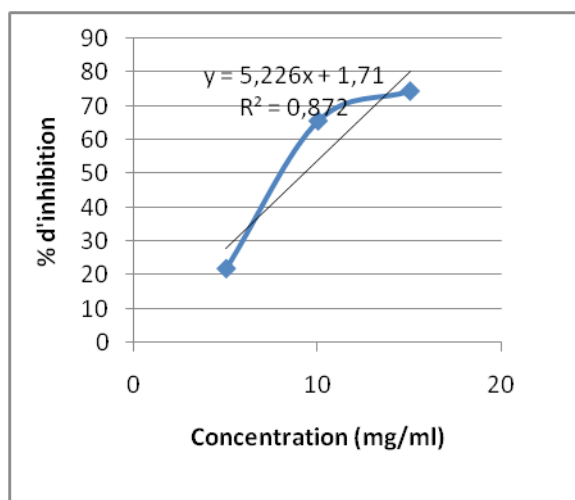


Figure23 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait EtOH-eau.

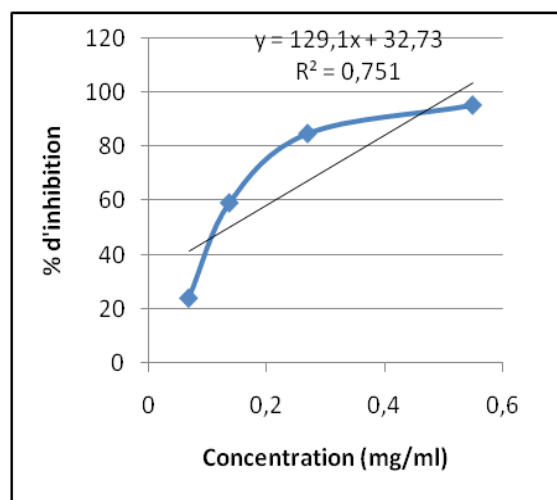


Figure24 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée par l'indice IC50. C'est un paramètre qui définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. Ces IC50 sont déterminées à partir des graphes dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage d'inhibition (**tableau11**). Plus la valeur de l'IC50 est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant [41].

Tableau 11: Valeurs des IC50 des extraits sec et du standard.

Extraits	IC50 (mg/ml)
Extrait aqueux	25.26
Extrait MeOH-eau	7.37
Extrait ETOH-eau	9.24
Acide ascorbique	0.13

6.1.2. Discussion

La présente étude montre que tous les extraits ont une activité antioxydante qui varie considérablement d'un extrait à un autre.

L'acide ascorbique a montré une forte activité antioxydante avec un IC50 de l'ordre de 0,13mg/ml. Quant aux extraits testés leur capacité dans le balayage du radical libre DPPH est classée dans l'ordre décroissant suivant :

Extrait MeOH-eau > extrait EtOH-eau > extrait aqueux

D'après les résultats mentionnés sur le **tableau11**, nous constatons que l'activité antioxydante de l'extrait MeOH-eau bien qu'elle soit faible par rapport à celle trouvée par l'acide ascorbique, reste néanmoins acceptable et supérieur aux autres extraits (**7.37 mg/ml**). L'activité antioxydante de l'extrait EtOH-eau s'en rapproche avec un IC50 de **9.24 mg/ml**.

Quant à l'extrait aqueux il présente une valeur IC50 largement supérieure comparée aux autres extraits (**25.26 mg/ml**).

Ghedadba et al. ont obtenu l'activité antiradicalaire la plus élevée pour l'extrait méthanoïque mais avec un IC50 (**IC50=1,5µg/m**) qui est largement inférieur à celui obtenu ici avec l'extrait MeOH-eau [4].

Néanmoins, il est difficile de comparer l'activité antioxydante de nos extraits avec celle énoncé par la bibliographie. Plusieurs facteurs entrent en jeu comme ceux cités auparavant pour la teneur en composés phénoliques.

Après observation des résultats obtenus entre le dosage des composés phénoliques et l'activité antioxydante, on constate l'existence d'une relation étroite entre les teneurs en composés phénoliques des différents extraits et leur activité antioxydante. En effet les composés les plus riches en composés phénoliques possèdent l'activité antioxydante la plus élevée

Cette observation s'avère être en accord avec ce qui est annoncé dans la littérature par plusieurs auteurs, le potentiel de l'activité antioxydante d'un extrait dépendrait alors de sa teneur en composés phénoliques [3].

