

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

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHEMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Evaluation de l'activité antimicrobienne, et
Antioxydante des composés phénoliques du
Marrube blanc « *Marrubium vulgare* »

Présenté par :

M^{elle}: HAMEG TAOUS

M^{elle}: TALEB DIHYA

Devant le jury composé de :

- M^{me} Afif chaouche T. MCB UMMTO Examinatrice
- M^{elle} Benahmed djilali A. MCA UMMTO Examinatrice
- M^{me} Benazzouz K. MAC UMMTO Promotrice
- M^r Sadoudi R. MCB UMMTO Président

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout nous remercions "DIEU" tout puissant de nous avoir guidé tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné le courage pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus distingués :

A notre promotrice: M^{me} BENAZZOUZ KENZA, maitre assistante à l'UNM70, qui a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour sa bien vaillance, ses conseils, son aide moral et sa disponibilité pendant toute la période de travail.

M^R Sadoudi R. maitre de conference B à l'UNM70, pour nous avoir fait l'honneur de présider notre travail.

M^{ELLE} Ben ahmed djilali A. maitre de conference A à l'UNM70, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

M^{me} Afif chaouche T. maitre de conference B à l'UNM70, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Le personnel du laboratoire pédagogique de microbiologie et de laboratoire de physicochimique de l'UNM70 de nous avoir soutenu et encouragé tout le long de notre travail.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

*Mes chers parents
De m'avoir laissé libre dans mes choix
D'avoir prié pour moi
Je leurs exprime ma profonde reconnaissance pour leur amour,
leur confiance, leur
soutien moral ainsi que pour leurs efforts, sacrifices et
encouragements durant tout
mon parcours*

*A mes sœurs **Ania, Anais***

*Et mon frère : **Ahmed***

*A mes **Cousins** et **Cousines** et toute ma **Famille**.*

*A mes collègues ainsi que ma binôme **Taous**.*

*A mes ami(e)s avec lesquels j'ai partagé mes meilleurs
moments :*

Célia, Siham, Lydia, Zazi, Massylia

Lyes, Massi, Oussama, Samir, Mehdi, Hocine, MassiPrt, BILLY

DIHYA TALEB

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, Tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que Je dédie A,

Mon très cher père MORAD qui a été mon ombre durant toutes les années de mes études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger, aucun mot ne peut exprimer mon respect et mon amour.

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à la lumière de mes yeux ma très chère mère ZAHRA.

Que dieu les garde et les protège.

A ma grand-mère, mes frères, mes belles sœurs, mes nièces et neveux.

Merci pour tout, pour vos encouragements et soutient.

A ma binôme :Dihya

A mes adorables amies Qui ont partagées avec moi tous les moments de joie et de bonheur :,

Lydia, Célia, Siham, Kahina, Tinkhane, Kamelia

Tout ce qui m'aiment et A tout ce que j'aime.

Hameq Taous

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante étudiée

I.1. Présentation de la plante	3
I.2. Le nom vernaculaire	4
I.3. Systématique.....	4
I.4. Description botanique.....	4
I.5. Répartition géographique	5
I.6. Utilisations du marrube blanc.....	6
I.6.1. En cosmétique	6
I.6.2. En médecine	6
I.7. Formes d'utilisations et posologies	7
I.8. Toxicité	8
I.9. Contre-indications et effets indésirables.....	8

Chapitre II: Les métabolites secondaires

Introduction	9
II.1. Les composés phénoliques.....	9
II.1.1 Généralité	9
II.1.2. Biosynthèse.....	10
II.1.3. Principales classes des polyphénols.....	10
II.1.3.1. Les acides phénoliques.....	11
II.1.3.2. Les coumarines.....	13
II.1.3.3. Les flavonoïdes	13
II.1.3.4. Les anthocyanes	15
II.1.3.5. Les tannins	16
II.2. alcaloïdes	18
II.3. terpénoïdes (Isoprénoïdes et Stéroïdes)	18
II.4. Propriétés biologiques des polyphénols	19

Partie expérimental

Chapitre III: Matériel et Méthodes

III.1. Matériel	21
III.1.1. Appareillage et réactifs	21
III.1.2. Matériel végétal.....	21
III.1.3. Matériel biologique	22
III.2. Méthodes d'analyse.....	22
III.2.1. Séchage.....	22
III.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)	22
III.3.1. Préparation de l'extrait hydrométhanolique	22
III.3.2. Préparation de l'extrait brut éthanolique.....	23
III.3.3. Dosage des composés phénoliques totaux.....	24
III.4. fractionnement des flavonoïdes.....	24
III.4.1. Test de confirmation de la présence des flavonoïdes	27
III.5. Extraction des Aglycones, Anthocyanes et les C. glycosides	27
III.6. Détermination de l'activité antioxydante	30
III.6.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl).....	30
III.6.2. Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l'IC50	32
III.7. Activité antibactérienne.....	32
III.7.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.....	33

Chapitre IV:Résultats et discussion

IV.1. Rendement de l'extrait brut hydrométhanolique	34
IV. 2. Résultats de dosage des composés phénoliques totaux dans l'extrait brut méthanolique..	35
IV.3.Confirmation de la présence des flavonoïdes	35
IV.4. Rendement des différents extraits (Flavonoïdes, Aglycones, Anthocyanes, C- glycosides).	36
IV.5. Résultats de l'activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH (2.2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	38
IV.6. Evaluation de l'IC50	40
IV.7. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>M. vulgare</i>	42
IV.8. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de <i>M. vulgare</i>	44
IV.9. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïque de <i>M. vulgare</i>	45
IV.10. Activité antibactérienne de l'extrait des Aglycones de <i>M. vulgare</i>	46
IV.11. Activité antibactérienne de l'extrait des C.glycosides	46
IV.12. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait des Anthocyanes de <i>M. vulgare</i>	47
IV.13. Activité antibactérienne des différents antibiotiques sur les quatre souches microbienne	48
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	52

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Annexes

Résumé

LISTE DES ABREVIATIONS

CMI: concentration minimale inhibitrice

DMSO: Dimethylsulfoxyde

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

E.Coli: *Escherichia coli*

IC50: Concentration inhibitrice 50 ou EC50 : Efficient concentration 50

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

M. Vulgare : *Marrubium Vulgare*

MH: Mueller-Hinton

mg EAG/g d'extrait : mg équivalent en acide gallique par g de matière sèche

P. Aeruginosa_: *Pseudomonas aeruginosa*

PEB : Poids de l'extrait brut méthanolique (g)

