

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI OUZOU



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et Microbiologie
En vue de l'obtention du diplôme Mater en Sciences Biologiques
Option : Biotechnologie et valorisation des plantes

THEME

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité
antioxydante et antibactérienne de la plante
*Marrubium Vulgaire L.***

Présenté par : Mehal samira

Soutenu devant le jury :

Président :	M ^{me} Hellal Z.	MAA	UMMTO
Promotrice :	M ^{me} Bemmensour N.	MCA	UMMTO
Examineur :	M ^f Louadj L.	Enseignat	UMMTO
Examinatrice :	M ^{me} Iratni-AICHE G.	MCB	UMMTO

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à notre promotrice Mme BEMMENSOUR, Maître de conférences classe A à l'Université de Tizi-Ouzou, de nous avoir fait l'honneur de nous encadrer, pour le temps et la patience qu'elle nous a accordée tout au long de ce mémoire.

Nous remercions Mme HELLAÏ Z. maître assistante classe A à l'Université de Tizi-Ouzou, faculté des sciences biologiques et agronomiques, d'avoir honoré notre jury en acceptant de le présider.

Egalement Mme IRATNI-AICHE G. Maître de conférences classe B à l'Université de Tizi-Ouzou, faculté des sciences biologiques et agronomiques pour l'intérêt qu'elle a portée à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par ses conseils.

Je tiens également à adresser mes remerciements à Mr LOUADJ L. enseignant à UMMTO pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du département de microbiologie et biochimie de l'université de Mouloud Mammeri pour l'accueil chaleureux qu'il nous ont toujours réservé et pour leur aide dans la réalisation de cette étude notamment en nous fournissant les réactifs manquants.

Dédicaces

Au dieu, le tout puissant qui m'a aidé à réaliser ce travail.

*A la mémoire de ma grand-mère et mes grands-parents ainsi
que mon cousin Arezki, puisse dieu les accueillir en son
vaste paradis ;*

*À ma chère mère pour son soutien infatigable, sa patience
admirable À mon cher père pour son affection continuelle,
qui m'a beaucoup aidé dans ma vie et durant mes études.*

A Yahya, ainsi que ma belle famille

À mes deux chères sœurs

A mon frère.

Sans oublier mes cousines et mes cousins

À toute ma promotion du master 2017/2018.

Je vous dis Merci

Samira

Liste des abréviations

OMC : Organisation Mondiale de la Santé

OH : Hydroxyde

UV : Ultra-Violet

DPPH : 2,2 diphényl 1 picryldrazil

CI : Concentration Inhibitrice

DO : Densité Optique

EAG : Equivalent Acide Gallique

MS : Matière Séche

PPT : Polyphénol Totaux

MH : Mueller Hinton

GN : Gélose Nutritive

PEB : Poid de l'extrait brut sec

PMVS : Poid de la matière végétale sèche

R% : Rendement

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. coli : *Escherichia coli*

T+ : témoin positif

T- : témoin négatif

EOR : Espèce Réactives de L'Oxygène

Liste des figures

Figure 1 : Photo de l'espèce <i>Marrubium Vulgare L.</i> de la région de Makouda	3
Figure 2 : Principaux types de coumarines	11
Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes	13
Figure 4 : Structure des Anthocyanosides	14
Figure 5 : Région de prélèvement de la plante.....	22
Figure 6 : Préparation de la poudre	23
Figure 7 : Les différentes étapes d'extraction de l'extrait brut méthanolique	24
Figure 8 : Diagramme illustrant les différentes étapes suivies lors de l'extraction des Aglycones, Anthocyanes et C-glycosides.	26
Figure 9 : Les Aglycones et Anthocyanes	27
Figure 10 : Les C-glycosides	27
Figure 11 : Les trois extraits (Aglycones, C-glycosides et Anthocyanes)	28
Figure 12 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant.	33
Figure 13 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe (III)- TPTZ et un antioxydant (AH).	34
Figure 14 : Diagramme illustrant les étapes de l'activité antibactérienne.	38
Figure 15 : Résultats du test Screening phytochimique de <i>Marrubium vulgare L.</i>	39
Figure 16 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique et des quatre extraits.....	43
Figure 17 : Comparaison du pouvoir réducteur des quatre extraits et d'acide ascorbique.	43

Figure 18 : Piégeage de DPPH en fonction des concentrations d'acide ascorbique et des quatre extraits	44
Figure 19 : Comparaison de la CI50 des différents extraits et d'acide ascorbique.....	45
Figure20 : Diamètres d'inhibition des extraits de <i>Marrubium vulgare L.</i> testés sur les deux souches.	47
Figure 21 : Zone d'inhibition de l'extrait d'Anthocyanes	48
Figure 22 : Zone d'inhibition de l'extrait c-glycosides.....	48
Figure 23 : Zone d'inhibition de l'extrait aglycones.....	49
Figure 24 : Zone d'inhibition de l'extrait polyphénols totaux	49
Figure 25 : Résultats de la CMI des polyphénols, anthocyanes et C-glycosides.....	51

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux composés phénoliques.....	9
Tableau II : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	10
Tableau III : Principaux acides hydroxycinamiques	11
Tableau IV : Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante " <i>in vitro</i> ".....	32
Tableau V : Métabolites mis en évidence au niveau des feuilles et fleurs de <i>Marrubium vulgare L</i>	39
Tableau VI : Rendement de l'extrait métabolique.....	40
Tableau VII : Teneur en extraits flavonoïdiques de la plante	41
Tableau VIII : Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique	50
Tableau IX : Activité antibactérienne de l'extrait anthocyanes.	50
Tableau X : Activité antibactérienne de l'extrait c-glycosides.	50

SOMMAIRE

Lise des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Synthèse bibliographique

1. Introduction	3
2. Présentation de l'espèce <i>Marrubium vulgare</i> L	3
2.1. Taxonomie et noms vernaculaires	5
2.2. Utilisation de <i>Marrubium vulgare</i> L.	5
2.3. Mode d'utilisation du marrube blanc	6
2.3.1. Utilisation interne	6
2.3.2. Utilisation externe	6
2.4. Contre-indications et effets indésirables	7
3. Les composés phénoliques	7
3.1. La biosynthèse	7
3.2. Les principales classes des polyphénols	8
3.2.1. Les acides phénoliques	10
3.2.2. Les coumarines	11
3.2.3. Les flavonoïdes	12
3.2.4. Les anthocyanes	14
3.2.5. Les tanins	14
3.2.5.1. Les tanins hydrolysable	15
3.2.5.2. Les tanins condensés	15
3.3. Propriétés biologiques des polyphénols	16
3.3.1. Chez les végétaux	16
3.3.2. Chez l'homme	16
3.3.2.1. Activité antibactérienne des polyphénols	16
3.3.2.2. Activité antioxydante	18

Partie expérimentale

1. Matériel et méthodes	22
1.1. Matériel	22
1.1.1. Matériel biologique	22
1.2. Méthodes utilisées	22
1.2.1. Préparation de l'extrait brut méthanolique par macération	23
1.2.2. Extraction des trois types de flavonoïdes	25
1.2.3. Analyse qualitative des quatre extraits	28
1.2.4. Analyse quantitative des quatre extraits	29
1.3. Evaluation de l'activité antioxydante	32
1.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test de pouvoir de piégeage DPPH.....	33
1.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP	34
1.4. Evaluation de l'activité antibactérienne	35
1.4.1. La méthode de diffusion sur milieu solide (MH).....	35

Résultats et discussion

2. Résultats et discussion.....	39
2.1. Screening phytochimique	39
2.2. Rendement de l'extrait brut méthanolique	40
2.3. La teneur des extraits des feuilles et fleurs de <i>marrubium vulgare L.</i>	41
2.3.1. La teneur de l'extrait brut méthanolique	41
2.3.1. Teneur en flavonoïdes	41
2.4. Résultats de l'activité antioxydante.....	43
2.4.1. Réduction de fer (FRAP).....	43
2.4.2. Effet scavenger du radical DPPH.....	44
2.5. Résultats de l'activité antibactérienne	47
2.5.1. L'activité antibactérienne des extraits.....	47
2.5.2. Résultats de la CMI.....	50
Conclusion	53

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les hommes ont toujours utilisé les plantes pour se soigner, se nourrir, se parer (**Catier et Roux, 2007**). A ce jour, plus de 10 000 espèces de plantes médicinales différentes sont étudiées par les scientifiques et de nombreux médicaments sont élaborés à partir de leurs principes actifs. L'organisation mondiale de la santé (O.M.S) considère que dans de nombreux pays peu développés, les plantes et leurs composants représentent la première source de remèdes. A cet effet, cet organisme prépare une gigantesque base de données afin d'y consigner la totalité des principes phytochimiques découverts à ce jour (**Delille, 2010**).

Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les polyphénols, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé. Les polyphénols présentent plusieurs classes importantes : les flavonoïdes, tanins, lignanes etc...

De nos jours, plus de 3000 flavonoïdes sont identifiés et se trouvent localiser particulièrement dans les pigments floraux ou dans les feuilles (**Marfak, 2003**). Les flavonoïdes sont reconnus essentiellement pour leur action antioxydante, modulatrice de l'activité de certaines enzymes, vasculoprotectrice (**Vitor et al., 2004**), anti-inflammatoire (**Chen et al., 2008**) et antidiabétique (**Marfak, 2003**).

A l'heure actuelle, plusieurs travaux ont envisagé l'utilisation de ces composés bioactifs comme alternatives aux multiples substances synthétiques. En effet, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, également la toxicité des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs dans l'industrie agro-alimentaire, sont à l'origine de l'engouement suscité pour les plantes caractérisées par leurs propriétés biologiques.

Pour contribuer à la sauvegarde du patrimoine lié à l'utilisation des plantes spontanées en médecine traditionnelle, nous nous sommes fixés comme objectif dans ce travail, d'évaluer les activités biologiques d'une plante spontanée qui est le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L* (**Debuigne et Couplan, 2009**).

Le développement de cette étude à travers nos travaux de mémoire s'échelonne sur deux parties :

-Une première partie bibliographique qui englobe la présentation de la plante et des généralités sur les métabolites secondaires et ses classes.

-La deuxième partie pratique illustre en premier point le matériel et méthodes utilisés dans les différentes manipulations : l'extraction et dosage des composés phénoliques, des flavonoïdes tels que les Anthocyanes, C-glycosides et Aglycones, ainsi l'étude biologique "*in vitro*" des activités antioxydantes et antibactériennes des différents extraits. En deuxième point la présentation, et l'analyse des résultats obtenus. Ce dernier sera suivi d'une conclusion.

1. Introduction

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont été une source inépuisable de médicaments pour les tradipraticiens pour guérir certaines pathologies souvent mortelles sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Actuellement, l'ethnopharmacologie s'emploie à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethno-pharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouveaux actifs (Pelt, 2001). Parmi les plantes médicinales qui se trouvent en Algérie et qui présentent des effets thérapeutiques importantes, dues à la présence de plusieurs principes actifs, mais qui ne sont pas vraiment utilisés par la population, on cite le *Marrubium vulgare* L. qui appartient à la famille des Lamiacées qui est composée de près de 258 genres et 6970 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres (Quezel et Santa, 1963 ; Guignard, 2001).

2. Présentation de l'espèce *Marrubium vulgare* L.

Marrubium vulgare L. est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen pour ses vertus thérapeutiques (Djahra et al., 2013). Selon (Bonnier, 1909), le Marrube est composé de deux mots hébreux : mar, rob : suc, amer.



Figure 1 : photo de l'espèce *Marrubium vulgare* L. récolter à Makouda.

Le Marrube blanc est connue sous plusieurs nominations dans le monde entier, Marrnuit, en Kabyle (**Aït-Youcef, 2006**), Meriouat en arabe, Marrubia en Tunisie (**Bellakhdar, 1997**), Marrube blanc en français (**Boullard, 2001**) et White horehound en anglais (**Rombi et Robert, 2015**).

Le *Marrubium vulgare* L., est une plante herbacée vivace d'aspect blanchâtre cotonneux, à tiges dressées, quadrangulaires. La plante pouvant atteindre 80 cm de hauteur. Elle dégage une odeur désagréable et sa saveur est âcre (**Schauenberg et Paris, 2006 ; Rombi et Robert, 2015**).

Les jeunes tiges sont recouvertes d'abondants poils duveteux blanchâtres ; les tiges plus âgées sont gris-vert et les poils qui les recouvrent sont moins nombreux. Cette plante par son gros rhizome, se dresse jusqu'à 6 à 8 dm. Les feuilles sont nombreuses, ovales ou arrondies, feutrées à la face inférieure, de couleur vert blanchâtre. Les feuilles pétiolées ont un limbe mesurant 1,5-4 cm de longueur et 1 -3,5 cm de largeur ; elles présentent des bords dentés et crénelés. Les feuilles les plus âgées étant moins nombreuses. Ces fleurs sont blanches, en verticilles denses disposées le long des tiges, au niveau de chaque fleur, sa lèvre supérieure est bifide et l'inférieure trilobée. L'inflorescence est glomérule dense, le fruit est tétrakène et les grains de pollens sphériques d'environ 25 pm de diamètre, à exine lisse (**Boullard, 2001 ; Rombi et Robert, 2015**).

Le Marrube blanc est originaire d'Europe, il est répandu sur tout le continent américain, où il s'est naturalisé, au centre et au sud-ouest de l'Asie et aux Canaries (**Bonnier, 1909**). Il pousse le long de la méditerranéenne, dont il est commun dans toute l'Algérie (**Dellile, 2010**). Il pousse principalement sur les friches, sur les bermes de routes et dans des sites incultes, au bord des chemins, et les rues des villages. Elle est répandue dans les garrigues et terrain secs (**Schauenberg et Paris, 2006**).

Après les études faites sur la composition de Marrube blanc en métabolites secondaires et les propriétés thérapeutique de ces molécules les chercheurs ont révélé la présence de nombreux flavonoïdes (O- et C- hétérosides de flavones), d'huile essentielle, de diterpènes (la marrubiine qui est un principe amer, lactone, est vraisemblablement présente sous la forme de pré-marrubiine, précurseur préfuranique) et des tanins (**Wichtl et Anton, 2003**).

2.1. Taxonomie

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

Règne : Végétale.

Embranchement : Angiosperme.

Classe : Eudicotylédones.

Sous-classe : Gamopétale.

Ordre : Lamiales.

Famille : Lamiacées.

Genre : *Marrubium*.

Espèce : *Marrubium vulgare L.*

2.2. Utilisations traditionnelles de *Marrubium vulgare L.*

Le Marrube blanc est traditionnellement utilisé par voie orale dans le traitement de :

- La toux rebelle et des affections bronchiques.
- Elle présente des propriétés antimicrobiennes.
- Elle a également été préconisée comme principe amer dans l'inappétence et les dyspepsies accompagnées de flatulences et de ballonnements, et comme cholérétique, emménagogue, et contre la malaria.
- Elle est aussi utilisée comme expectorant et fluidifiant des sécrétions bronchiques. On l'utilise en infusion comme expectorant dans diverses affections des voies respiratoires.
- Selon (**Bellakhdar, 1997**), dans le Jbel Bouiblanc, le marrube blanc est mâché contre les maux de dents.
- En homéopathie, la teinture est utilisée lors d'affections du système gastro-intestinal, hépatique et biliaire (**Schauenberg et paris, 2006**).
- Des travaux russes anciens font état de propriétés hypotensives, vasodilatatrices et d'un effet normalisant sur certaines arythmies.
- L'activité vasorelaxante est essentiellement attribuée au marrubénol et à la marrubine (**Rombi et Robert, 2015**).
- Certains constituants du marrube blanc ont une action régulatrice sur le muscle cardiaque.
- Elle est utilisée également contre les poussées du diabète. Dans un essai clinique sur le diabète de type 2, les extraits aqueux de *Marrubium vulgare L.*, ont montré une capacité à réduire les niveaux du glucose, du cholestérol et des triglycérides dans le plasma (**Ait Youcef, 2006**).