6.2. Activité antibactérienne

6.2.1 Résultats de l'activité antibactérienne

Concernant les propriétés antimicrobiennes du marrube blanc, plusieurs travaux ont été focalisés surtout sur l'effet de ses huiles essentielles. A notre échelle, nous avons testé l'activité antibactérienne des extraits aqueux, MeOH-eau et EtOH-eau avec deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

Après 24h d'incubation à 37°C les diamètres d'inhibition observés autour des disques imprégnés dans les trois extraits sont nuls pour les deux souches bactériennes testés (**figures 25,26**).

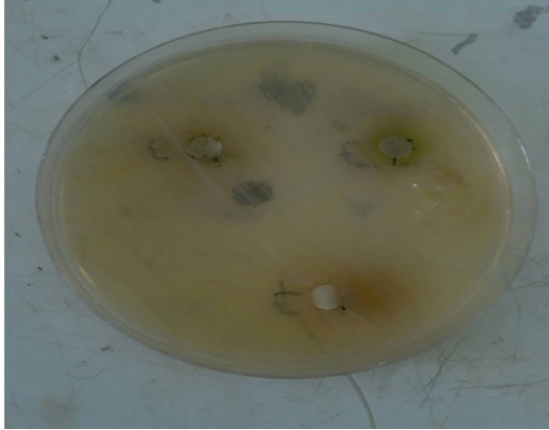


Figure25 : Zone d'inhibition des trois extraits vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

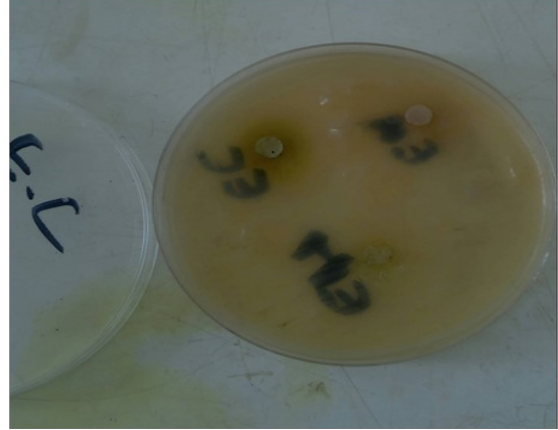


figure26 : Zone d'inhibition des trois extraits vis-à-vis de *Escherichia coli*.

6.2.2. Discussion

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus avec des concentrations de 5.12mg/ml pour chaque extrait sont donc négatifs. Ils pourraient être expliqués par l'influence de plusieurs facteurs : structure des parois des bactéries, leur mobilité dans la gélose MH, la concentration des extraits, la nature et la structure des substances actives dans les extraits, la méthode employée pour l'évaluation et la matrice biologique (les parties de la plante) qui font l'objet de l'étude [4].

Conclusion générale

Etablir un lien entre l'utilisation thérapeutique très répandue des feuilles de marrube blanc dans la médecine traditionnelle et la quantité des composés phénoliques qu'il recèle, tel a été l'objectif recherché dans notre mémoire lequel s'est basé sur l'étude phytochimique des composés phénoliques et la détermination de leur activité antibactérienne et antioxydante correspondantes.

Après calcul des rendements d'extraction des feuilles de marrube blanc séchées, le meilleur résultat a été obtenu pour l'extrait aqueux ($37.73 \pm 4.560\%$) suivi de l'extrait EtOH-eau ($22.73 \pm 1.157\%$) et l'extrait MeOH-eau ($29.2 \pm 1.655\%$).

Les tests phytochimiques ont montré la richesse des extraits hydroalcooliques en flavonoïdes et tanins, quant aux dosages des polyphénols et des flavonoïdes totaux, l'extrait MeOH-eau s'est avéré être le plus riche en composés phénoliques avec une teneur de 2.212 ± 0.010 mg éq AG/g ES. en polyphénols totaux et une teneur de 1.321 ± 0.004 mg éq QE/g ES. en flavonoïdes totaux. L'extrait EtOH-eau a eu des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux assez proches de celles obtenues avec l'extrait MeOH-eau à savoir respectivement 1.988 ± 0.006 mg éq AG/g ES et 1.290 ± 0.018 mg éq QE/g ES. L'extrait aqueux

a présenté les teneurs les plus faibles avec 0.947 ± 0.0025 mg éq AG/g ES. en polyphénols totaux et 0.767 ± 0.024 mg éq QE/g ES. en flavonoïdes totaux.