PM PPT: polyphénols totaux

PVS: Poids de matière végétale sèche

S. Aureus : *Staphylococcus aureus*

Liste des figures

Figure 1: Fleures et feuilles de Marrubium vulgare	3
Figure 2 : Marrubium vulgare	5
Figure 3: Principaux types de coumarines	13
Figure 4 : Structure générale des flavonoïdes	15
Figure 5: Structure des anthocyanosides	16
Figure 6 : Filtration	23
Figure 7 : Extrait brut hydrométhanolique	23
Figure 8 : Extrait éthanolique	23
Figure 9: diagramme des différentes étapes suivies lors de l'extraction des flavonoïdes	26
Figure 10: Différentes phases obtenus lors de l'extraction des flavonoïdes.	27
Figure 11: diagramme illustrant les différentes étapes suivies lors de l'extraction des Aglycones, Anthocyanes et les C. glycosides	28
Figure 12: Les Aglycones	29
Figure 13 : Les Anthocyanes	29
Figure 14 : Les C. glycosides	30
Figure 15: structure chimique du radical DPPH et de sa forme réduite.	30
Figure 16 : Préparation des extraits à différentes concentrations avec le DPPH	31
Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	Annexes5
Figure 18 : confirmation de la présence des flavonoïdes	36
Figure 19 : C-glycosides , Anthocyanes , Aglycones	37
Figure 20 : Piégeage de DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique	39
Figure 21 : Piégeage de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut hydro méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	39
Figure 22 : Zones d'inhibition de l'extrait hydro méthanolique de <i>M. vulgare</i>	31
Figure 23 : Zones d'inhibition du test de la CMI sur les différentes souches	42
Figure 24 : Zones d'inhibition de l'extrait éthanolique de <i>M. vulgare</i>	43
Figure 25 :Zones d'inhibition de l'extrait flavonique de <i>M. vulgare</i>	44
Figure 26 : Zones d'inhibition de l'extrait des Aglycones de <i>M. vulgare</i>	45
Figure 27 : Zones d'inhibition de l'extrait des C. glycosides de <i>M. vulgare</i>	46

Figure 28 : Zones d'inhibition de l'extrait des Anthocyanes de <i>M. vulgare</i>	47
Figure 29 :Zones d'inhibition des différents antibiotiques vis-à-vis les souches étudiées	49
Figure 30 : Test du DMSO sur les quatre souches bactériennes.	50

Liste des Tableaux

Tableau I : Les principales classes des composés phénoliques	11
Tableau II: Principaux acides hydroxybenzoïques	
Tableau III : Principaux acides hydroxycinnamiques	12
Tableau IV : Résultats de la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait brut méthanolique de <i>Marrubium vulgare</i>	12
Tableau V: Rendement des différents extraits (Flavonoïdes, Aglycones, Anthocyanes, C- glycosides)	35
Tableau VI : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>M. vulgare</i>	36
Tableau VII : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de <i>M. vulgare</i>	41
Tableau VIII : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïque de <i>M. vulgare</i>	43
Tableau IX : Activité antibactérienne de l'extrait des Aglycones de <i>M. vulgare</i>	44
Tableau X : Activité antibactérienne de l'extrait des C.glycosides	
Tableau XI : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait des Anthocyanes de <i>M. vulgare</i>	45 46
Tableau XII : Activité antibactérienne des différents antibiotiques sur les quatre souches microbienne	47
Tableau XIII : les souches bactériennes testées	48
	Annex3



INTRODUCTION



Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents, malgré l'important développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies souvent mortelles. Environ 80% de la population mondiale profite des apports de la médecine traditionnelle à base des plantes reconnaissant ainsi les savoirs empiriques de nos ancêtres (El- Rhaffari et Zaid, 2004).

Les plantes renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme, appelées métabolites secondaires. Ils sont mis à profit en thérapie comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, antibactériens, anticancéreux, antifongiques, diurétiques...etc. (Hartmann, 2007).

Les métabolites secondaires dépassent actuellement 200000 substances identifiées, et classées selon leurs structures chimiques et leurs origines de biosynthèse en composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Ramawat et Merillon, 2008).

Parmi les plus importants en termes de nombre de structures connus sont les composés phénoliques appelés aussi des polyphénols. Ils constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Yusuf, 2006).

L'Algérie, pays connu par ces ressources naturelles, dispose d'une flore singulièrement riche et variée. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (Gaussen, 1982).

Vu les innombrables effets secondaires des produits chimiques et, la multi résistance des souches bactériennes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques nous avons réalisé une étude qui est l'extraction des polyphénols totaux, des flavonoïdes, des anthocyanes, des c-glycosides, et des aglycones de la plante: *Marrubium vulgare* poussée à l'état spontané dans la région de Bouzeguene, wilaya de Tizi-Ouzou, et nous avons évalué leurs activité antibactérienne et antioxydante.

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons suivi une démarche scindée en trois parties:

- La partie bibliographique qui présente des généralités sur *Marrubium vulgare* et les métabolites secondaires.
- La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale qui comporte:
 - détermination de la concentration en composés phénoliques totaux.
 - extraction de: flavonoïdes, c-glycosides, aglycones et des anthocyanes.
 - évaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques totaux.
 - évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits de la partie aérienne de la plante étudiée.
- La troisième partie présente les résultats expérimentaux, interprétation et discussion des résultats.

***CHAPITRE I: PRESENTATION
DE LA PLANTE ETUDIEE***

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés thérapeutiques (Omar et Mohammed, 1993).

Elles sont impliquées dans différents secteurs sous formes de principes actifs, des huiles, des extraits, des solutions aqueuses ou organiques ou même telles qu'elles sont (Ahmed, 1995). Elle contient, au niveau de ses organes, un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés thérapeutiques (Farnsworth *et al.*, 1986).

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

I.1. Présentation de la plante

Marrubium vulgare ou marrube blanc est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen et utilisé pour ses vertus thérapeutiques (figure 1) (Djahraet *al.*, 2013).