-Elle est utilisée dans le traitement des ulcères.

-Elle est l'une des plantes dont le pouvoir antioxydant est le plus marqué vis-à-vis de la peroxydation lipidique (**Schauenberg et paris, 2006**).

Un extrait de feuilles de marrube a montré un effet antiprolifératif sur des cellules humaines du cancer colorectal (**Debuigne et Couplan, 2009**).

-Elle a montré un pouvoir de faire tomber la fièvre typhoïde tout en améliorant l'état général et en abrégant la maladie (**Rombi et Robert, 2015**).

-La plante est utilisée en cosmétologie traditionnelle, la décoction, en rinçage sur les cheveux les embellis et les cataplasmes de la plante appliquer sur les taches de rousseurs les éclaircis (**Bellakhdar, 1997 ; Ait youcef, 2006**).

2.3.Mode d'utilisation du marrube blanc

2.3.1. Utilisation interne

- **Infusion** : 15 à 30 g de plante sèche par litre d'eau, infusée 15 minutes. Prendre 3 tasses à café par jour avant chaque repas. Pour exciter l'appétit et stimuler le travail du foie (**Bellakhdar, 1997**).
- **Teinture** : laisser macérer pendant 10 jours, 20 g de feuilles et fleurs dans 100 g d'alcool à 60°. Prendre de 20 à 25 gouttes dans un peu d'eau avant les repas.
- **Poudre** : moudre les feuilles et les fleurs séchées. Prendre une cuillère à café de la poudre obtenue mélangée à du miel ou de la confiture avant les repas (**Dellile, 2010**).
- **Médicaments** : Forme galénique empirique : extrait fluide (1–5 g/jour) (expectorant). Arkogélules, Elusanes, Cardiocynésine etc... Le marrube blanc et ses extraits font parties de quelques préparations comme Angocin, gouttes bronchiques (**Wichtl et Anton, 2003**).

2.3.2. Utilisation externe

- **Décoction** : 30 à 60 g de plante par litre d'eau, à utiliser en lotions ou en fomentations sur les plaies et les ulcères (**Dellile, 2010**).
- La plante hachée est couramment utilisée en cataplasmes sur le front et les tempes contre les fièvres et sur les abcès et furoncles crevés pour la panser et aider à leur cicatrisation (**Bellekhdar, 1997**).

2.4. Contre-indications et effets indésirables

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

A dose excessivement élevée, le marrube blanc pourrait provoquer des troubles du rythme cardiaque (**Debuigne et Couplan, 2009**).

3. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement (**Bruneton, 1999**). A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (**Tao et Lambert, 2014**). Ils présentent tous un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hannebelle et al., 2004 ; Sarni-Manchado et Cheyner, 2006**). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 Da (**Crozier et al., 2006**).

Des travaux plus anciens ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV, l'effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs et pour ces propriétés antifongiques et antibactériennes (**Heimeur et al., 2004**). Ils interviennent dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant la saveur (**Dubois et al., 1977**).

En effet les polyphénols ont des propriétés bénéfiques pour la santé comme la prévention et le traitement de certains cancers, traitements des maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neuro dégénératives, certains d'entre eux sont utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (**Burta et al., 2008**).

3.1. Biosynthèse

Les composés aromatiques naturels sont issus de deux grandes voies de la biosynthèse, la voie la plus courante est appelée : voie shikimate ,Cette voie débute par la condensation du phospho-énol-pyruvate qui provient de la glycolyse avec l'erythrose-4phosphate, qui est produit par la voie des pentoses phosphates au cours d'une succession de réactions, le glucide

qui en résulte à 7 atomes de carbones, subit une cyclisation puis une réduction qui forme du shikimate d'où la dénomination de la voie .

Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines (**Buchanan et al., 2000**).

L'autre voie, part de l'acétate et conduit à des poly-3-céto esters, des polycétates qui engendrent par cyclisation des composés polycycliques : chromanes, iso coumarines, xanthones, quinone etc... (**Bruneton, 1993**).

3.2. Principales classes des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de sous classes (tableau I) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degrés d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation etc...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (**Mancheix et al., 2005**).

Tableau I : Les principales classes des composés phénoliques (**Bruneton, 1999**)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine(exemple)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	
C ₆ -C ₁	Acides	P-Hydroxybenzoïque	Epices, fraises
C ₆ -C ₃	hydroxybenzoïques	Acides cafeïque,	Pommes de terre,
	Acides	férulique	pommes
C ₆ -C ₄	hydroxycinnamiques	Scopolétine, esculetine	Citrus
C ₆ -C ₂ -C ₆	Coumarines	Juglone	Noix
C ₆ -C ₃ -C ₆	Naphtoquinones	Resvératrol	Vigne
	Stilbènes		
	Flavonoïdes	Kaempférol, quercétine	Fruits, légumes,
	. Flavanols	Cyanidine,	fleurs
	. Anthocyanes	prélargonidine	Fleurs, fruits rouges,
	. Flavanols	Catéchine, épicatechine	Pommes, raisins
(C ₆ -C ₃) ₂	. Flavanones	Naringénine	Citrus
(C ₆ -C ₃) _n	Iso flavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
(C ₁₅) _n	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Lignines		Bois, noyaux des fruits
	Tanins		Raisins rouges, kaki

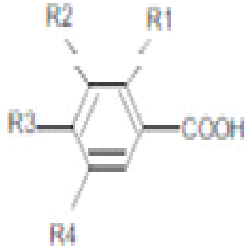
3.2.1. Les acides phénoliques

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (**Bruneton, 2009**).

➤ Les acides hydroxybenzoïques

Ces acides sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁, ils existent sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins (tableau II) (**Gresele et al., 2001**).

Tableau II : Principaux acides hydroxybenzoïques (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

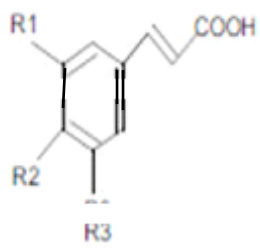
Structure chimique	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acides benzoïque
	H	H	H	H	Acide Hydroxybenzoïque
	H	H	H	H	Acide protocatéchique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanilique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide synergique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	H	OH	H	OH	Acide gentisique

➤ Les acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérivés de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique (tableau III) sont l'acide p-coumarique (et ses isomères les acides o- et m- coumariques) et les acides caféïques, féruliques et sinapiques. L'ensemble est souvent rapporté sous le nom commun de « phénylpropanoïdes ». Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent

généralement sous forme d'esters (avec le glucose, l'acide quinique, l'acide tartrique etc...) ou de glycosides (Lafay et Gil-Izquierdo, 2008).

Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acidecinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide cafeique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide cinapique

3.2.2. Les coumarines

Ces composés sont de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines ont une structure de base (C₆-C₃) dérivent des acides hydroxycinnamiques (figure II), de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférones ou ombelliférones, l'aesculétines, la scopolétine, dont les substitutions correspondent, respectivement, aux acides : p-coumariques, caféiques et féruliques. Signalons également la fraxétine et la daphnéline (Macheix et al., 2005).

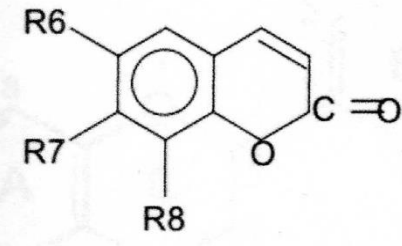
	R6	R7	R8	Acides phénoliques
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétol
	OCH3	OH	OH	Fraxétol
	H	OH	OH	Daphnétole

Figure 2 : Principaux types de coumarines (Macheix et al., 2005).

Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et seulement constituer un moyen de défense de type phytoalexique. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (**Vivas de Gaulejac, 2001**).

3.2.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces diverses structures se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (**Rice-Evans et al., 1996**).

➤ Répartition

Les flavonoïdes sont surtout abondants chez les plantes supérieures, particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées (**Paris et Hurabielle, 1980**).

Ils sont fréquents aussi chez les Bryophytes (Mousses et Hépatiques), majoritairement des O et C-Hétérosides de flavones et des dérivés O-uroniques.

Chez les Ptéridophytes la variété structurale des flavonoïdes n'est guère plus grande, les Psylotales et Sélaginellales étant caractérisées par la présence de biflavonoides, les Equistéales par celle de proanthocyanoides. Les O-hétérosides de flavanols dominant chez les fougères qui, pour certaines, élaborent également les chalcones ou chez les Gymnospermes qui sont riches en proanthocyanidols. Ils sont remarquablement constants et l'on note la présence, chez les Cycadales et les Coniférales. C'est chez les Angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale : ainsi, une trentaine de types flavoniques ont pu être identifiées chez les Astéracées (**Bruneton, 1999**).

➤ Localisation

Présents dans les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes feuilles et boutons floraux (**Paris et Hurabielle, 1980**).

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles, s'accumulent dans des vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle (**Bruneton, 1999**).

➤ Structure chimique et classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune ce qui explique le fait qu'ils possèdent le même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃. Ils peuvent être groupés en plusieurs classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (figure 3).

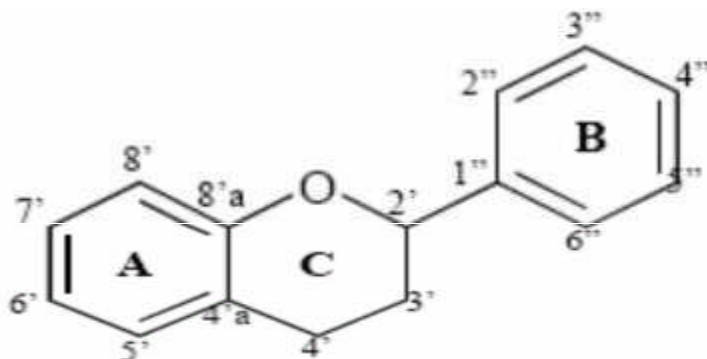


Figure 3 : Structure générale des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011).

➤ Utilisations thérapeutiques

Selon (Bruneton, 1999), les flavonoïdes peuvent être utilisés dans :

- Traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veino lymphatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences des primo-décubitus).
- Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.
- Amélioration des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau.
- Traitements des métrorragies lors de la contraception par micro progestatifs et des métrorragies dues au port du stérilet.
- Proposé dans les troubles impliquant la circulation rétinienne et/ou choroïdienne.
- Traitement du lymphoedème du membre supérieur après traitement radio-chirurgical du cancer du sein.

3.2.4. Les anthocyanes

Les anthocyanes ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (Catier et Roux, 2007).

Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavonoïde » chargé positivement (C₆-C₃-C₆). Ce dernier portera le nom d'anthocyanine ou d'anthocyanidine suivant qu'il soit glycosylé ou non (Vivas de Gaulejac, 2001).

Elles varient selon le nombre et la position des différents groupements hydroxyles et méthoxyles, la nature, le nombre et la position des sucres et l'acylation éventuelle de ces sucres.

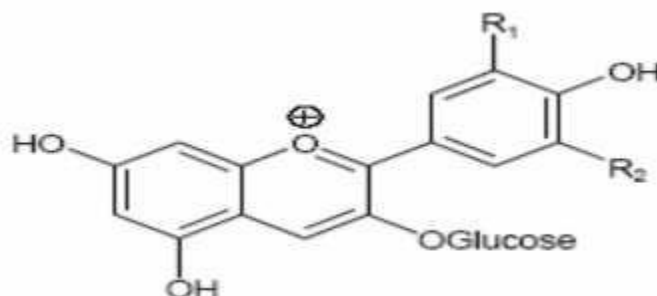


Figure 4 : Structure des Anthocyanosides (Collin et Crouzet, 2011).

3.2.5. Les tanins

Ils sont appelé communément « Tanins », des substances d'origine végétale, non azotées, des structures polyphénoliques, solubles dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu solubles dans l'éther, des faveurs astringentes et ayant la propriété commune de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible et imperméable en se fixant sur les protéines. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000 Da. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes ; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides (**Paris et Moyses, 1976**).

Les tanins sont très importants dans l'industrie des cuirs, ils agissent en donnant des combinaisons insolubles avec les protéines et rendent ainsi les peaux moins perméables à l'eau et imputrescibles (**Paris et Hurabielle, 1980**).

➤ Répartition et localisation

Les tanins très répandus dans le règne végétal, sont particulièrement abondants dans certaines familles ; exemples : Cupulifères, Polygonacées, Rosacées, Légumineuses, Myrtacées, Rubiacées (**Bruneton, 1987**).

Ils peuvent exister dans divers organes : racines ou rhizomes (Ratanhia, Rhubarbe), écorce (Chêne, Quinquina), bois (Acacia à cachou). Cependant, on note une accumulation dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologique (Galles) (**Paris et Hurabielle, 1980**).

On les rencontre dans les vacuoles des cellules, souvent combinés à d'autres substances : alcaloïdes, protéines, oses (Tanosides), parfois dans des cellules spécifiques (idioblastes) : ils sont caractérisés par leur coloration brune ou verdâtre ou brune bleuâtre avec des sels

ferriques. La teneur en tanins peut être très élevée : 50% à 70% dans les noix de galles, 20% dans les péricarpes du noyer, la racine de bistorte, 15% dans la racine de ratanhia etc... (**Paris et Moyse, 1976**).

➤ **Structure chimique et classification**

Nous distinguons habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique, les tanins hydrosolubles et les tanins condensés.

3.2.5.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des Oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol. Le sucre est très généralement le glucose. L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques. Soit l'acide hexahydroxydiphénolique, dans le cas des tanins classiquement dénommés tanins ellagiques (**Bruneton, 1999**).

3.2.5.2. Tanins condensés

Les tanins condensés ou tanins catéchiques sont des substances qui ne sont pas hydrolysées par les acides, ni par la tannase. Les acides forts à chaud ou les agents d'oxydation les convertissent en substances rouges ou brunes, insolubles dans la plupart des solvants. Par distillation sèche, ils fournissent du pyrocatechol. Ces tanins dérivent des catéchols par condensation de molécules et ils sont d'ailleurs toujours accompagnés de catéchols dans les plantes fraîches (**Paris et Moyse, 1976**).

➤ **Utilisations thérapeutiques**

Les drogues à tanins servent surtout en thérapeutique pour leurs propriétés astringentes et anti diarrhéiques. Il s'ajoute une action vaso-constrictrice des petits vaisseaux, d'où l'emploi contre les hémorroïdes, les blessures superficielles. Les extraits tanniques sont aussi anti-inflammatoires. Les plantes à tanins sont employées contre les diarrhées (Ratanhia, Salicaire). Elles peuvent avoir l'action antiseptique, antifongiques, antibactériens et antiviraux. Les drogues à tanins sont utilisées comme antiseptiques notamment dans les maladies pulmonaires (**Paris et Moyse, 1976**).

3.3. Propriétés biologiques des polyphénols

3.3.1. Chez les végétaux

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions :

- Certains aspects de la physiologie de la plante : ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les insectes et les oiseaux pollinisateurs et disperseurs de graines. Ils interviennent aussi dans la qualité alimentaire des fruits en déterminant leur saveur. Ainsi, les flavanones sont responsables de l'amertume des *Citrus* et les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs. Ils sont aussi responsables de la lignification (**Dubois et al., 1977**).