L'analyse qualitative par HPLC effectuée pour les deux extraits MeOH-eau et EtOH-eau a révélé que le chromatogramme obtenu pour l'extrait ETOH-eau est moins étoffé en molécules que celui obtenu pour l'extrait MeOH-eau. Ceci confirme les résultats obtenus lors de l'analyse quantitative des composés phénoliques.

L'extrait MeOH-eau a eu un IC₅₀ (7.37 mg/ml) largement supérieur à celui de l'acide ascorbique (0.13mg/ml). Toutefois il s'est avéré que cet extrait, le plus riche en composé phénoliques, a eu une meilleure activité antioxydante comparé aux résultats obtenus pour les autres extraits EtOH-eau (9.24 mg/ml) et aqueux (25.26 mg/ml). Ceci concorde avec les résultats présentés dans la littérature scientifiques.

L'activité antibactérienne était négative vis-à-vis des deux souches testées à savoir *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Les composés phénoliques sont considérés dans la littérature comme ayant plusieurs propriétés thérapeutiques notamment comme antioxydants. A l'issue de ce constat et des résultats obtenus, nous pouvons déduire que la quantité en composés phénoliques contenue dans les feuilles de marrube blanc a un lien certain avec les nombreuses utilisations thérapeutiques dont il fait l'objet.

Des études plus approfondies *in vivo* seraient nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives contenues dans le marrube blanc, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action. Cela permettrait de préparer des produits pharmaceutiques de grand intérêt thérapeutique à moindre coût.

Références bibliographiques

- [1].RHATTAS,M, et al. Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences*. 2016, vol.97, n°, pp.9187-9211.
- [2].DJAHRA,A. Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de doctorat. *Biologie végétale*. Annaba : Université Badji Mokhtar, 2014, 114p.
- [3]. BOUCHOUKA, E.Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat. *phytochimie*. Annaba : Université Badji Mokhtar, 2016, 114p.
- [4]. GHEDADBA,N, et al.Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare*L. *phytothérapie*.2014, vol.12, n°1, pp.15-24.
- [5]. GUIET, A.L'apport de *marrubium vulgare* l. dans la prévention du risque Cardiovasculaire. Thèse de doctorat. *Pharmacie* .Nantes : Université de Nantes, 2011, 83p.
- [6]. TABET, A.Caractérisations chimiques et étude biologiques d'extraits de quatre plantes aromatiques "*Daucus. carotasp. sativus*, *Marrubium vulgare*, *Ballotanigraet Cynoglossumcheirifolium*" de la région de Tlemcen. Thèse de doctorat. *Chimie organique appliquée*. Tlemcen : Université Abou-BekrBelkaid, 2017, 156p.
- [7].BOUTERFAS,K , et al. Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*.2014,vol. 12, n°1,pp.6-14.
- [8].SALAJ,N, et al.Biomedical potential of horehound extract (*marrubium vulgare*, *lamiaceae*).*Medicinski pregled*.2018,vol.71, n°1, pp.21-26.

[9]. SANTRAM,L, et al.Marrubium vulgareL.: A review on phytochemical and pharmacological aspects.Journal of Intercultural Ethnopharmacology.2017, vol.6, n°4, pp. 429-452.

[10].DUSSER LAUGE, N. Etudes de plantes médicinales du maghreb : usages traditionnels et études phytochimiques. Pharmacie. Toulouse : Université Toulouse III Paul Sabatier, 2017,119p.

[11].DJAHRA, A,et al.Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (Marrubium vulgare L.). phytothérapie.2013,vol.11,n°6, pp.348-352.

[12].KRIEF,S.Métabolites secondaires des plantes et comportement animal. Thèse de doctorat. Écologie et chimie des substances naturelles.Paris : Muséum national d'histoire naturelle,2003, 246p.

[13].BRUNETON,J. pharmacognosie,phytochimie, plantes médicinales.5^e édition. Paris : Tech&Dec Lavoisier, 2016, 1487p.