Figure 1: *Mrrubium Vulgare* (anonyme 1)

I.2. Le nom vernaculaire

En Algérie : En arabe elle est connue par le nom Marrioua (Quezel et Santa, 1963)

En kabyle par le nom de Marrnouyeth.

Au Maroc : c'est Merrîw (Novak et al, 1966),

En Tunis : Marroubia (Bellakhdar, 1997),

En français : Marrube blanc

En Anglais : Harehound, En Italien : Marrubbio (Quezel et Santa, 1962, 1963).

I.3. Systématique

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

Règne : Végétale

Sous règne : Plantes vasculaires

Embranchement : Angiosperme

Classe: Eudicots

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Marrubium*

Espèce : *vulgare*

I.4. Description botanique

Le marrube blanc est une plante herbacée vivace pouvant atteindre 80 cm de hauteur, à tige quadrangulaire cotonneuse. Les feuilles pétiolées, ovales ou arrondies, à limbe crénelé sur les bords, sont blanchâtres et duveteuses sur la face inférieure. Les fleurs petites, blanches, avec un calice à dents crochues sont groupées en verticilles globuleux à l'aisselle des feuilles.

Le fruit est un tétra-akène. Toute la plante dégage une odeur forte, sa saveur est âcre et amère (figure 2) (Aouadhi, 2010).



Figure 2 : Morphologie des fleurs et fruits de *M. vulgare* (anonyme 2)

Le genre *Marrubium* est muni d'un calice à 10 dents, dont les 5 commissurales plus courtes, toutes terminées en pointe épineuse. C'est une plante herbacée à tiges et face inférieure des feuilles blanches tomenteuses. Les inflorescences sont en glomérules verticillés. Les bractées sont linéaires aigues. Les fleurs sont blanches (figure 2).

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

I.5. Répartition géographique

Le genre *Marrubium* comporte quelques 40 espèces, répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent eurasiatique et quelques pays d'Amérique Latine (Rigano, 2006, Meyre, 2005).

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord et est commune dans toute l'Algérie et presque dans toute l'Europe, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries (Bonnier, 1990).

I.6. Utilisations du marrube blanc

I.6.1. En cosmétique

La plante est utilisée en cosmétologie traditionnelle pour sa richesse en saponines, la décoction, en rinçage sur les cheveux, les embellis et les cataplasmes de la plante opposés sur les taches de rousseur et les éclaircit (Belakhdar, 1997; Ait youcef ,2006)

I.6.2. En médecine

- **Action contre la fièvre**

De nos jours les recherches sur son action contre la fièvre typhoïde ont montrées que la plante avait le pouvoir de faire baisser la fièvre tout en améliorant l'état général et en abrégant la maladie. La présence d'une substance antibiotique est possible (Lieutaghi, 1996). La plante hachée est couramment utilisée en cataplasme sur le front et les tempes contre la fièvre (Belakhdar, 1997). De plus l'infusion chaude aide a faire baisser la fièvre (Bremness, 2005).

- **Action contre l'arythmie**

Certains constituants du marrube ont une action régulatrice sur les muscles cardiaques. La plante est ainsi un très bon remède de l'arythmie (extrasystolique) qui, par son usage, cède toujours de façon plus ou moins rapide et plus ou moins complète (Lieutaghi, 1996; Bremness, 2005).

- **Action contre la bronchite**

Les vertus du marrube sont les plus intéressantes en pratique courante et ce sont elles qui méritent ici le plus de place. Depuis un temps immémorial, on prescrit cette plante dans les affections des voies respiratoires et les praticiens contemporains ont rendu justice aux vieux expérimentateurs dont le champ était souvent le seul laboratoire. Dans la bronchite et la trachéite (Lieutaghi, 2004).

- **Action contre la toux rebelle et l'asthme humide**

Le marrube donne d'excellent résultats pour le traitement de la toux rebelle, l'asthme humide et, comme expectorant, dans la tuberculose pulmonaire (où il intervient aussi comme tonique). Il a, des effets fluidifiants et antiseptiques sur les sécrétions bronchiques, et il facilite leur évacuation (Lieutaghi, 2004). En plus les feuilles du marrube blanc sont utilisées comme des toniques expectorants et antiseptiques pour la toux (Bremness, 2005; Dominique, 2007).

Ainsi que les feuilles de marrube séchées et cuites en eau avec la graine, se donne en forme de sirop avec du miel aux asthmatiques (Lacoste, 2006).

- **Action contre la Malaria**

Le marrube blanc est proposé aussi contre la malaria (Bremness, 2005).

- **Action contre les maux des dents**

Selon Blakhdar (1997), Dans le Jbel Bouiblanc (Marroc), le marrube est mâché contre les maux de dents.

- **Action contre les ophtalmies et les otites**

Selon Belakhdar (1997), on instille dans les yeux et les oreilles, des gouttes de la décoction contre les ophtalmies et les otites.

- **Action contre les lésions et les blessures**

Selon Cocchini et Ticli (2008), Cette plante est aussi un adjuvant de la cicatrisation des lésions, les Navajo donnaient aux mères une décoction des racines avant et après l'accouchement (Bremness, 2005).

- **Action antioxydante**

Le marrube est l'une des plantes dont le pouvoir antioxydant est le plus marqué vis-à-vis de la peroxydation lipidique (Rombi et Dominique, 2007).

I.7. Formes d'utilisations et posologies

Selon Raynaud (2007), La quantité par jour correspond à 4.5g de drogue. La durée du traitement est en moyenne de 2 semaines.

- Les tisanes: (3 tasses par jour, matin, midi et soir avant les repas) sont préparées à partir d'une infusion de 1,5g de drogue dans 150 ml d'eau bouillante pendant 10 minutes.
- Les cataplasmes : 7.5 ml 3 fois par jour, matin, midi et soir avant les repas.
- Poudre totale cryobroyée : 1 gélule, matin, midi et soir avant les repas. Possible de prendre jusqu'à 5 gélules par jour.

- Extrait sec : Quantité d'extrait correspondant à 4.5g de poudre par jour. Soit 2 gélules par jour.

I.8. Effets secondaires

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être toléré s'il ya une gastroentérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie (Aouadhi, 2010).