-Les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique : représentant un système de défense contre les microorganismes pathogènes par interactions moléculaires avec les bactéries, les champignons, les parasites et les insectes. Les polyphénols sont aussi connus pour leurs effets protecteurs contre le rayonnement UV en absorbant à la fois ces radiations et en éliminant les espèces réactives de l'oxygène formées (**Heimeur et al., 2004 ; Macheix et al., 2005**).

3.3.2. Chez l'homme

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire.

Un encouragement à la consommation d'aliments d'origine végétale riches en polyphénols constitue désormais une des principales recommandations en santé publique. En effet, les polyphénols pourraient permettre de prévenir de nombreuses pathologies en raison de leurs diverses propriétés physiologiques (**Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007**).

3.3.2.1. Activités antibactérienne des polyphénols

Il est connu que le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. Mais, la consommation à grande échelle de ces « médicaments » a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouveaux substituts, surtout les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration dans les recherches médicales (**Ali-Shtayeh et al., 1998**).

La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une sources d'inspiration de nouveaux

médicaments à base des plantes (**Billig et Sherman,1998**), sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les polyphénols sont reconnus par leurs toxicités vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**). La toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytique par les composés oxydés probablement par les interactions non spécifiques avec les protéines (**Masson, 1987**).

Beaucoup d'études ont été faites pour l'évaluation des propriétés antibactériennes, des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales.

Les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (**Daglia, 2012**), il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces *in vitro* contre les microorganismes. Les propriétés antimicrobiennes de la propolis ont été attribuées aux composés de la catégorie des flavonols et flavanones. En effet, avec leur aptitude à inhiber la germination des spores de plantes pathogènes, ils sont d'excellents candidats pour lutter contre les champignons pathogènes chez l'Homme.

La capacité des tanins à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes (**Cowan, 1999**).

➤ **Caractéristiques des souches bactériennes utilisées**

• ***Escherichia coli***

Ce genre comprend 5 espèces, mais *Escherichia coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents. *Escherichia coli*, un hôte commun de l'intestin de l'homme (10^8 /g de selles), et des animaux ; elle est recherchée à ce titre, comme genre témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments. A l'intérieur de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastroentérites et diarrhées) leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *Escherichia coli* entérotoxigène (diarrhées infantiles), *Escherichia coli* entérotoxino-gène (tourista), *Escherichia coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *Escherichia coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *Escherichia coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur). D'autres responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes (**Leclerc et al., 1995**).

- ***Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10% et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs. Les staphylocoques sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils le sont plus fréquemment et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères. Il existe une certaine relation entre les espèces de staphylocoques et l'hôte qui les héberge. *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus fréquente et la plus abondante sur les surfaces cutanées de l'homme. *Staphylococcus aureus* est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle. Les staphylocoques ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *Staphylococcus aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entéocolites post-antibiotiques), septicémiques. *Staphylococcus epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales (Leclerc et al., 1995).

3.3.2.2. Activité antioxydante

Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, et avec la plus grande fréquence, les polyphénols, et en particulier, les flavonoïdes. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives (Rice-Evans et al., 1995).

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités anti-allergiques, anti-atherogéniques, anti-inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, anticarcinogéniques, anti-thrombotiques, cardioprotective et vaso-dilatatoire (Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la

destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (**Pulido et al., 2000 ; Nijveldt et al., 2001**).

En effet, les polyphénols font partie de ce que l'on appelle les phytomicronutriments.

Ce sont les antioxydants les plus abondants dans les aliments puisque l'homme en consomme environ 1 g/jour, soit près de dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de vitamine E ou de caroténoïdes (**Scalbert, 1991**).

Ainsi, les propriétés antioxydants ou anti-inflammatoires des polyphénols participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, ostéoporose (**Macheix et al., 2005 ; Sarni-Machando et Cheynier, 2006**).

➤ **Stress oxydatif**

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicale est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydatif », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Favier, 2003**).

➤ **Agents du stress oxydant**

Les agents responsables du stress oxydant font parties de la famille des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (EROA). La catégorie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupe des radicaux libres (radical anion superoxyde O_2^- , radical hydroxyle $OH\cdot$...) et des espèces oxygénées comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le dioxygène singulet 1O_2 Les ERO sont générés en permanence par l'organisme, en quantité limitées, soit en tant que coproduits de la respiration mitochondriales (déchets), soit pour remplir une fonction bien précise. Un exemple connu depuis assez longtemps est la fabrication massive de radicaux libres lors de la phagocytose (**Holevinsky et Nelson, 1995**), afin de détruire les tissus des bactéries nuisibles. Des ERO moins réactifs (superoxyde et monoxyde d'azote) servent de médiateurs régulant notamment la vasodilatation capillaire et sont impliqués dans les communications inter et intracellulaires. Citons enfin l'apoptose (mort programmée des cellules, tumorales en particulier), la fécondation de l'ovule, le fonctionnement de certains neurones... comme autant de processus naturels capitaux qui nécessitent la présence de radicaux libres (**Favier, 2003**).

➤ Les conséquences du stress oxydant

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires, induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information. La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, la cystéine et la méthionine. Les EOR sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des EOR. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN, mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogenèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppressions (**Favier, 2003**).

➤ Les maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré.

Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telle que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. (**Favier, 2003**).

➤ Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**).

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire. Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur (**Yaacoub, 2009 ; Hellal, 2011**).

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Matériels biologique

➤ Matériel végétal

Notre étude consiste à l'extraction, dosage et à l'évaluation des activités biologiques des composés phénoliques extraits à partir des feuilles et des fleurs séchées de *Marrubium Vulgare L.* au niveau des laboratoires pédagogiques, de microbiologie pour l'activité antibactérienne et de physicochimique pour l'étude phytochimique et l'activité antioxydante.

Nous avons récolté les feuilles et les fleurs du Marrube blanc (*Marrubium Vulgare L.*) durant la période allant du mois d'Avril au mois de Mai 2018, dans la région de Makouda.



Figure 05 : Région de prélèvement de la plante (Google Maps)

➤ Souches bactériennes

Nous avons utilisé deux souches bactériennes, *Escherichia Coli* et *Staphylococcus aureus*.

1.2. Méthodes utilisées

Nous avons séché les feuilles et fleurs à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant trois semaines. Après le séchage, nous avons broyées les feuilles et les fleurs en poudre. Cette dernière nous l'avons stockée dans un flacon en verre couverte avec de l'aluminium jusqu'à son utilisation.



Figure 6 : préparation de la poudre

1.2.1. Préparation de l'extrait brut méthanolique par macération

➤ Principe

La macération consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante et qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles.

➤ Méthode

Nous avons macéré 10 g de la poudre des feuilles et fleurs de *Marrubium vulgare L.* dans 100 mL de méthanol sous agitation pendant 24h à température ambiante. Nous avons récupéré un extrait méthanolique par filtration à l'aide de papier filtre. Ensuite nous avons effectué deux lavages successifs du marc obtenu avec 100 mL de méthanol, puis on récupéré le deuxième extrait méthanolique par filtration à l'aide d'un papier filtre, ainsi nous avons mélangé les deux extraits. Le méthanol a été éliminé du mélange par évaporation sous hotte permettant ainsi d'obtenir un résidu caractérisé par une couleur verte à brune que nous avons ensuite repris avec 5mL du méthanol. Nous avons conservé le résidu dans un flacon en verre bien couvert avec du papier aluminium à -4°C jusqu'à utilisation (**Kahlouch-Riachi, 2014**), les étapes de la macération sont résumées dans la figure ci-dessous :

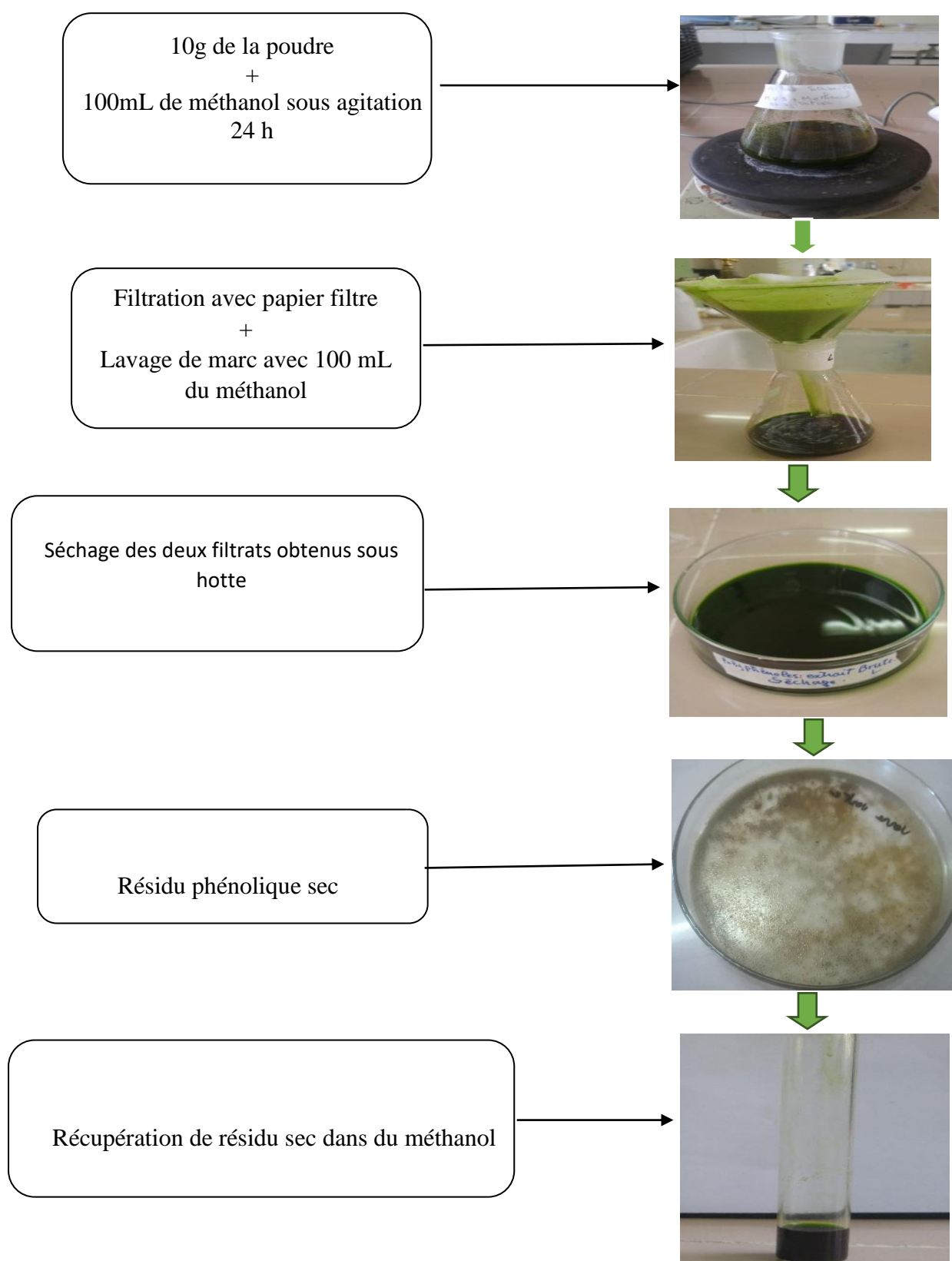


Figure 07 : Les différentes étapes d'extraction de l'extrait brut méthanolique (Labo physico-chimique).

1.2.2. Extraction des trois types de flavonoïdes

➤ Principe

Il s'agit d'extraction de 3 classes de flavonoïdes à partir des feuilles séchées et broyées du marrube blanc (Les C-glycosides, les Anthocyanes, les Aglycones).

La technique utilisée est celle suivie par (**Leberton, 1967**). Elle consiste à l'extraction et la séparation des flavonoïdes par hydrolyse acide et à chaud de la poudre végétale (la liaison C-O-C des O-glycosyl-flavonoïdes est très fragile et se rompt à l'hydrolyse acide en libérant les aglycones ; par contre la liaison C-C des C-glycosyl-flavonoïdes est très résistante à ce type d'hydrolyse) afin d'obtenir les composés qui sont localisés dans les deux fraction suivantes :

- Une fraction d'aglycones et d'acides phénols par l'extraction préliminaire à l'éther diéthylique.
- Une fraction de C-glycosides et d'Anthocyanes récupérée par l'extraction à n-butanol.

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés contenus dans les feuilles et les fleurs de la plante selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer ses flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés)

➤ Méthode

1 g de matériel végétal sec a été ajouté à 80 mL d'HCl (2N). Après agitation mettre dans un bain marie régler à 90°C pendant 40 min avec insufflation d'air toutes les 10min, (l'oxygène permet l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines correspondantes).

70 mL d'éther diéthylique sont ajoutés au mélange après refroidissement dans une ampoule à décanter. Deux phases sont obtenues, l'une supérieure dite épiphase et l'autre inférieur dite hypophase :

- **Épiphase étherée**

De couleur jaune verdâtre (figure 09), elle contient les aglycones et les acides phénols. Elle est récupérée dans un bécher et évaporer à l'air libre. Le résidu sec est repris par 5 mL d'éthanol, puis conservé au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible, la figure 08 résume les différentes étapes

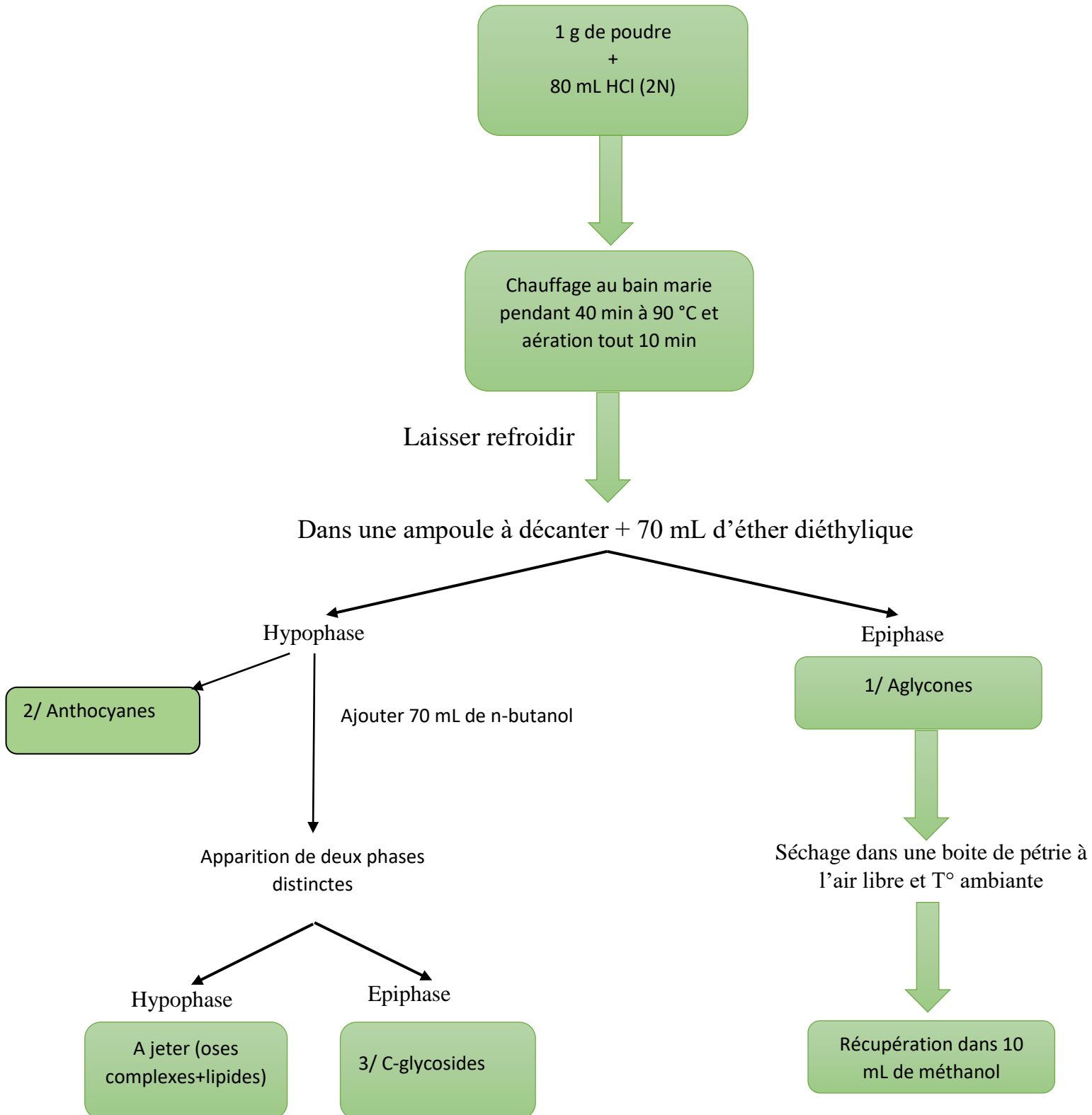


Figure 08 : Diagramme illustrant les différentes étapes suivies lors de l'extraction des Aglycones, Anthocyanes et c-glycosides (Lebreton, 1967).