[14]. SAFFIDINE, K.Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de Carthamuscaeruleus L. et de Plantago major L .Thèse de doctorat.microbiologie.Setif : Université Ferhat Abbas,2015,132p.

[15].TSIMOGIANNINS, D.The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members.Innovat Food SciEmerg Tech.2006, vol.7, n°1-2,pp.140-146.

[16].GHEDIRA,K.Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. phytothérapie.2005,vol.3, n°4,pp.162-169.

[17].BOUSSETTA,N. Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de champagne.Thèse de doctorat. Génie des procédés industriels.Compiègne : Université de technologie, 2010,255p.

[18].SCALBERT,A. Antimicrobialproperties of tannins. *Phytochemistry*.1991, vol.30, n°12, pp. 3875-3883.

[19].KHANBABAE, K , et al. Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*.2001,vol. 18,n°6, pp. 641-649.

[20]. JAKOBEK, L, et al.Flavonols, Phenolic acids and Antioxidant Activity Of Some Red Fruits.*Deutsche Lebensmittel-Rundschau*.2007, vol.103, n°, pp. 369-378.

[21]. ARRAKI,K.Les stilbénoides chez les Cypéracées : Isolation, identification et étude de leurs activités biologiques. Identification et dosage des stilbènes dans des vins Tunisiens. Thèse de doctorat. Nutrition. Bordeaux :Université de bordeaux,2014,178p.

[22].AUDIGIE ,C., FIGARELLA J., ZONZAIN F.Manipulations d'analyse biochimique. Paris :doin edition,1978,247p.

[23].MAHMOUDI, S. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*CynarascolymusL.*).*Nature & Technologie*.2012, vol.1,n°9,pp.35-40.

[24]. KALLA,A.Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud algérien: *Pituranthosscoparius*, *Rantheriumadpressum*et *Traganumnudatum*. Thèse de doctorat.phytochimie .Constantine : Université mentouri, 2012, 137p.

[25]. MICHEL,T.Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaërhamnoides*).Thèse de doctorat.phytochimie. Orléans : Université d'Orléans, 2011, 285p.

[26].MEZOUAR,D. Évaluation de l'activité antioxydante de *Berberis vulgaris L.* *Phytothérapie*.2014,vol.12,n°5, pp.297-301.

[27].GUIGNARD, J-L. Abrégé de biochimie végétale. 2^e Ed. Paris : Masson, 1979, 263p.

[28].BRUNETON, J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^eed. Paris : Tech&Dec Lavoisier, 2009,1289p.

[29].BENTABET-LASGAA,N. Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes *Frédoliaaretioidesetechium vulgare* de l'ouest algérien.Thèse de doctorat. biologie cellulaire et biochimie.Tlemcen : université Aboubekr Belkaid, 2015, 113p.

[30]. AMARI, N. Etude Phytochimique, Potentiel Antioxydant et Activité antifongique de *Thymelaeahirsuta* (Cas des dermatophytes).Thèse de doctorat. Biotechnologie végétale. Mostaganem : Universite Abdelhamid Ibn Badis, 2015,134p.

[31].BENDIF, H. Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae: *Ajugaiva*(L.) Schreb., *Teucriumpolium*L., *Thymus munbyanus*subsp. *coloratus*(Boiss. &Reut.) Greuter&Burdet et *Rosmarinusseriocalyx*Jord &Fourr. Thèse de doctorat. Biotechnologie végétale. Alger : L'école normale supérieure de Kouba-Alger,2017,143p.

[32].CHEURFA,M. Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysiatriphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*.2016, vol.14, n° ,pp.181-187.

[33].HEBI, M. Évaluation de l'activité antioxydante de *Steviarebaudiana*. *phytothérapie*. 2016,vol.14, n.°1,pp.17-22.

[34].MERAGHNI,S, et al.Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *ScabiosaAtropurpurea*sub. *Maritima* L.Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.2018,vol.87,n° ,pp.13-21.

[35].ROUESSAC,F.,ROUSSEAC,A.Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales.8^eed. Paris : DUNOD, 2016, 551p.

[36].HADDOUCHI, F, et al. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie.*Phytothérapie*.2016, vol.1, n° , pp.1-9.

[37].RHAYOUR,K.Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacteriumphlei* et *Mycobacteriumfortuitum*. Thèse de doctorat.biologie.Fès : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah,2002, 151p.