I.9. Contre-indications et effets indésirables

On recommande généralement aux femmes enceintes d'éviter le Marrube blanc parce que, selon la Commission Européenne de la santé, la plante stimulerait l'utérus et pourrait avoir une action abortive. Selon la même source, le marrube ne possède jusqu'à présent aucun effet indésirable Les vertus curatives de l'espèce *Marrubium vulgare* sont sans doute liées à l'existence de certaines substances chimiques dans la totalité de la plante.

***CHAPITRE II: LES METABOLITES
SECONDAIRES***

Introduction

Les plantes ont acquis la capacité de synthétiser et d'accumuler un nombre élevé de petites molécules de structure variée, connues sous le nom de métabolites secondaires. Ils sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction (Dixon, 2000).

Les métabolites secondaires ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. Ces composés sont limités à certaines espèces de végétaux et sont importants pour la survie et la valeur adaptative des espèces qui les synthétisent (Raven *et al.*, 2000).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes produits en très faible quantité, nous distinguons trois principales classes: les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoïdes (Vermerris et Nicholson, 2006).

II.1. Les composés phénoliques

II.1.1 Généralité

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 isolés et identifiés (Tao et Lambert, 2014). Ils présentent toutes 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 Cheynier, 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 (Terra *et al.*, 2007), traitements des maladies inflammatoires (Yang *et al.*, 2008), cardiovasculaires (Cazoroli *et al.*, 2008), neuro dégénératives (Bonfili *et al.*, 2008), certains d'entre eux sont utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Burta *et al.*, 2008).

II.1.2. 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 (Buchanan *et al.*, 2000).

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 (Bruneton, 1993).

L'autre voie, part de l'acétate et conduit à des poly-3-cétoester, des polycétates qui engendrent par cyclisation des composés polycycliques: chromanes, iso coumarines, xanthones, quinone...etc. (Martin *et al.*, 2002).

II.1.3. Principales classes des polyphénoles

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...), 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 (Crozier *et al.*, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféïque, Acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine	Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus
	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones 		
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	Soja, pois
(C ₆ -C ₂) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅)	Tannins		Raisin rouge, kaki

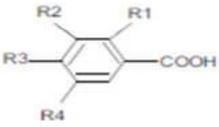
II.1.3.1. Les acides phénoliques

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

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.*, 2011).

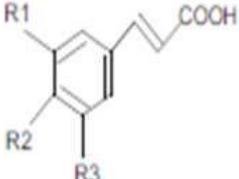
Tableau II : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

✓ Les acides hydroxycinnamiques

Ils représentent une classe importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique sont l'acide p-coumarique (et ses isomères les acides o- et m-coumariques) et les acides caféique, férulique et sinapique. 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...) ou de glycosides (tableau III) (Lafay et Gil-Izquierdo, 2008).

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

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

II.1.3.2. Les coumarines

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, de même que la coumarine elle-même dérive de l'acide o-coumarique. Les coumarines les plus fréquentes sont l'umbelliférone ou ombelliférone, l'aesculétine, la scopolétine, dont les substitutions correspondent, respectivement, aux acides: p-coumarique, caféique et férulique. Signalons également la fraxétine et la daphnéline (figure 3)(Macheix et al.,2005).

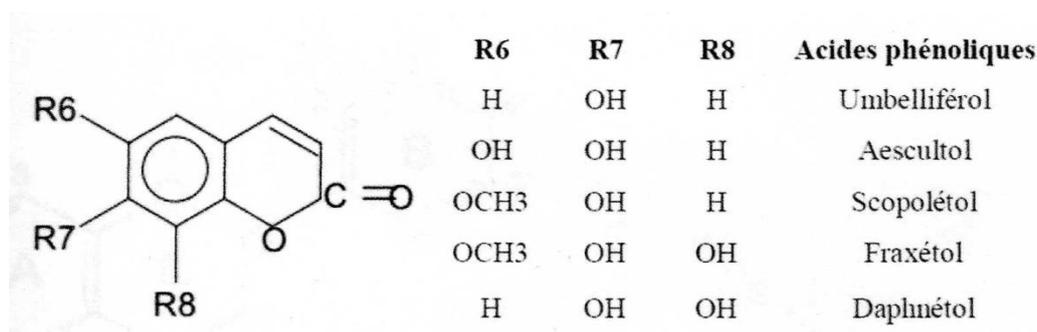


Figure 3 : Principaux types de coumarines (Macheix *et al.*,2005).

Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et ne constituent qu'un moyen de défense de type phytoalexique (Vivas de Gaulejac, 2001).

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Madhavi et al.,1996).

II.1.3.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens large sont des pigments quasiment universels des végétaux (Rice-Evans et al., 1996). 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.

- **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 Equisétales par celle de proanthocyanoides. Les O-hétérosides de flavonols. Dominent 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 flavonoides est maximale: ainsi, une trentaine de types flavonoidiques 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 flavonoides, 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 4).

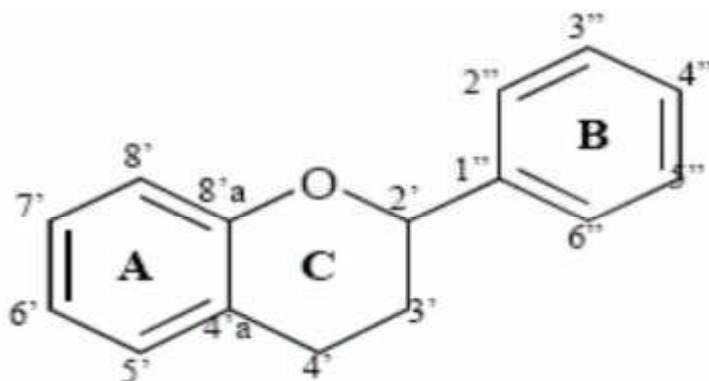


Figure 4 : Structure générale des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011).

• 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 .

II.1.3.4. 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 ($C_6-C_3-C_6$). Ce dernier portera le nom d'anthocyanine ou d'anthocyanidine suivant qu'il soit glycosylé ou non (figure 6) (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 (Clifford,2000).