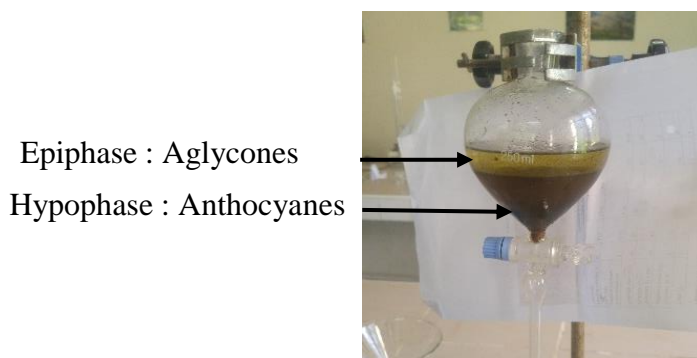


Figure 09 : Les Aglycones et Anthocyanes (Labo physico- chimique)

- **Hypophase acide**

De couleur rougeâtre (figure 09), elle contient les anthocyanes, qui sont séchées et récupérées avec l'éther diéthylique, des c-glycosides et les oses simples. 70 mL de n-butanol sont ajoutés au reste de l'hypophase dans une ampoule à décanter. Le n-butanol forme dans l'hypophase deux phases, une épiphase qui est considérée comme des C-glycosides qui est séchée et récupérée avec le n-butanol et une hypophase qui a été jetée (figure 10). Conservé par la suite les C-glycosides et les anthocyanes au frais avant d'être soumis à une analyse quantitative par spectrophotométrie UV-visible.

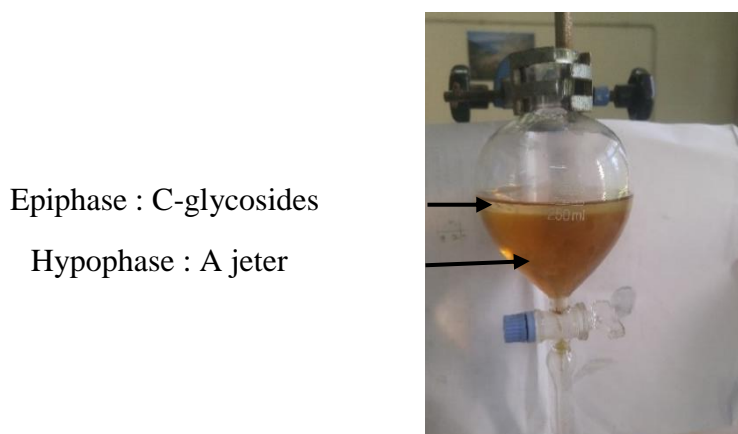


Figure 10 : Les C-glycosides (Labo physico- chimique)

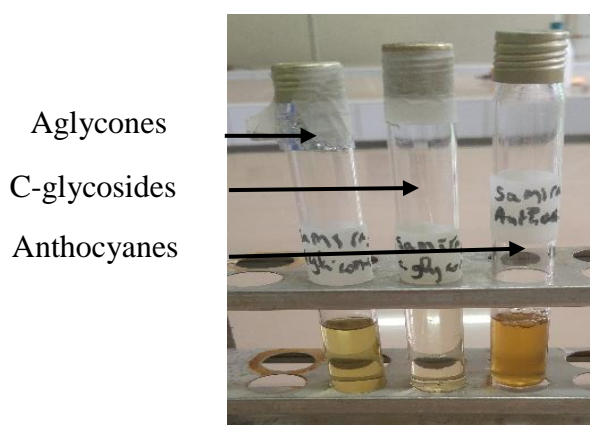


Figure 11 : Les trois extraits (Aglycones, C-glycosides et Anthocyanes) (Labo physico-chimique)

1.2.3. Analyse qualitative des quatre extraits

➤ Détection des composés phénoliques (réaction au FeCl_3)

Cette réaction est réalisée pour la détection des composés phénoliques.

Quelques gouttes de FeCl_3 10% sont ajoutées à 2 mL d'extrait brut méthanolique dans un tube à essai (Bekro et al., 2007).

La présence des composés phénoliques dans les extraits est indiquée par l'apparition du couleur vert noirâtre.

➤ Détection des Flavonoïdes

A 1 mL d'extrait est ajouté 1 mL d' HCl concentré puis 3 morceaux de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge, rose ou orange (Karumi et al., 2004).

➤ Détection des Anthocyanes

A 1 mL d'extrait est ajouté 1 mL d' HCl (2N). Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au bleu-violacée par addition d'ammoniac, cela indique la présence des anthocyanes (Debray et al., 1971).

➤ Détection des Flavanols et flavanones

1 mL d'extrait est ajouté à 200 μL d' HCl pur et quelques fragments de Mg sont additionnés au mélange. La présence de flavanols est indiquée par l'apparition de la couleur rouge et la présence des flavanones est indiquée par l'apparition de la couleur rouge violacée.

1.2.4. Analyse quantitative

- **Etude par spectrophotométrie (UV-visible)**

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode d'analyse couramment utilisée dans les laboratoires. Elle est basée sur la capacité des molécules à absorber les radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm avec l'UV lointain entre 10 et 200 nm, le proche UV entre 200 et 400 nm et le visible entre 400 et 800 nm. La spectroscopie UV-visible présente un large domaine d'application. Elle est utilisée en chimie minérale, chimie organique, biochimie, analyses médicales et analyses quantitatives. Cette large utilisation est surtout due à sa grande sensibilité (limite de détection 10^{-5} M), sa précision (1-5% d'erreur), sa rapidité et sa simplicité d'utilisation (Ghnimi, 2015).

- **Principe**

La spectrophotométrie consiste surtout à mesurer l'absorbance dans le domaine UV/Visible. D'une manière générale, la solution dont on désire étudier l'absorption est placée dans une cuve en quartz à faces transparentes et parallèles, et qui est traversée par un faisceau optique perpendiculairement à ces faces. Après avoir fixé une longueur d'onde, la lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse la cuve contenant la solution et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde (Ghnimi, 2015).

➤ **Dosage des polyphénols totaux**

Les composés phénoliques totaux ont été estimés selon la méthode de (Singleton et al., 1999).

150 μ l des polyphénols totaux (extrait brut méthanolique) ont été mélangés avec 250 μ l du réactif du Folin-Ciocalteu et 3 mL d' H_2O . Le mélange est incubé à température ambiante pendant 5 min. Ensuite 750 μ l de Na_2CO_3 ont été ajoutés au mélange.

Les composés phénoliques totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre à UV (ultra-violet) visible après 2h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité à une longueur d'onde 765nm. La quantification est faite selon une gamme-étalon de l'acide gallique (0,03 à 0,3 mg/mL) dans les mêmes conditions. Un témoin négatif avec du méthanol est préparé dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g de matière sèche.

➤ Dosage des trois types de flavonoïdes

Une méthode de colorimétrie est utilisée, basée sur la propriété de certains composés qui absorbent davantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dans la spectrophotométrie UV-visible (**Plummer, 1989**) ; elle permet de réaliser des dosages grâce à loi de **Beer Lambert** dont le principe est le suivant :

Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le soluté. L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log_{10}(I_0/I)$$

➤ Dosage des proanthocyanes

La lecture des extraits s'établit par spectrophotométrie à 520nm juste après extraction car elle se dégrade rapidement à la lumière. La teneur absolue en anthocyanes est calculée par la formule suivante dont le coefficient correctif, est égale à 6 (**Lebreton et al., 1967**).

$$T(\text{mg/g}) = 5,2 \cdot 10^{-2} \cdot \text{DO} \cdot V \cdot d/p$$

DO : densité optique

V : volume de la phase méthanolique

d : facteur de dilution

P : poids sec du matériel végétal hydrolysé.

➤ Dosage des C-glycosylflavones

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotométrie à 340nm et la teneur absolue est calculée par la formule suivante :

$$T(\text{mg/g}) = 2,37 \cdot 10^{-2} \cdot \text{DO} \cdot V \cdot d/p$$

➤ Dosage des aglycones flavoniques

Les flavonoïdes ayant un hydroxyle (OH) libre en position 3 et 5 réagissent avec les métaux. Le chlorure d'aluminium (AlCl_3) forme un complexe avec les flavones et/ou les flavanols. Pour déterminer la teneur en aglycones, la méthode du dosage différentiel utilisée, est basée sur deux dilutions :

-La 1^{ère} dilution se fait dans de méthanol (extrait étheré + éthanol 95°).

-La 2^{ème} dilution se fait dans la solution d' AlCl_3 (extrait étheré + AlCl_3 dans l'éthanol 95°).

La solution d' AlCl_3 est préparée par le mélange de 1g de chlorure d'aluminium dans 100 mL d'éthanol 95°.

Pour le dosage des aglycones flavoniques, 1 mL d'extrait étheré est ajouté à 4 mL d'éthanol à 95° ; pour les Flavonols 1mL d'extrait étheré, 2 mL de méthanol et 2 mL de la solution AlCl_3 sont mélangés, après réaction pendant 15 min, la lecture des aglycones se fera entre 400 et 435nm au spectrophotomètre. Concernant le dosage des aglycones flavoniques (420nm) et des Flavonols (435nm), la formule utilisée est la suivante :

$$T(\text{mg/g}^{-1}) = 1,3 \cdot 10^{-2} \cdot \Delta \text{DO} \cdot V \cdot d/p$$

ΔDO : densité optique au pic différentiel égale à $\text{DO}(\text{AlCl}_3) - \text{DO}(\text{éthanol } 95^\circ)$.

1.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante de nos quatre composés (polyphénols totaux, anthocyanes, C-glycosides et aglycones) extraits à partir de la poudre des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare L.*, deux méthodes sont utilisées : soit par le test de piégeage de radical libre DPPH basé sur un mécanisme de transfert d'atomes d'hydrogènes et/ou transfert d'électrons, soit par la méthode de FRAP basée sur un mécanisme de transfert d'électrons, les méthodes d'évaluation sont résumées dans le tableau V :

Tableau IV : Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante "in vitro"

(Huang et al., 2005 ; Karadag et al., 2009)

Principe des méthodes	Equation du mécanisme spécifique	Exemples
Transfert d'atome d'hydrogène	$\text{AH} + \text{X}^* \rightarrow \text{XH} + \text{A}^*$ AH: antioxydant X* : radical libre XH : radicale libre inhibé A* : antioxydant stable	-Test ORAC (capacité d'absorption des radicaux libres) -Test de Trap (capacité de piégeage des radicaux libres)
Transfert d'électron	$\text{M(III)} + \text{AH} \rightarrow \text{AH}^* + \text{M(II)}$ M(III) : antioxydant AH : radical libre AH* : radical inhibé M(II) : antioxydant stable	-Test FRAP (Pouvoir réducteur de l'ion ferrique) -Test au Folin-Ciocalteu (Analyse des phénols totaux)
Analyses basées sur les deux mécanismes	Les réactions semblent plus complexes et suivent un des deux mécanismes selon la structure des antioxydants.	-Piégeage du radical DPPH* -Réduction du radical-cation ABTS** ou détermination de la capacité antioxydante en équivalent trolox (TEAC).

1.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante par le test de pouvoir de piégeage DPPH

• Le principe

Le principe est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle des piègeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétiques ou naturels (les extraits de plante). Le radical libre DPPH (2,2 diphényl 1 picrylhydrazil) qui est stable et caractérisé par sa couleur violette, se réduit en (2,2 diphényl 1 picrylhydrazine) de couleur jaune (**Maataoui et al., 2006**). Cette réaction est représentée dans le schéma suivant :

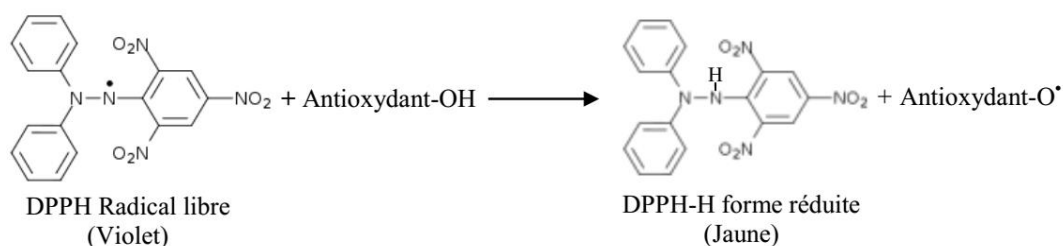


Figure12 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (**Djahra, 2014**).

• Méthode

Nous avons suivi la méthode de (**Sanchez-moreno, 2002**), pour évaluer l'activité antiradicalaire de nos extraits phénoliques utilisant le radical DPPH.

La solution du DPPH est préparée à l'avance par solubilisation de 1,2 mg de DPPH dans 50 mL du méthanol. 1 mL de DPPH est ajouté à 0,5 mL d'extrait à différentes concentrations. Nous avons laissé le mélange à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration.

Des solutions d'antioxydants de référence à partir d'acide ascorbique qui servent des témoins positifs sont également préparées dans les mêmes conditions. Le contrôle que nous avons préparé est constitué de DPPH et du méthanol.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de nos quatre extraits polyphénoliques a été estimé par spectrophotométrie à 517 nm.

➤ Evaluation du potentiel antiradicalaire par le calcul de l'IC₅₀

Nous estimons le potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC₅₀ (concentration inhibitrice 50%). Ce dernier représente la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Nous avons calculé les IC graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torre *et al.*, 2006).

Selon (Brand *et al.*, 1995) le pourcentage de piégeage de DPPH est calculé selon la formule suivante

$$\text{Le \% de piégeage du radical DPPH} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : L'absorbance en absence de l'échantillon.

A₁ : L'absorbance du mélange en présence de l'échantillon.