- [38].MOREIRA,M ,et al. .I Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT-food science and technology.2005,vol.38,n°,pp.565-570.
- [39].BEDDOU,F.Etudephytochimique et activité biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex visicarius* L. et *anvillearadiata*coss.&Dur.Thèse de doctorat. biologie. Tlemcen :UniverstéAbouBekrBelkaid, 2015, 143p.
- [40].SOBHY,M. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts.food chemistry.2009,vol.112,n°,pp.595-598.
- [41].TOUAMI, C.Examen phytochimique et Pouvoirantimicrobienet anti-radicalairedes extraits de *Nepeta amethystina*(Gouzia)de la région d'AïnSefra (Algérie). Thèse de doctorat. Biologie..Tlemcen : Universite Abou Bekr Belkaid,2017, 104p.
- [42].KECHAR,K. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Ballota hirsuta* Benth. du Tessala (Algérie occidentale).phytothérapie.2017, vol.15, n°, pp.217-221.
- [43].BOUTERFAS,K,et al. Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. Les technologies de laboratoire.2013, vol.8, n°3,pp.34-41.
- [44].ADIDA,h,et al. Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*.phytothérapie.2016, vol.14,n°,pp.207-212.
- [45].GHEDADBA, N ,et al. Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. AJNP. 2014, vol. 2, n°2, pp.64-74.
- [46].KORDALI,S,et al. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistaciaatlantica* Desf. de l'Algérie.phytothérapie.2009,vol.7,n°6,pp.304-308.
- [47].HAMIA,C, et al. Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressium*.AST.2014, vol.6, n°1, pp.41-

Glossaire

Ecorces : L'écorce est le revêtement extérieur du tronc, des branches et des racines des arbres, et plus généralement des plantes ligneuses.

Herbacé : Végétal qui a la texture d'une herbe.

Phytothérapie : Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes.

Corolle : Ensemble des pétales d'une fleur.

Expectorantes : Un expectorant est un médicament qui facilite l'expectoration, c'est-à-dire le rejet des produits formés dans les voies respiratoires (crachats).

Fluidifiantes : Tout agent supposé capable d'augmenter la fluidité d'un épanchement ou d'un produit de sécrétion pour en favoriser la résorption ou l'élimination.

Teintures mères : C'est une préparation liquide obtenue par extraction d'un ou plusieurs principes actifs de plantes médicinales fraîches par percolation ou macération avec un solvant approprié.

Duveteux : Qui a beaucoup de duvet. Poils fins et très courts, d'apparence cotonneuse, qui poussent sur certains végétaux.

Œillets : C'est un nom vernaculaire ambigu désignant diverses plante herbacées, souvent utilisées comme plante ornementales ou « fleurs à couper » les pétales de leurs fleurs sont généralement dentés, découpés voire laciniée.

Myrtacées : La famille des Myrtacées regroupe des plantes dicotylédones ; elle comprend environ trois mille espèces d'arbres et d'arbustes, appartenant à 23 à 134 genres selon les classifications. Ce sont souvent des producteurs d'huiles aromatiques.

Pérenne : Qui dure longtemps ou depuis longtemps.

Dyspepsie : Correspond à un ensemble de symptômes de douleur ou de malaise épigastrique (région supérieure de l'abdomen) dont l'origine se situerait au niveau de l'estomac ou des structures proches.

Saveur astringente : Du goût âpre.

Annexe 1 : préparation des réactifs.

Réactif d'amidon : La préparation du réactif d'amidon s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1,2 g d'iode (I_2) dans 50ml d'eau distillée contenant 2.5g d'iodure de potassium (KI).
- Chauffer pendant 5 minutes.
- Diluer jusqu'à 250ml ou 500 ml.

Réactif de Wagner : Ce réactif a été préparé comme suit :

- Dissoudre 2g de KI et 1,27g I_2 dans 75ml d'eau distillée
- Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

Réactif de Mayer : La préparation s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1,358g de $HgCl_2$ dans 60ml d'eau distillée
- Dissoudre 5g de KI dans 10ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions
- Ajuster le volume total à 100ml d'eau distillée.

Solution de $FeCl_3$ à 1% : Cette solution a été préparée comme suit :

- Dissoudre 1g de $FeCl_3$ dans 99 ml d'eau distillée.