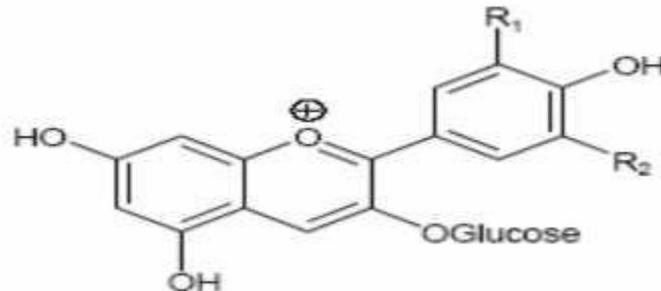


Figure 5: Structure des Anthocyanosides (Collin et Crouzet, 2011).

II.1.3.5. Les tanins

On appelle communément « Tanins » des substances d'origine végétale, non azotées, des structures polyphénolique, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, des saveurs astringente 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. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides (Paris et Moyse, 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 perméable 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.

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**

On distingue 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.

- ✓ *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 hexahydroxy diphénolique, dans le cas des tanins classiquement dénommés tanins ellagiques (Bruneton, 1999).

- ✓ *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 pyrocatéchol. 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 drogues à tanins sont employées contre les diarrhées (Ratanhia, Salicaire). À l'action ralentissante du péristaltisme intestinal, s'ajoute l'action antiseptique; les tanins libres étant détruits rapidement par le suc intestinal alcalin. Et leurs effets

antifongiques, antibactériens et antiviraux. Les drogues à tanins sont utilisés comme antiseptiques notamment dans les maladies pulmonaires (Paris et Moyses, 1976).

II.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes figurent parmi les principes actifs les plus importants en pharmacologie et en médecine (Guignard, 2000).

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétale), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même à faible dose (Zenk et Juenger, 2007), à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques (Dellile, 2007). Ils ont des structures très diverses et dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (Judd *et al.*, 2002).

Les alcaloïdes sont utilisées comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (Iserin *et al.*, 2007).

II.3. Les terpénoïdes (Isoprénoïdes et Stéroïdes)

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (Bhat *et al.*, 2005).

Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C_5H_8), communément appelée isoprène.

Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en: monoterpénoïdes (C_{10}), sesquiterpénoïdes (C_{15}) et diterpénoïdes (C_{20}). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (Benchaar *et al.*, 2008).

- **Sesquiterpènes**

Ce sont des hydrocarbures de formule $C_{15}H_{24}$, soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes vrais (en $C_{10}H_{16}$). Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bicycliques ou tricycliques.

On peut rattacher aux sesquiterpènes, en raison de leur structure, des lactones comme lasantonine, l'hélénine. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta- et heptacarbonés; on trouve dans ce groupe le guaïazulène (du Gaïac), les vétivazulènes, le chamazulène (des essences de Chamomille et de Matricaire) (Bruneton, 1987).

- **Diterpènes**

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2*E*,6*E*, 10*E*-géranylgeranylpyrophosphate (GGPP). On dénombre plus de 1200 produits diterpéniques répartis en une centaine de squelettes. On les rencontre dans certains insectes et divers organismes marins, ils sont surtout répandus chez les végétaux particulièrement dans les espèces des familles Lamiacées, Astéracées et Fabacées. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, tricycliques ou tétracycliques (Dey et Harborne, 1991, Bruneton, 1999).

- **Triterpènes**

Ces composés en C₃₀ sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés ou sous forme hétérosidique. Ils peuvent être aliphatique, tétracycliques ou pentacycliques.

II.4. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers 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 (Scalbert et Williamson, 2000), soit près de dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de vitamine E ou de caroténoïdes (Grolier *et al.*, 2001).

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).

***CHAPITRE III: MATERIEL ET
METHODES***

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires pédagogiques des analyses physicochimiques et microbiologiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Pour cela l'objectif de notre étude est d'évaluer certaines propriétés biochimiques (activité antioxydante) et biologiques (activité antimicrobienne) de différents extraits éthanoliques, hydrométhanoliques et flavonoïdes de la partie aérienne de *Marrubium vulgare*.

Le travail pratique est subdivisé en parties suivantes :

- Extraction et dosage de polyphénols totaux
- Extraction de flavonoïdes, aglycones, c-glycosides et les anthocyanes
- Détermination de l'activité antioxydant de l'extrait hydrométhanolique
- Détermination de l'activité antimicrobienne des différents extraits de la plante étudiée

III.1. Matériel

III.1.1. Appareillage et réactifs

L'appareillage et les réactifs utilisés dans notre travail expérimental sont cités en annexe 1 et 4.

III.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi pour la réalisation de cette étude est la partie aérienne (tiges et feuilles) puisque c'est à ce niveau que se trouve la majorité des principales substances actives, en d'autre terme, c'est le lieu de synthèse et de la mise en réserve temporaire des principaux composés du métabolisme primaire et secondaire

Les échantillons ont été récoltés manuellement pendant le mois de Mai 2018, à partir d'un site de la daïra de Bouzeguene, situé à la wilaya de Tizi-Ouzou. La région est caractérisée par un climat méditerranéen, avec un hiver pluvieux et neigeux et un été relativement chaud.

III.1.3. Matériel biologique

Le test de l'activité antimicrobienne des extraits de *Marrubium vulgare* a été effectué sur quatre souches bactériennes de référence: trois Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et une Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), ces souches sont pathogènes et responsables d'infections graves chez l'homme, dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques (Annexe 3).

III.2. Méthodes d'analyse

III.2.1. Séchage

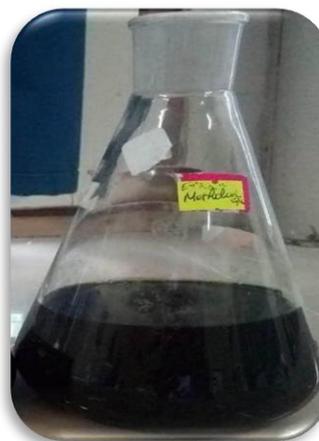
Les échantillons prélevés tôt le matin sont placés dans des sacs puis transportés immédiatement pour le séchage.