1.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode de FRAP

• Principe

Le pouvoir réducteur est basé sur la transformation de Fe³⁺ de couleur jaune présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en Fe²⁺ de couleur bleu vert en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de donner des électrons. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde 700 nm. Cette réaction est représentée dans le schéma suivant :

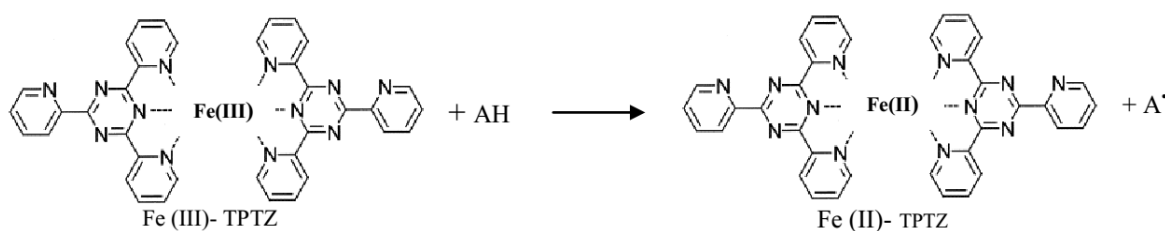


Figure13 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe (III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2014).

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

- **Méthode**

Nous avons suivi la méthode de (Yildirim et al., 2001)

1 mL de chaque extrait à différentes concentrations est ajouté à 1,25 mL du tampon phosphate à pH 6,6, auquel nous rajoutons 1,25 mL de ferricyanure ($K_3FeC_6N_6$) à 1%. Tous les tubes sont mis à incubés à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement à température ambiante, 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction puis la centrifugation des tubes à 4000 tours pendant 20 min. 1 mL d'eau distillée est ajouté à 1 mL du surnageant prélevé des tubes. Également 200µl d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$) à 0,1% sont ajoutés au mélange.

Des solutions d'antioxydants de référence (Acide ascorbique) qui servent de témoins positifs et ainsi que le témoin négatif (blanc, avec du méthanol) ont été préparés dans les mêmes conditions.

Les DO des extraits et d'acide ascorbique sont estimées par spectrophotométrie à une longueur d'onde 700 nm.

1.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. En conséquence il y a la décharge du contenu cytoplasmique à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction (Wendakoon et Sakaguchi, 1995 ; Tsuchiya et al., 1996).

Dans cette partie de notre travail nous avons essayé d'évaluer le potentiel antibactérien de nos quatre extraits obtenus à partir des feuilles de *Marrubium Vulgare* L. sur deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*).

1.4.1. La méthode de diffusion sur milieu solide (MH)

➤ Les étapes de la méthode sur les extraits de *Marrubium vulgare* L.

Nous avons adopté la technique de diffusion sur milieu solide, à partir des disques imprégnés de nos extraits (polyphénols totaux, anthocyanes, C-glycosides et aglycones), extraits des feuilles et des fleurs du *Marrubium vulgare* L. Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance bactérienne par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque (Sharififar et al., 2007).

➤ Préparation du milieu de culture

Les milieux de culture utilisés pour les bactéries sont la gélose Mueller-Hinton et la gélose nutritive.

Les souches bactériennes sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 mL de gélose nutritive.

➤ Préparation de la pré-culture

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage à la surface de la gélose nutritive pré coulée dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont ensuite incubées à 37°C dans l'étuve pendant 18 à 24h.

➤ Préparation de la suspension bactérienne

Dans de l'eau physiologique stérile, 3 à 5 colonies similaires bien isolées sont déchargées. Après homogénéisation de la suspension bactérienne, la standardisation est réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. La DO obtenue doit être comprise entre 0,08 et 0,1 ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/mL selon Mc Ferland.

➤ Ensemencement

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller Hinton en surfusion est coulé aseptiquement à raison de 15mL par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne et étaler à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.

➤ Application des disques et incubation

Nous avons déposé les disques stériles imprégnés de chaque extrait à raison de 10µl par disque à l'aide d'une pince sur les boîtes de Pétri coulées avec la gélose (MH). Ainsi que des disques imbibés par les solvants d'extractions (servent de témoins négatifs), également nous avons effectué le dépôt des disques d'antibiotique (Gentamicine). Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C pendant 24 h.

Nous avons utilisé la même méthode pour la détermination de la CMI mais avec des dilutions différentes des extraits. En prenant sept tubes à essai dont nous avons mis 2 mL d'extraits dans le premier tube et 1 mL de solvant d'extraction dans les autres tubes, puis

prendre 1 mL du premier tube et le déposer dans le deuxième tube, ensuite prendre 1 mL de ce dernier et l'ajouter au troisième tube, continuer les dilutions de la même façon jusqu'au 7ème tube.

Dans la même boîte de pétri nous avons déposé 7 disques chacun imbibés de l'une des solutions diluées. Ensuite Les boîte sont incubées pendant 18 h, à la fin la lecture des résultats par la mesure des diamètres d'inhibitions (figure 14).

Nous avons appliqué cette méthode pour les trois extraits (polyphénols totaux, anthocyanes et les C-glycosides). La lecture des résultats se fait par mesure de la zone d'inhibition en (mm).

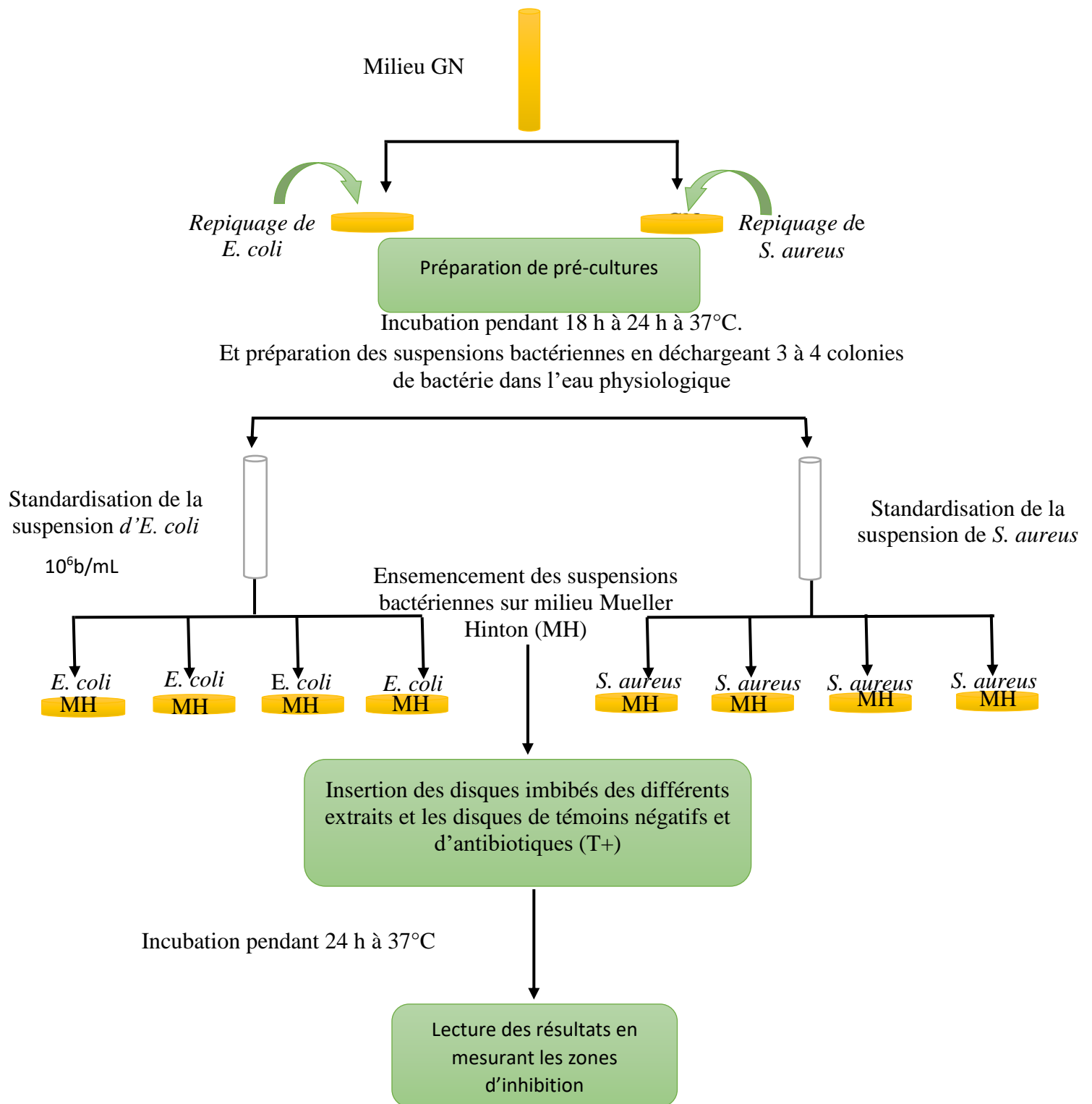


Figure14 : Diagramme illustrant les étapes de l'activité antibactérienne

2. Résultats et discussion

2.1. Screening phytochimique

L'analyse qualitative de la poudre des plantes qui a pour but la mise en évidence de la présence de certains types de métabolites secondaires, est faite par des réactions de colorations sur tubes à essais. Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau V : Métabolites secondaires mis en évidence au niveau des feuilles et des fleurs de *Marrubium vulgare L.*

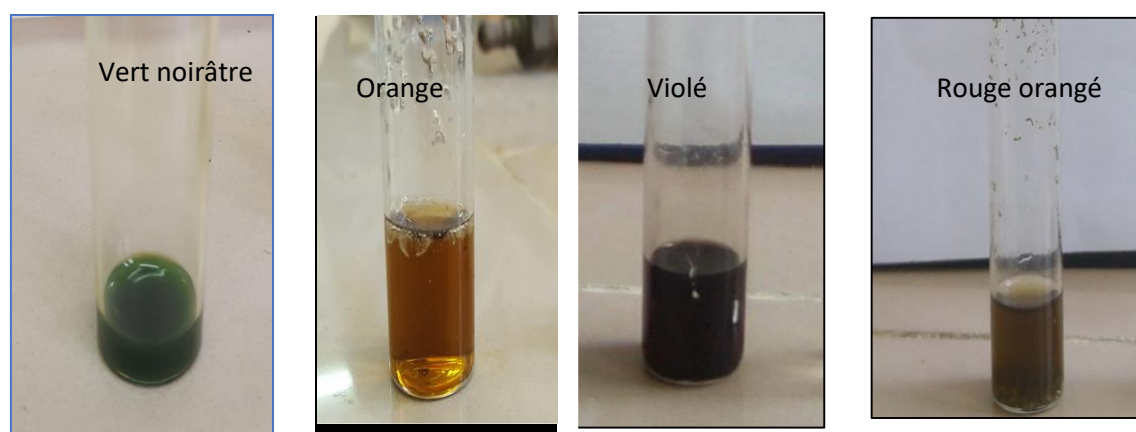
Principes actifs	Présence ou absence
Polyphénols totaux	(++)
Flavonoïdes totaux	(+++)
Aglycones	(++)
Anthocyanes	(+)
C-glycosides	(+)

(+++): Riche

(++): Présence

(+): Traces

En effet les tests de confirmation nous ont donné des couleurs spécifiques à chaque composé phénolique comme c'est bien illustré sur les figures suivantes :



Polyphénols totaux Flavonoïdes totaux Anthocyanes Flavonols et flavanones

Figure 15 : résultats du test Screening phytochimique de *Marrubium vulgare L.*

Sur l'ensemble des résultats obtenus, nous remarquons que la plante étudiée est plus ou moins riche en composés phénoliques. Les tests phytochimiques réalisés nous ont permis d'avoir une idée sur la composition chimique de *Marrubium vulgare L.* Cette dernière renferme quatre composés des polyphénols : polyphénols totaux, la plante est riche en flavonoïdes, des anthocyanes, et des Flavonols et flavanones sous forme de traces (les C-glycosides et les aglycones).

2.2. Rendement de l'extrait méthanolique

Le rendement de l'extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé via l'équation : $R (\%) = (PEB / PMVS) \times 100$

R (%) : Rendement

PEB : poids de l'extrait brut après l'évaporation du solvant

PMVS : poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction (**Harborne, 1998**)

Le rendement d'extraction à partir des feuilles et des fleurs qui ont été calculés sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VI : Rendement de l'extrait méthanolique

Extrait brut	Poids de l'extrait (g)	Pourcentage de l'extrait (%)
Droque végétale	1,5	15

La préparation de l'extrait brut méthanolique de notre plante a donné un rendement de l'ordre de 1,5 g et un pourcentage de 15 %.

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 (**Falleh et al., 2008**).

Egalement les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des méthodes utilisées telle que la macération sous agitation qui permet d'accélérer le processus d'extraction. De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permettent d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou

modification probable dues aux températures élevées utilisées lors de l'extraction (Djahra, 2014). Ce rendement est influencé par la composition chimique des plantes (Nawaza et al., 2006 ; Falleh et al., 2008).

2.3. La teneur des extraits des feuilles et fleurs de *Marrubium vulgare L.*

2.3.1. La teneur de l'extrait brut méthanolique

Les teneurs en composés phénoliques obtenues à partir des extraits méthanoliques sont estimées grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec un extrait de référence, l'acide gallique à différentes concentrations (Annexe 01). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g de matière sèche (mg EAG/g de MS)

Les résultats de dosage de phénols totaux révèlent que l'extrait brut méthanolique de l'espèce *Marrubium vulgare L.* contient une teneur de l'ordre de $2,23 \pm 0,114$ mg équivalent acide gallique par g de matière sèche.

2.3.2. Teneur en extraits flavonoïdiques

Les teneurs en extraits flavonoïdiques sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau VII : teneurs des extraits flavonoïdiques

Extraits	Teneur des extraits en (mg. g ⁻¹)
Anthocyanes	1,266
C-glycosides	0,385
Aglycones	0,0331

Le test screening phytochimique de la plante étudiée a révélé l'existence des polyphénols totaux, des flavonoïdes, C-glycosides, aglycones et les anthocyanes. Ceci est confirmé par les résultats de l'étude de (Elberry et al., 2011).

Les mêmes résultats ont été trouvés par (Djahra, 2014). En effet ce dernier a mis en évidence la présence des anthocyanes, des flavonoïdes ainsi que d'autres molécules comme les saponines, les tanins catéchiques, les terpènes et stérols à partir du test screening phytochimique.

Nos résultats concordent avec ceux qui sont entrepris sur de nombreuses espèces de *Marrubium* qui contiennent des flavonoïdes et phenylethanoides, diterpénoïdes, de composés phénoliques et huile essentielle trouvés par (Hennebelle et al., 2007 ; Rigano et al., 2007). Les polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables) ont été

quantifiés dans différents organes de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) par **(Bouterfa, 2013)**. Les études phytochimiques effectuées sur le genre *Marrubium* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les iridiodes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes. Selon **(Moussaid, 2012)**, les tests phytochimiques préliminaires effectués sur *Marrubium vulgare* L. étaient de type qualitatif. Il a mis en présence dans les extraits des alcaloïdes, des tanins, des flavonoïdes, des stéroïdes, des saponines triterpènes et composés réducteurs. La même composition a été retrouvée chez la même espèce par **(Warda et al., 2009)**.

Un rendement de 39,2% de l'extrait brut a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par **(Kanyonga et al., 2011)**. C'est un pourcentage nettement supérieur à celui obtenu dans notre cas (15%). Ceci pourrait être due à la technique utilisée par l'auteur (extraction par soxhlet et sous une température de 70 °C).

En effet, **(Su et al., 2006)** ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Selon **(Albano et Miguel, 2011)**, l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules. Par ailleurs, des résultats différents concernant la teneur en polyphénols du *Marrubium vulgare* ont été obtenus à partir des organes végétatifs de la plante. Un taux de 18, 21mg EAG/ml d'extrait a été trouvé par **(Boudjelal, 2012)** et de 17,08 mgEAG/gMS par **(Djahra, 2014)**, une quantité nettement supérieure à celle trouvée dans notre étude (2,23 mgEAG/gMS). Cette variabilité dans les résultats pourrait être liée aux conditions climatiques du biotope de l'espèce ou aux différentes méthodes suivies lors de l'extraction.

Nos résultats montrent une teneur élevée des anthocyanes avec un taux de 1,266 mg/g, par rapport aux C-glycosides dont la teneur est de 0,385 mg.g⁻¹. Les aglycones présentent la plus faible teneur, qui est de l'ordre 0,033mg/g. Les anthocyanes sont les plus présents parmi les flavonoïdes.

2.4. Résultats de l'activité antioxydante

2.4.1. Réduction de fer (FRAP)

Les résultats de test de FRAP et la comparaison entre les absorbances maximales des quatre extraits et d'acide ascorbique sont représentés dans les graphes suivants :

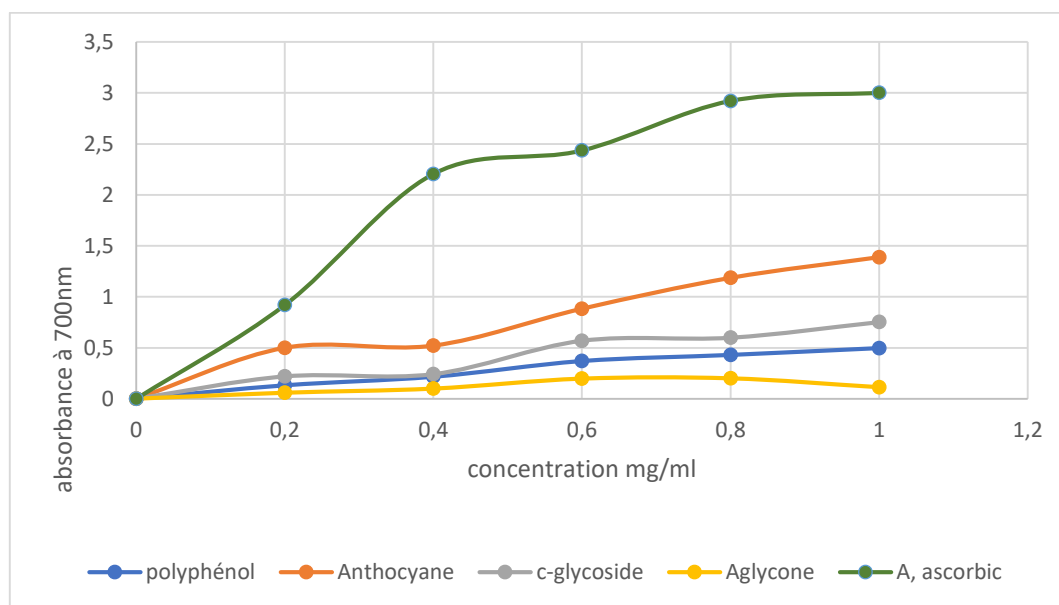


Figure 16 : Pouvoir réducteur des quatre extraits de *Marrubium vulgare L.* (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais) et d'acide ascorbique.

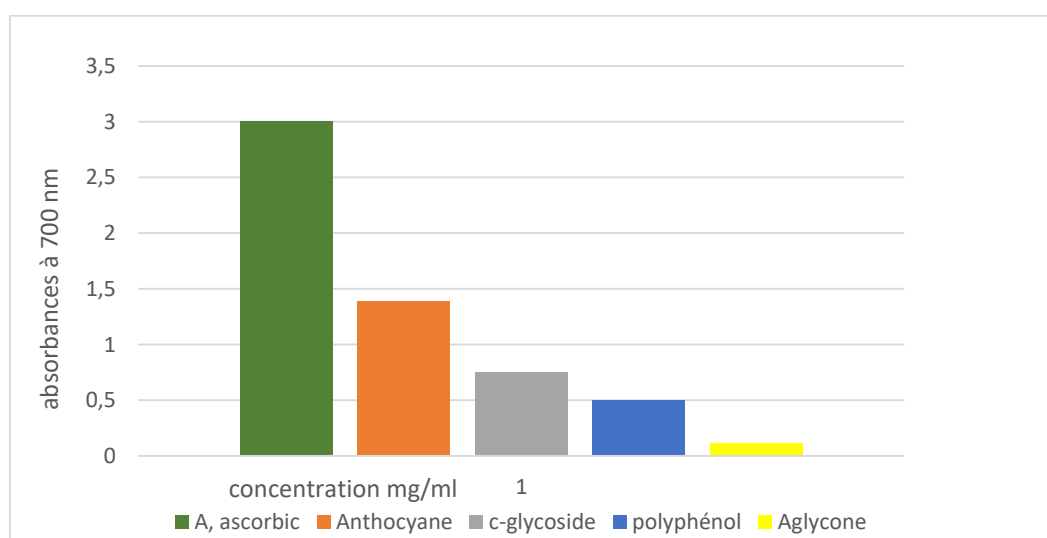


Figure 17 : Comparaison du pouvoir réducteur des quatre extraits et d'acide ascorbique.

Les résultats obtenus dans les figures montrent que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons. Tous les extraits de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celles du produit de référence (acide ascorbique absorbance de 3,011).

Les flavonoïdes sont généralement les plus actifs dont les anthocyanes présentent une densité optique maximale de 1,389 à la concentration 1 mg/mL, suivis des C-glycosides et des polyphénols totaux avec des densités optiques de 0,752, 0,496 respectivement. Les aglycones présentent un faible pouvoir réducteur avec une absorbance de 0,114.

2.4.2. Effet scavenger du radical DPPH

Le DPPH est un radical libre nous permet de déterminer le potentiel de piégeage de nos extraits phénoliques grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations (Yi et al., 2008). L'activité anti radicalaire a été estimée par spectrophotomètre en suivant la réduction du DPPH à 517nm.

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par l'acide ascorbique et les différents extraits sont reportés sur la figure suivante :

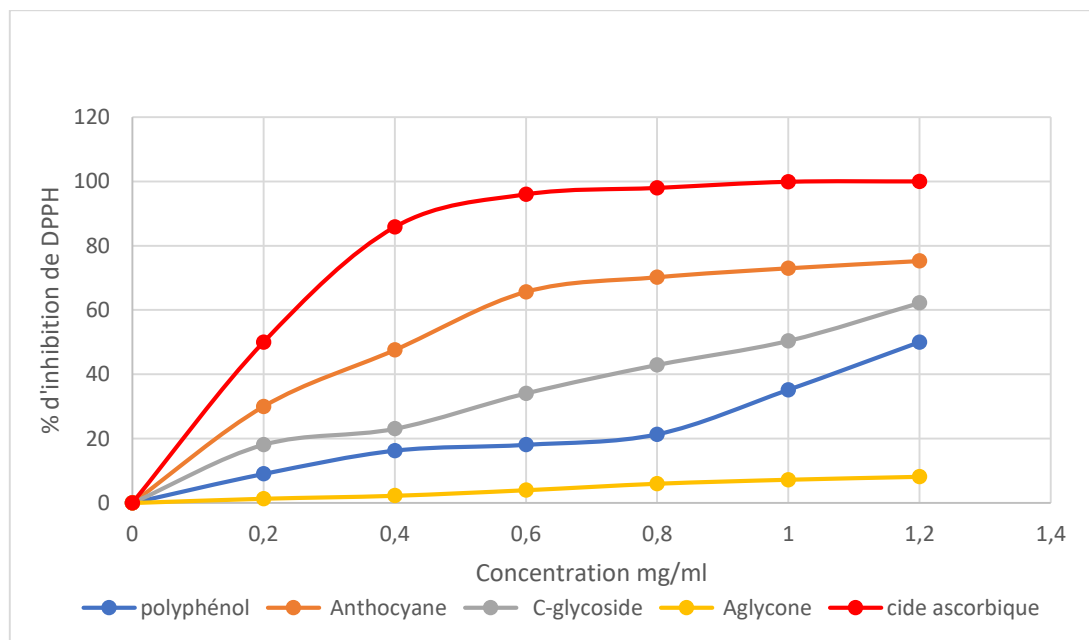


Figure 18 : Piégeage de DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Marrubium vulgare* (Polyphénols totaux, Anthocyanes, C-glycosides et les aglycones) et d'acide ascorbique.

Le graphe illustre l'efficacité des extraits (Acide ascorbique, Anthocyane, C-glycosides, Polyphénols totaux et Aglycones) à piéger le radical DPPH, traduit par le taux d'inhibition (%) à différentes concentrations.

D'après les résultats, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante (elle augmente avec l'augmentation des concentrations d'extraits phénoliques dans le milieu réactionnel). Les anthocyanes semblent avoir une activité antioxydante meilleure que celle provoquée par les polyphénols totaux et les C-glycosides. Les aglycones représentent les composés les moins efficaces dans l'élimination des radicaux libres. Le pouvoir antiradicalaire de nos extraits est nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique.

➤ Evaluation de l'IC50

La CI50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de CI50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (**Pokorny et al., 2001**). La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire, est calculée en utilisant le graphe des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations d'extraits préparés.

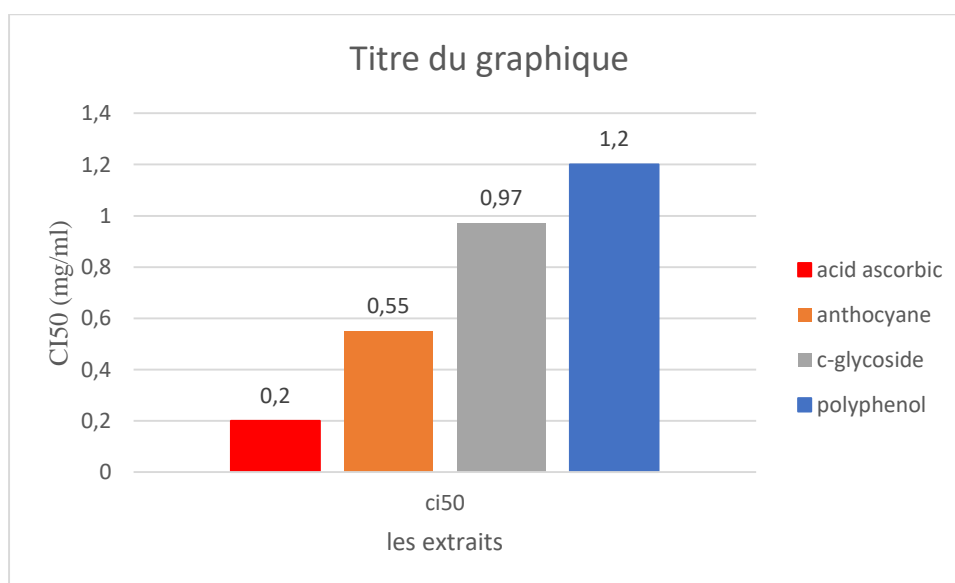


Figure 19 : Comparaison de la CI50 des différents extraits et d'acide ascorbique

Résultats et discussion

Deux de nos extraits révèlent des propriétés antiradicalaires intéressantes (notamment l'extrait d'anthocyanes avec un CI_{50} = 0,55 mg/ml et les C-glycosides avec un CI_{50} = 0,97 mg/mL). Les polyphénols totaux présentent aussi un pouvoir antiradicalaire avec une CI_{50} = 1,2 mg/mL), par contre la CI_{50} des aglycones est indéterminé, c'est dû probablement à sa faible teneur dans l'extrait. La CI_{50} d'acide ascorbique qui est un puissant anti radicalaire, elle est de l'ordre de 0,2 mg/mL. En fonction de leur pouvoir anti-radicalaire, les extraits de l'espèce végétale *Marrubium vulgare L.* sont classés par ordre décroissant : Anthocyanes > C-glycosides > Polyphénols totaux > Aglycones.

Dans notre étude, deux méthodes sont utilisées afin de témoigner de l'activité antioxydante des extraits testés de notre plante : réduction du fer (FRAP) et le piégeage du radical libre DPPH. Nos résultats rejoignent de nombreuses études qui ont évalué l'effet réducteur des ions ferreux à partir d'extraits de diverses plantes. En effet L'étude menée par **(Jeong et al., 2004)** montre que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

Les extraits qui possèdent les meilleurs pouvoirs piègeurs vis-à-vis des radicaux libres (DPPH), montrent également les meilleures capacités réductrices du Fe^{3+} . Cela témoigne vraisemblablement la présence dans nos extraits des molécules antioxydantes pouvant intervenir par deux types de mécanismes réactionnels. Pour le test FRAP, il s'agit d'une réduction du Fe^{3+} , donc basé exclusivement sur un transfert d'électron. Concernant le test DPPH, ce radical en fait peut être neutralisé soit par réduction directe via des transferts d'électrons ou par un transfert d'un atome d'hydrogène **(Ronald et al., 2005)**.

Les résultats obtenus par piégeage du radical libre DPPH dans notre travail révèlent que les Anthocyanes sont les plus actifs (avec une CI_{50} = 0,55). En comparant la CI_{50} des anthocyanes à celui d'acide ascorbique nous remarquons qu'il est inférieur (CI_{50} = 0,2).

Les C-glycosides et les polyphénols présentent aussi des propriétés antioxydantes avec (CI_{50} = 0,98 mg/mL, CI_{50} = 1,2 mg/mL) respectivement. Par contre les aglycones ont un très faible pouvoir antiradicalaire (CI_{50} indéterminé), ceci est probablement lié à leur faible teneur contenu dans l'extrait (0,033 mg/g).

Nos résultats indiquent que l'extrait des polyphénols totaux présente une faible activité antioxydante vis-à-vis du piégeage du DPPH. Ceci n'est pas en concordance avec les résultats de **(Boudjelal, 2012)** obtenus à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare L.* qui montrent une activité antioxydante élevée avec une valeur de CI_{50}

de l'ordre de 0,49 mg/mL. Nous retrouvons aussi, un puissant effet scavenger estimé à partir d'une CI50 de l'ordre de 0,18 mg/mL de l'extrait brut méthanolique d'une autre espèce de *Marrubium* (*Marrubium peregrinum*) qui a été déterminé à partir de la méthode de piégeage du DPPH lors des travaux réalisés par (Milan, 2011).

En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Javanovic et al., 1994). (Amič et al., 2003) ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavanols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C.