Les feuilles et tiges sont soumises à un rinçage à l'eau de robinet pour éliminer les impuretés puis étendues en couches minces, couvertes avec du papier aluminium et à l'abri de la lumière et de l'humidité, et bonne aération afin de préserver le maximum de l'intégrité des molécules, pendant trois semaines. Une fois séchées, les échantillons sont soumis à un broyage manuel afin d'obtenir une poudre prête à l'emploi. La drogue obtenue non tamisée, est conservée dans des flacons en verre ambré en vue des expérimentations.

III.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

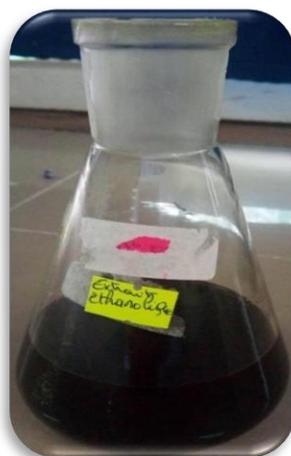
III.3.1. Préparation de l'extrait hydrométhanolique

Selon un protocole suivi par Djahra en 2014, la poudre (10g) est macérée dans 200 mL de mélange méthanol/eau (7:3 V/V) sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide de papier filtre (figure 6) La poudre obtenue est ensuite remise dans 200 mL de mélange méthanol/eau (7:3 V/V) et l'opération précédente est répétée. Les deux extraits hydroalcooliques sont mélangés et le mélange méthanol/eau est éliminé du filtrat par évaporation permettant ainsi d'obtenir un résidu caractérisé par une couleur brune foncée qui est ensuite repris par 1 mL de méthanol. Le résidu obtenu est conservé au réfrigérateur à 4°C.

**Figure 6 :** Filtration**Figure 7 :** Extrait brut hydrométhanolique

III.3.2. Préparation de l'extrait brut éthanolique

La poudre (10g) est macérée dans 200 mL d'éthanol sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. L'extrait alcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide de papier filtre. La poudre obtenue est ensuite remise dans 200 mL d'éthanol et l'opération précédente est répétée. Les deux extraits alcooliques sont mélangés et l'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation permettant ainsi d'obtenir un résidu caractérisé par une couleur brune foncée qui est ensuite repris par 1 mL d'éthanol. Le résidu obtenu est conservé à une température de 4°C.

**Figure 8 :** Extrait éthanolique de *marrubium vulgare*

III.3.3. Dosage des composés phénoliques totaux

- Principe

Les composés phénoliques totaux ont été estimés selon la méthode colorimétrique basée sur le réactif de Folin Ciocalteu (Singleton et *al.*, 1999). Le réactif est formé d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_4$) qui sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3) (Singleton et *al.*, 1999).

- Mode opératoire

100 μ l de l'extrait brut hydrométhanolique ou éthanolique sont mélangés à 200 μ l du réactif Folin ciocalteu et 3,16 mL de H_2O . Le mélange est incubé à température ambiante pendant 3 minutes. Ensuite 600 μ l de la solution carbonate de sodium (Na_2CO_3) anhydre 20% sont ajoutés au mélange. Les composés phénoliques totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre à UV (Ultra-Violets) visible après 2 heures d'incubation à température ambiante par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 765 nm.

La quantification est faite selon une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (0 à 100 μ g/mL). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche.

III.4. Fractionnement des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode de Charaux et Paris (1954), cité in (Paris, 1954). C'est une méthode universelle qui consiste à stabiliser une masse égale à 10g de poudre séchée pendant une heure dans 200 mL d'éthanol à une température de 96°C.

Après filtration et séchage, la drogue est pulvérisée grossièrement puis mélangée à 200ml d'éthanol portés à une température de 96°C pendant 30 minutes.

Après une macération de 12 à 24 heures, les deux solutions éthanoliques sont réunies et évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris par 20 mL d'eau bouillante, la solution aqueuse obtenue est laissée au repos pendant 24 heures. Enfin, la liqueur est épuisée dans une

ampoule à décantation en trois étapes successive par l'éther, l'acétate d'éthyle et n-butanol (figure 10).

Selon Solfo (1973), les composés flavonoïques ne passent pas dans l'éther, ils sont à l'état de traces dans l'acétate d'éthyle et seul le composé butanolique en contient une quantité susceptible d'être étudiée. L'extrait butanolique est ensuite évaporé. Le résidu est conservé à une température de 4°C.

Les différentes phases obtenus lors du fractionnement des flavonoïdes sont représentées dans la (figure 11).

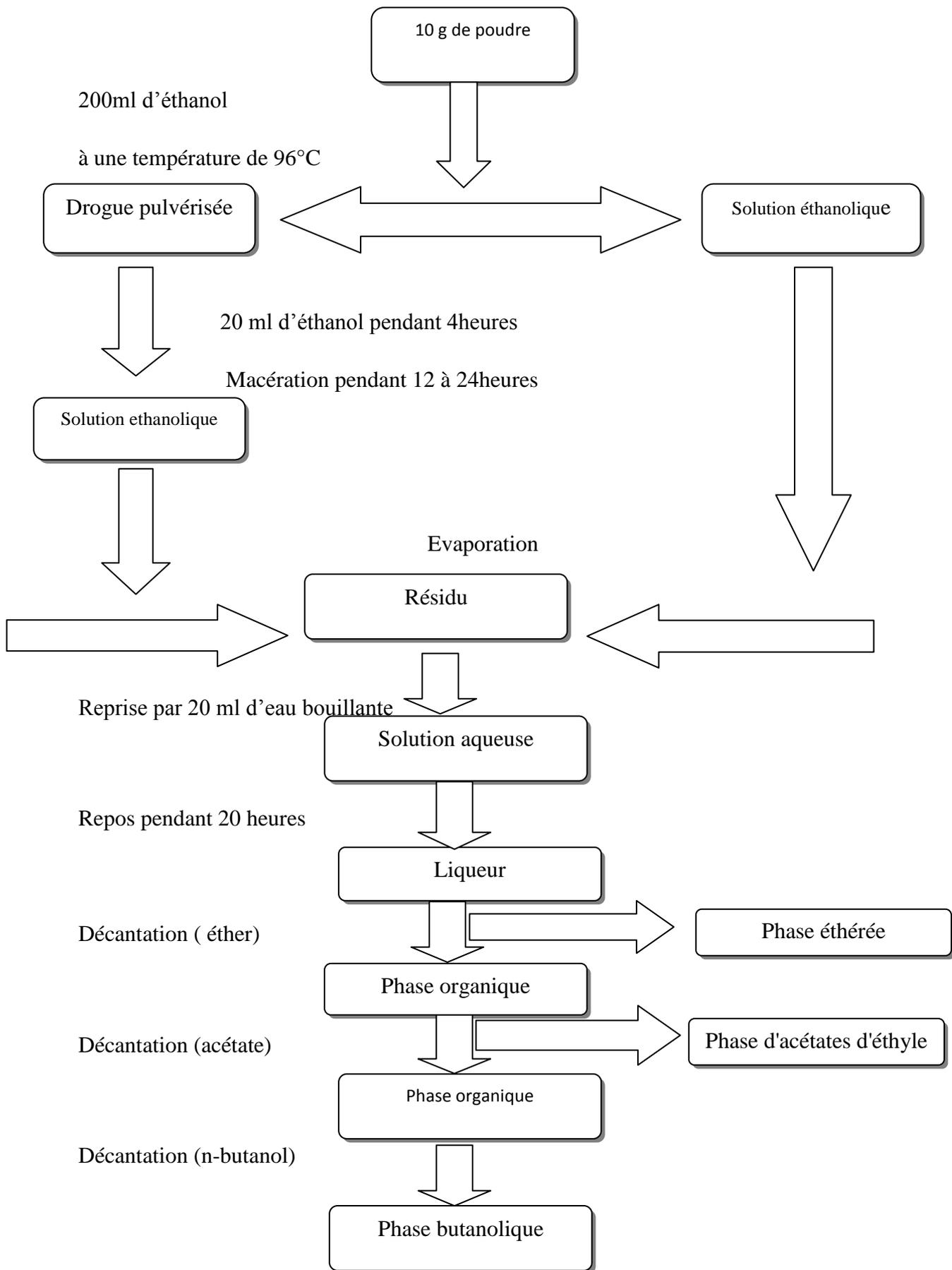


Figure 9: diagramme des différentes étapes suiviesors du fractionnement des flavonoïdes (Charaux et Paris, 1954)



a. la solution aqueuse

b. phase 1

c. phase 2

d. phase 3

b: après l'ajout de l'éther.

c. après l'ajout de l'acétate d'éthyle.

d. après l'ajout de n-butanol.

Figure 10: Différentes phases obtenus lors du fractionnement des flavonoïdes.

III.4.1. Test de confirmation de la présence des flavonoïdes

A 1 mL d'extrait est ajouté 1 mL d'HCl concentré puis 3 copeaux de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge, rose ou orange (figure 17) (Karumiet *al.*, 2004).

III.5. Extraction des Aglycones, Anthocyanes et les C. glycosides

D'après Lebreton (1967), l'extraction de ces trois types de flavonoïdes consiste à prendre 1 g de drogue et le mettre dans 80 mL de HCL 2N (19.64 mL de HCl ajuster à 100 ml avec l'eau distillé) .Après l'agitation on met le mélange dans un bain marie pendant 40min a 90°C, puis on laisse refroidir ;

Dans une ampoule à décanter on verse le mélange et on lui ajoute 70mL d'éther diéthylique.