2.5. Résultats de l'activité antibactérienne

2.5.1. L'activité antibactérienne des extraits de *Marrubium vulgare*

L'activité antibactérienne est évaluée par la mesure du diamètre d'inhibition. Les résultats de nos extraits testés (Polyphénols totaux, Anthocyanes, C-glycosides et Aglycones) sur les deux souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sur milieu Mueller Hinton sont représentés dans le graphique suivant :

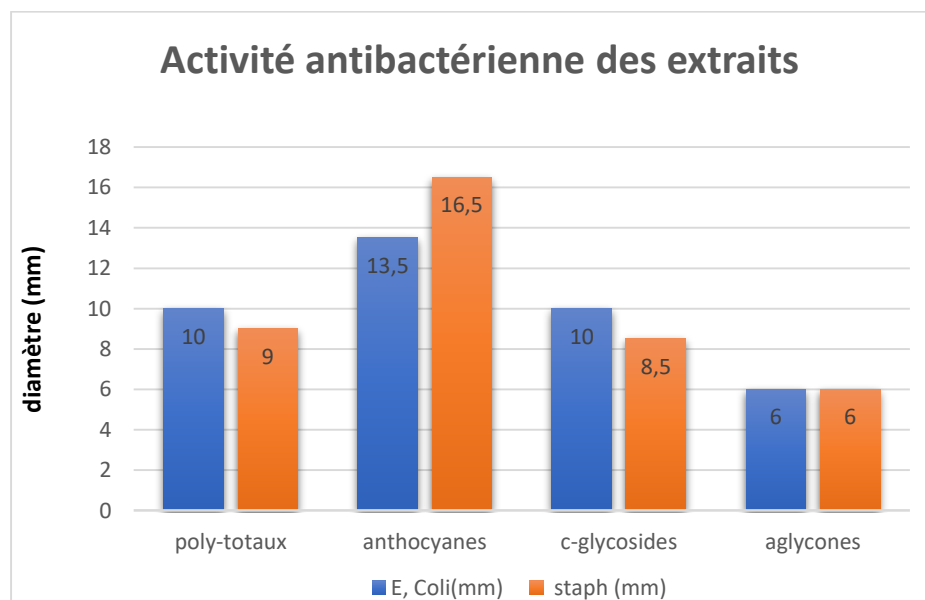
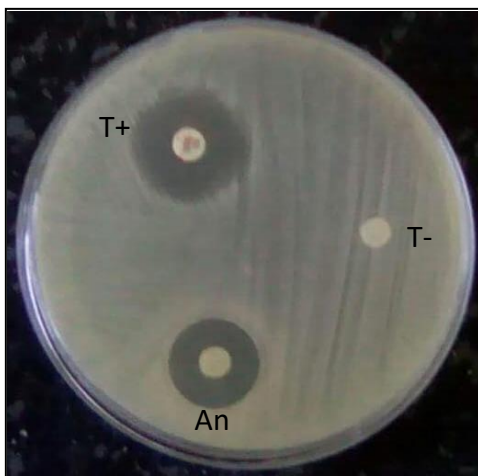


Figure 20 : Diamètres d'inhibition des extraits de *Marrubium vulgare* L. testés sur les deux souches.

Résultats et discussion

Sur ce graphe, nous observons que la bactérie *Staphylococcus aureus* paraît très sensible aux anthocyanes, avec un diamètre d'inhibition de 16,5 mm et sensible aux deux extraits polyphénols totaux et C-glycosides avec des diamètres 9 mm et 8,5 mm respectivement. Pour la souche *Escherichia coli* est sensible aux anthocyanes avec un diamètre d'inhibition de 13,5 mm, et elle est moins sensible envers les polyphénols totaux et les C-glycosides avec des diamètres de 10 mm pour les deux extraits. Les deux souches sont très résistantes vis-à-vis de l'extrait aglycone (6 mm). Les deux souches présentent une forte sensibilité à l'encontre des anthocyanes.

T+ : Gentamicine est le témoin positif utilisé pour les deux souches.

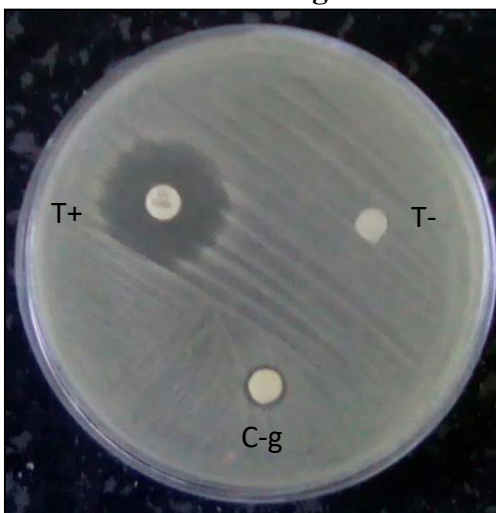


A : *Staphylococcus aureus*

B : *Escherichia coli*

T- : éther diéthylique. **An** : Anthocyanes

Figure 21 : Zone d'inhibition de l'extrait d'Anthocyanes

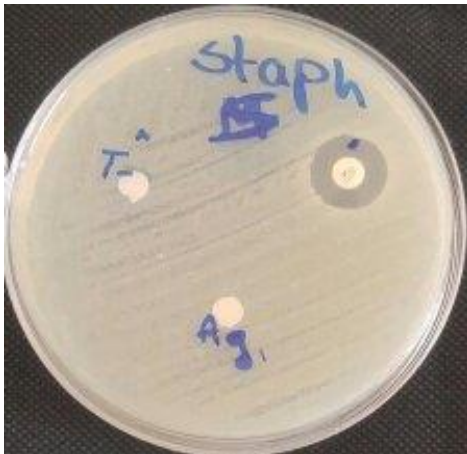


A : *Staphylococcus aureus*

B : *Escherichia coli*

T- : n-butanol. **C-g** : C-glycosides

Figure 22 : Zones d'inhibition de l'extrait C-glycosides



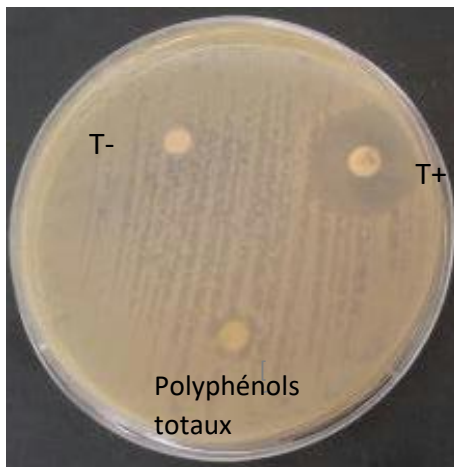
A : *Staphylococcus aureus*.



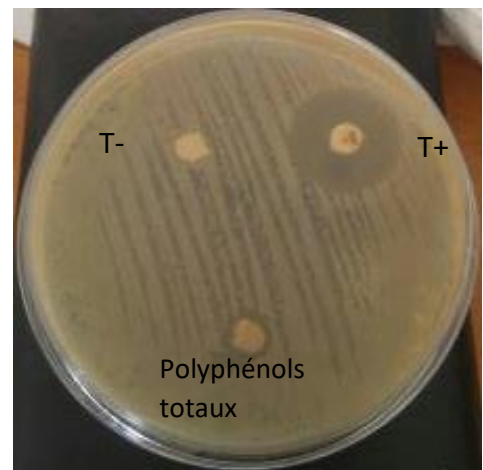
B : *Escherichia coli*.

T- : méthanol. Ag : Aglycone

Figure 23 : Zones d'inhibition de l'extrait aglycones de *M. vulgare* vis-à-vis des aglycones



A : *Staphylococcus aureus*.



B : *Escherichia coli*

T- : méthanol.

Figure 24 : Zones d'inhibition de l'extrait polyphénols totaux

2.5.2. Résultats de la CMI

Les résultats représentés dans les tableaux suivants sont réalisés à partir de la mesure des diamètres des zones d'inhibitions obtenues à différentes concentrations par des dilutions des extraits initiaux.

Tableau VIII : Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique (PPT)

Souches	Polyphénols totaux	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. aureus</i>	00	00	00	00	00	00
<i>E. coli</i>	9	9	10	9	9,5	8

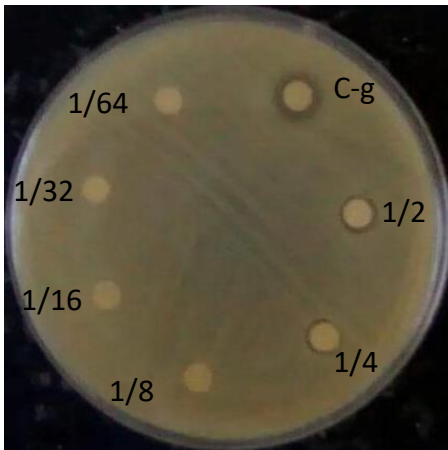
Tableau IX : Activité antibactérienne de l'extrait anthocyane

Souches	Anthocyanes	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
<i>S. aureus</i>	17,5	17	15,5	7,5	00	00	00
<i>E. coli</i>	15	8,5	8	00	00	00	00

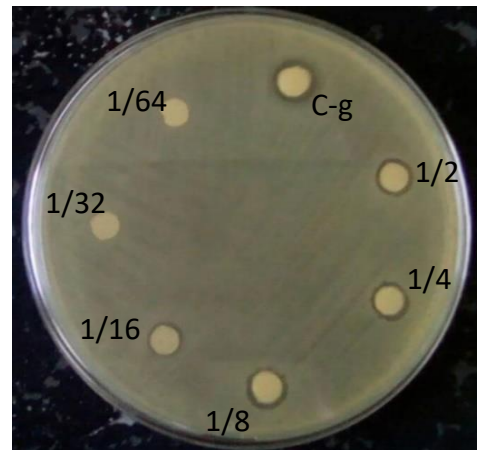
Tableau X : Activité antibactérienne de l'extrait c-glycoside

Souches	C-glycosides	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
<i>S. aureus</i>	13,5	11	10	00	00	00	00
<i>E. coli</i>	12	10	10	10,5	8,5	00	00

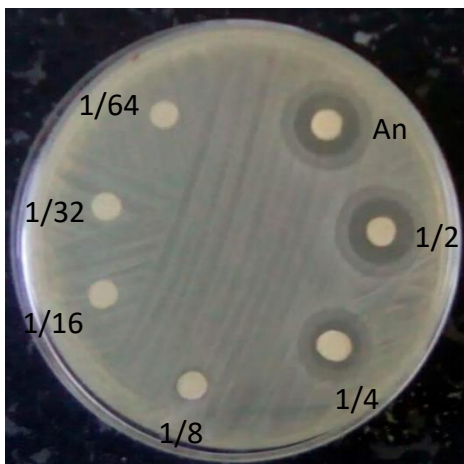
Résultats et discussion



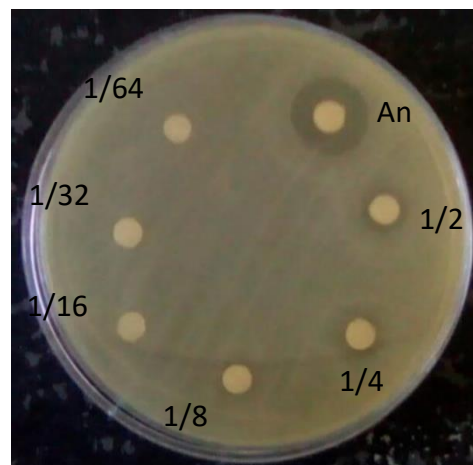
CMI de C-glycosides *S. aureus*



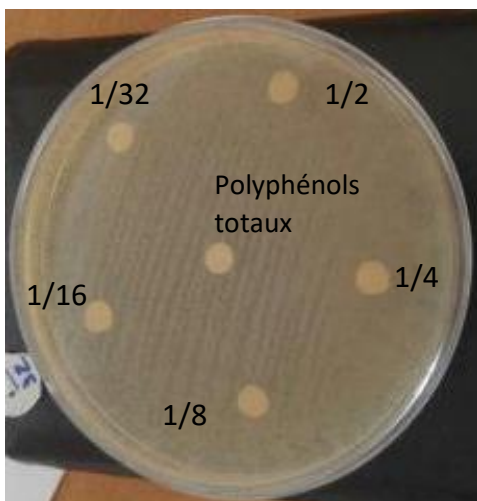
CMI C-glycoside *E. coli*



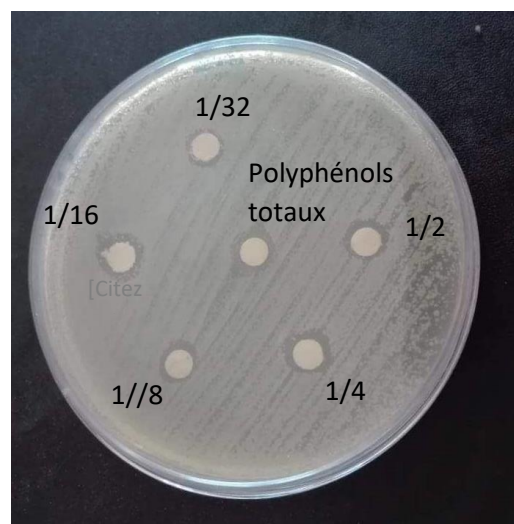
CMI anthocyane *S. aureus*



CMI anthocyane *E. coli*



CMI polyphénols totaux *S. aureus*



CMI polyphénols totaux *E. coli*

Figure 25 : Résultats de la CMI des extraits (polyphénols, anthocyanes, c-glycosides, aglycones) vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Résultats et discussion

Le pouvoir antibactérien est plus ou moins important selon la nature de la souche, de l'extrait et ses concentrations. Les tests montrent que la souche *Escherichia Coli* est sensible aux concentrations de (1/2 et 1/4) pour les anthocyanes avec une CMI égale à 1/8, et également elle est sensible aux concentrations de (1/8 et 1/4) pour les extraits c-glycosidiques (CMI=1/32) et polyphénols totaux (CMI indéterminé) respectivement.

La souche *Staphylococcus aureus* semble très sensible à la concentrations 1/2 et 1/4 pour l'extrait anthocyane avec une CMI de 1/16 et moyennement sensible à la concentration 1/2 pour les C-glycosides avec une CMI=1/8. Par contre *Staphylococcus aureus* est très résistante à l'extrait polyphénols totaux.

La principale cible des composés naturels est la lyse de la membrane bactérienne. Les huiles essentielles, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (**Rhayour, 2002**).

La variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différentes manières selon les auteurs. (**Chabot et al., 1992**), l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

Les travaux antérieurs de (**Sarker et al., 2005**), montrent également que l'effet d'un extrait est probablement dû à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété de petites molécules à effet antibactérien ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (**Seidel, 2005**). Cependant, la plupart de ces molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

Si l'on se réfère aux études de (**Moussaid et al., 2012**), l'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante. D'autre part, Il semble également que le broyage avec nitrogène liquide soit recommandé, car le broyage est aussi à l'origine de la génération de la chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (**Jones et Kinghorn, 2005**).

Conclusion

Nous avons entrepris une étude, phytochimique dans le but d'évaluer le pouvoir antioxydant et antibactérien de différents extraits de la partie aérienne de l'espèce *Marrubium vulgare* L.

L'étude phytochimique des feuilles et des fleurs a permis d'obtenir un bon rendement en termes d'extrait sec (15%). L'extrait de polyphénols totaux renferme une teneur moyennement faible (2,23 mg EAG/gMS). Le test Screening phytochimique a révélé l'existence de plusieurs groupes de composés phénoliques tels que, les anthocyanes, C-glycosides et les aglycones avec des teneurs différentes 1,266, 0,385 et 0,031mg/g respectivement.

Les principes actifs isolés à partir de *Marrubium vulgare* L. sont connus par leurs activités biologiques, dont les tests de notre partie expérimentation le prouvent, tel que le test de pouvoir réducteur de fer (FRAP) des extraits qui a révélé que la plante contient des principes actifs antioxydants très puissants, à savoir les anthocyanes, C-glycosides et les flavonoïdes. Ces derniers possèdent un pouvoir réducteur important, qui augmente en fonction de l'augmentation de la concentration des extraits. En effet les anthocyanes sont les plus puissants, ils présentent un pouvoir réducteur très important avec une absorbance maximale de 1,389 nm avec la concentration de 1mg/mL. Le test de piégeage du radical libre DPPH vient confirmer les résultats de test de réduction de fer, dont le pouvoir de piégeage radicalaire le plus significatif est celui d'anthocyanes avec une CI_{50} importante (0,55 mg/mL) qui est supérieure à celle d'acide gallique (0,2 mg/mL).

Concernant l'activité antibactérienne qui a été effectuée "in vitro" par la méthode de diffusion en milieu solide, il en ressort que les différents extraits sont doués d'un pouvoir antibactérien important sur les souches bactériennes multirésistantes qui sont à l'origine de plusieurs maladies infectieuses. Les tests d'évaluation de cette activité révèlent que l'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, de la nature et de la concentration de l'extrait. Les anthocyanes semblent les plus efficaces que les autres extraits vis-à-vis des bactéries testées *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition (16,5 mm) et *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de (13,5 mm). Les extraits testés agissent à faible concentrations notamment les polyphénols totaux et les C-glycosides avec une (CMI=1/32 mg/mL) vis-à-vis *Escherichia coli* et les anthocyanes avec une CMI=1/16mg/mL vis-à-vis *Staphylococcus aureus*.

De tous les résultats obtenus nous pouvons conclure que la plante *Marrubium vulgare* L. présente des principes actifs au niveau de sa partie aérienne, qui sont d'une grande importance, qui est due à leurs effets majeurs quant à leur pouvoir antioxydant et antibactérien.

En vue de la résistance développée par les bactéries envers plusieurs antibiotiques, il est nécessaire de chercher de nouveaux principes actifs antiseptiques afin de développer des médicaments antibactériens à base de plantes. En perspective et d'après les résultats obtenus de l'activité antibactérienne et antioxydante, nous pouvons déduire que les composés phénoliques de *Marrubium vulgare* pourraient être utilisés dans la conservation des produits agroalimentaires.

Il faut compléter cette étude par la détermination de la dose efficace des principes actifs notamment les polyphénols, anthocyanes, c-glycosides et les aglycones par des méthodes plus performantes.

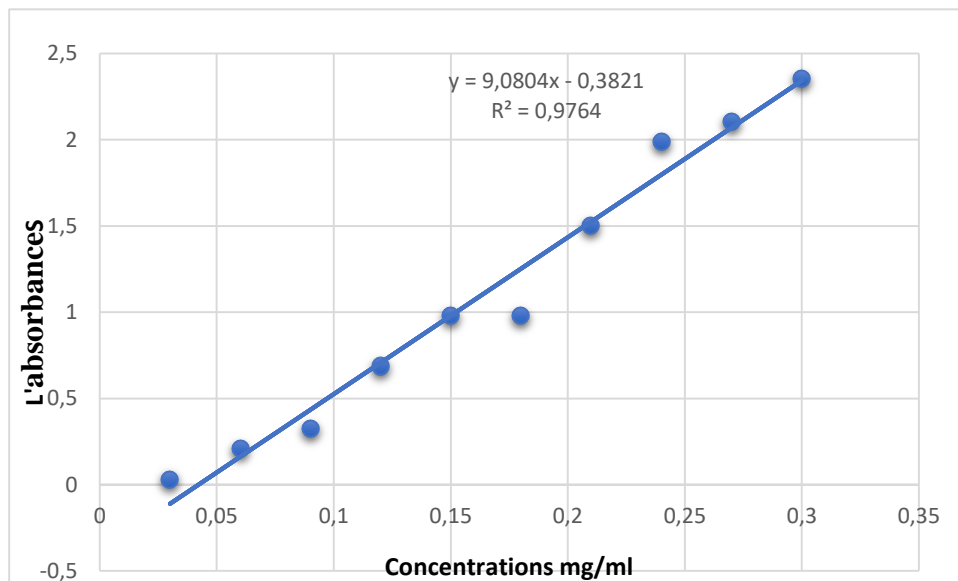
Annexe



Etuve



Spectrophotomètre à U-V



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Références bibliographiques

A

- Ait-Youcef. M. (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Ed. Ibis Press. Paris, 204-425.
- Albano S. M., Miguel M.G. (2011).** Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. **33**: 1-6.
- Ali-Shtayeh M. S., Yagmour RM-R., Faidi YR., Salem K., Al-Nuri MA. (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of ethnopharmacology*, **60**: 265-271.
- Amič D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Trinajstic N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relations hips of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. **76**: 55-61.

B

- Bekro y., Bekro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H., Ehile E.E. (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesapiniabenthiana* (Bail.) Herendet Zaroukchi (*Caesalpiniaceae*). *Rev. Sci. Nat.* **4** (2) : 217-225.
- Bellakhdar J. (1997).** Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle. IBS Press., 340-341.
- Billing J., Sherrman P. W. (1998).** Antimicrobial functions of Spices : Why some like it hot. *Chicago journal*. **73**(1) : 3-49.
- Bonnier G. (1909).** La Végétation de la France, Flore Complète. Tome 09. Ed., Suisse et Belgique. Paris., 25-26.
- Boullard. B. (2001).** PLANTES MEDICINALES DU MONDE- Croyances et Réalités. Ed. ESTEM. 636 P.
- Boudjelal A. (2012).** Extraction et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées de la région de M'sila, Algérie. Thèse de doctorat, Université badji Mokhtar. Annaba. 61 p.
- Bouterfa K., Mehdadi Z., Latreche A., Zouaoui H. et Bouredja N. (2013).** Quantification of some polyphenols of *Marrubium vulgare* L. of Tessala mount (western Algeria) at the vegetative and the flowering periods *LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE.*, **8**(3): 34-41.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-wissenschaft und Technologie*. **28**(1): 25-30.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Tec & Doc., Lavoisier. Paris. 1120 p.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie et Plantes médicinales. 2^{ème} éd. TEC & DOC., Lavoisier. Paris. 1120p.
- Bruneton J. (1987).** Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Ed. Tec & Doc., Lavoisier. Paris. 584 p.
- Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 4ème éd., Lavoisier Techniques & Documentation, Paris, 331p.

Buchanan B., Gruissem W., Jones J. (2000). American society of plant physiologists Natural Products (Secondary Metabolites) Chapter 24 : Biochemistry & Molecular Biology of plants.

Burta O., Tirlea F., Burta O.L., Qadri S.M. (2008). Phytotherapy in cardiovascular diseases: From ethnomedicine to evidence based medicine. *Journal of Biological Sciences*, **8**: 242- 247.

C

Catier O; Roux D. (2007). Botanique, pharmacognosie, phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3^{ème} éd. France. Wolters Kluwer Dalian. China, France. 141p.

Chabot S., Bel-Rhlied R., Chênevert R., Piché Y. (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂- enriched conditions. *New Phytologist*. **122**:461-467.

Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L., Zhao J.W. (2008). Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*. **448** (2) :175-9.

Collin S., Crouzet J. (2011). Polyphénols et procédés. Lavoisier, 6-11p.

Cowan M.M. (1999). Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12** (4): 564-582.

Crozier A., Clifford, M.N., Ashihara H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Ed. Blackwell Publishing Ltd. 372p.

D

Daglia M., Spratt D A., Papetti M., Donnell D. (2012). Evaluation des Extraits des plantes et de champignons pour leur activité anti-carie. *Journal Biotechnol.* 10:11-55.

Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R. (1971). Phytochemical screening of pentadecanabutyceae sabine (clusiaceae) Acclimated in benin by GC/MS. *Travaux et documents de l'orstum, paris. France.* **2013**, 1-8.

Debuigne G., Couplan F. (2009). Petit Larousse des plantes médicinales. Ed. Larousse. 383p.

Djahra A.B. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L. Thèse de doctorat en science. Université Badji Mokhtar, Annaba. 73p.

Dellile L. (2010). Les plantes médicinales d'Algérie. 2^{ème} Ed. Berti. Alger. 239p.

Dubois G.E., Grosbay. G.A., Saffron P. (1977). Non-nutritive Sweeteners: Taste structure relations with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, **195**: 397-399.

E

Elberry A.A., Fathalla M., Harraz B., Salah A., Ghareib C., Salah A., Gabr D., Ayman A., Nagy E., Essam Abdel-Sattar f. (2011). Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabet Mellitus*. **2**: 171-177.

F

Falleh H., Ksouri R., Chayeb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C. (2008). Phénolic composition of *cynaracarcadunclus* L. Organs, and their biological activities. C.R. Biologie. **331**: 372-379.

Favier A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. Mémoire de l'activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. **64**: 390-396.

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. P11-108.

G

Ghnimi W. (2015). Etude phytochimique des extraits Euphorbiacées : *Ricinus communis* Evaluation de leur propriété antioxydante et de leur action inhibitrice de l'acétylcholinestérase. 76p.

Gresele P., Cerletti C., Guglielmini G., Pignatelli P., De Gaetano G., Violi F. (2001). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. J. of Nutr. Biochem. **22** : 201-211.

Guignard JL. (2001). Botanique systématique moléculaire. Ed. Masson. Paris. 290 p.

H

Harborne J B. (1998). Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis. Ed 3. CHAPMAN & HALL. p: 202-209.

Heimeur N., Idrissi Hassani L.M., Amine Serghini M. (2004). Les polyphénols de *Pyrus mammosensis* (Rosaceae). Reviews in Biology and Biotechnology. **3**: 37-42.

Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.

Hennebelle T., S. Sahpaz A.L., Bailleul F. (2007). Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. Biochem. Syst. Ecol. **35** : 624–626.

Hennebelle T., Sahpaz Z., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie. **1**: 3-6.

Holevinsky K.O. et Nilson D. J. (1995). Simultaneous detection of free radical release and membrane current during phagocytosis. The journal of biological chemistry, **270**(14): pp 8328-8336.

J

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

Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., Lee S.C. (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. Journal of Agriculture and Food Chemistry. **52**: 3389–3393.

Jones W.P., Kinghorn A.D. (2005). Extraction of plant secondary metabolites. Natural products isolation. Humana Press (Totowa). 323-411.

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Steven P. (2002). Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. 1ère Ed. Paris et Bruxelles. 369-384.

K

Kahlouche-Riachi F. (2014). Evaluation chimique et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales d'Algérie. Thèse de doctorat en science. Université Constantine 1, Constantine. 42p.

Kanyonga P.M, Faouzi M. A, Meddah B, Mpona M, Essassi E.M, Cherrah Y. (2011). Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* **3**: 199-204.

Karadag A., Ozcelik b., Samer S. (2009). Review of methods to determine Antioxydant capacities *Food Analytical methods.* **2**(1) : 41-60.

Karumi Y., Oneyeyili P.A., Ogugbuaja V.O. (2004). Identification of active principales of balsamina (*Balsamapple*) leaf extract. *J. Med.Sci.*, **4**(3) :179-182.

Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments anti-oxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* **20**: 165-177.

Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakilemaritima*. *Plant. Physiol Bioch.* **45**: 244-249.

L

Lafay S., Gil-Izquierdo A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev.*, **7**: 301-311.

Lebreton PH., Jay M., Voirin B., Bouchez M.P. (1967). *Chim. Anal.Fr.*, **49** (7): 375-383.

Leclerc H., Gaillard J. L., Simonet M. (1995). *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien.* Doin Editeurs, Paris.

M

Maataoui B S., Hmyene A., Hilali S. (2006). Activités antiradicalaires d'extrait de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science journal.* (1) : 3-8.

Macheix J.J.A. Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2005). Nature et diversité des composés phénoliques des végétaux. In : *Les composés phénoliques des végétaux.* Ed., Technique et documentation. Lavoisier. 192p.

Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes : étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat en Pharmacie Université de Limoges.199p.

Masson E. (1987). Sonochemistry parte 2-Synthetic applications. *Cheical Society Reviews.* **16** :3304-315.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **52**: 673-839.

Milan S.S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum L.* extracts. *Journal of Science.* **33**: 63-72.

Moussaid M., Elamrani A.A., Berhal C., Moussaid H., Bourhim1 N., Benaissa M. (2012). Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare*(L.) and *Origanummajorana* (L.). *International Journal of Natural Products Research.* **1** (1):11-13.

N

Nakazawa H. C; Genka et al. (1996). Pathological aspects of active oxygens / free radicals. *Japanese journal of physiology.* P 15-32-46.

Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E., Boelens P. G., Norren K., Leeuwen P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin Nut.,* **74**: 418–425.

P

Paris M., Hurabielle M. (1980). Plantes actives sur le système nerveux sur l'appareil digestif plantes cardiotoniques plantes antiparasitaires plantes insecticides antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale. Collection Abrégé de matière médicale, pharmacognosie Tome 2 .Edition ERREUR PERIMES Masson, **173p.**

Paris R.R., Moyse H. (1976). Matière Médicale. Tome I. 2ème Ed. Masson, Paris. 406 p.

Pelt J.M. (2001). Les nouveaux actifs naturels. Marabout. Paris, 219p.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric. Food Chem.,* **48**: 3396-402.

Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001). Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing. ing Limited. ISBN : 16-18.

Q

Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2 Tomes, Editions CNRS, Paris, 1170p.

R

Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc. 158 p.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996). Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine.* **20**(7): 933-956.

Rigano D., Formisano C., et al., (2007). Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum*ssp. *libanoticum*. *Phytother Res.* 2006 Dec 21., [Epub ahead of print]. *Res.,* **21**: 395–397.

Rombi M., Robert D. (2015). Le dictionnaire des plantes médicinales. Ed. Alpen, 747p.

Ronald LP., Xianli W. et Karen S. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agr. Food Chem.* **3** : 4290-4302.

S

Sanchez-Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International.* **8**: 121-137.

Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. (2005). Natural products isolation. Humana Press (Totowa). Pp 1-23.

Sarni-Manchado P., Cheynier V. (2006). Les polyphénols d'agroalimentaire. Techniques et documentation. Lavoisier. Paris. 398p.

Schauenberg P. et paris F. (2006). Guide des plantes médicinales. Ed., Delachaux et Niestlé, Paris. 282 P.

Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* **30** : 3875-3883.

Seidel V. (2005). Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. Humana Press (Totowa): 27-37.

Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M. et Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanolextract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control.* **18** : 800–805.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxydation substrates and antioxydants by means of folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymologie.* Orlando Academic Press, 152-178 p.

Su X., Duan J., Jian Y., Shi J. Kakuda Y. (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis.* **19**: 348-353.

T

Tao L., Lambert J.D. (2014). Polyphenols in the prevention and Treatment of Vascular and Cancer. *Polyphenols in Human Health & Disease,* **2**: 1191 -1198.

Torres R., Faini F., Modak B., Urbina F., Labbe C., Guerrero J. (2006). Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous sexudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry.* **67**: 984–987.

Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Linuma M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **50**: 27-34.

V

Vitor R.F., Mota-Filipe H., Teixeira G. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* show endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology.* **93** (23) : 363-70.

Vivas de Gaulejac N. (2001). Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox. Ed. Féret, 198p.

W

Warda1 K., Markouk1 M., Bekkouche1 K., Larhsini M., Abbad1 A., Romane A., and Bouskraoui M. (2009). Antibacterial evaluation of selected Moroccan medicinal plants against *Streptococcus pneumoniae*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **3**(3) : 101-104.

Wendakoon C. N., Sakaguchi M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. of Food Protection*. **58** : 280– 283.

Wichtl M., Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques : Traditions, Pratique officinale, Sciences et Thérapeutique. 2ème Ed. TEC & DOC. Paris. 364p.

Y

Yaacoub R. (2009). Impact nutritionnel et sanitaire de la torréfaction des fruits et graines oléagineux. Intérêt de la fluorescence comme outil de contrôle des composés néoformés. Thèse de doctorat. N° 2009AGPT 0048. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agro Paris tech).

Yi Z., Yu Y., Liang Y., and Zeng B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citrireticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT*. **41** : 597-603.

Yildirim A., Mavi A., Kara A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**: 4083-4089.