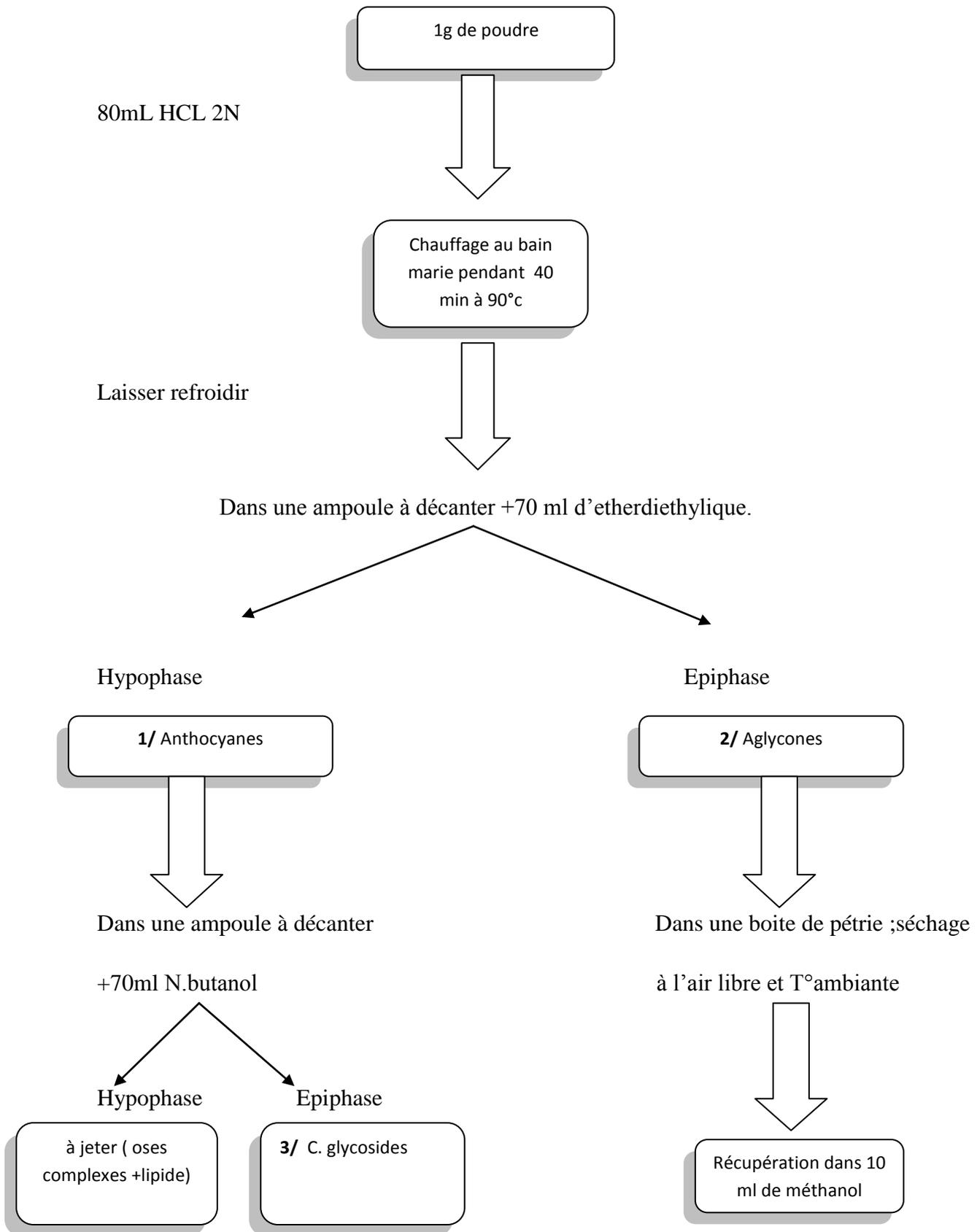


Figure 11: diagramme illustrant les différentes étapes suivies lors du fractionnement des Aglycones, Anthocyanes et les C. glycosides (Lebreton,1967)

- a. Dans la partie épiphase: transparente jaunâtre sont des Aglycones.

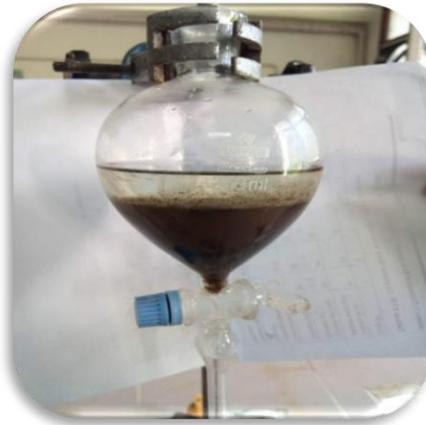


Figure 12: Les Aglycones

On le récupère dans une boîte de pétri et on laisse sécher à l'air libre et à température ambiante, puis on le récupère dans 10 ml de méthanol.

- b. Dans la partie hypophase: On récupère dans un tube le liquide et ce sont les Anthocyanes.



Figure 13 : Les Anthocyanes

- c. Le reste de l'hypophase on le met une autre fois dans l'ampoule à décanter on lui ajoute 70 ml de n.butanol.puis deux phases se distingueront : l'Epi phase c'est les C. glycosides. Et la partie hypophase c'est à jeter se sont des oses complexes +lipides.



Figure 14 : Les C. glycosides

III.6. Détermination de l'activité antioxydante

III.6.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)

- Principe

Le DPPH est un radical stable et coloré. Le maximum de son absorbance se situe vers 515-517 nm dans le méthanol. Sa réduction par un donneur d'atome H-(AH) conduit à la formation de 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle incolore (DPPH-H) et au radical A selon la réaction.

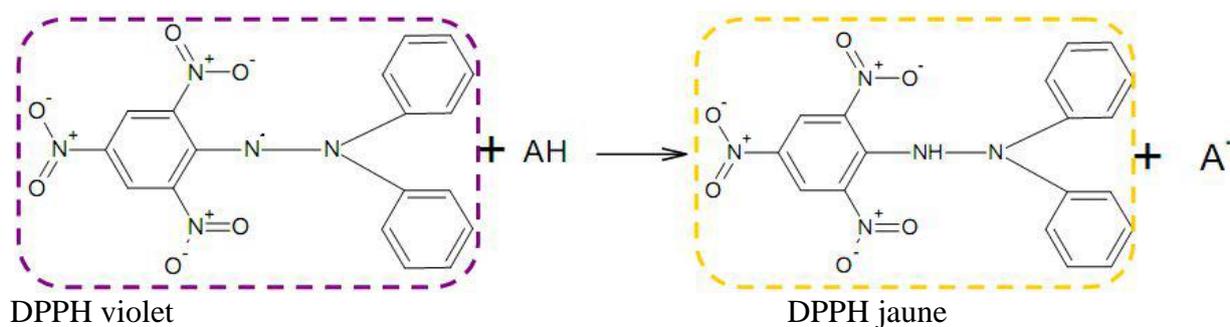


Figure 15: structure chimique du radical DPPH et de sa forme réduite.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-517 nm.

- Mode opératoire

Consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence de l'antioxydant (extrait brut méthanolique) va être réduit et vire vers le jaune. Ce changement se traduit par une diminution de l'absorbance.

La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 1.2 mg de DPPH dans 50ml de méthanol absolu. 100µl de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1300µl de DPPH. L'acide ascorbique est également préparé dans les mêmes conditions pour servir de témoin positif (figure 16).



Figure 16 : Préparation des extraits à différentes concentrations avec le DPPH.

Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par le spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm.

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de l'activité anti-oxydante} = [A_1 - A_2 / A_1] \times 100$$

A_1 : absorbance du témoin négatif sans extrait.

A_2 : absorbance en présence de l'extrait.

III.6.2. Evaluation du potentiel anti-radicalaire par le calcul de l' IC50

L'IC50 (Concentration inhibitrice 50), appelée également EC50 (*Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Les IC50 sont calculés graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Torres *et al.*, 2006).

III.7. Activité antibactérienne

- Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture utilisé pour réaliser l'activité antibactérienne est: la gélose Mueller Hinton (MH).

- Préparation des disques

Des disques de 6mm de diamètre ont été découpés sur papier Wattman, stérilisés et conservés jusqu'au moment de leur utilisation.

- Préparation de pré-culture

Les souches bactérienne à tester ont été cultivées dans des boites de Pétri contenant le milieu MH et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures

- Standardisation des suspensions bactériennes

Quatre à cinq colonies identiques furent prélevées et émulsionnées dans l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est bien homogénéisée. Ensuite l'absorbance (densité optique) est mesurée à une longueur d'onde de 620nm et doit être comprise entre 0,08 à 0,10 (Benhammou *et al.*, 2008).

III.8.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques

Le pouvoir antibactérien des six substances naturelles extraites de *Marrubium vulgare* a été déterminé sur gélose Mueller Hinton. Nous avons utilisé la technique de diffusion sur milieu solide (Nair et Chanda, 2005, Perez *et al.*, 1990). C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche microbienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits.

Les disques préparés sont imprégnés de 25 μ L de chaque extrait à tester. Par ailleurs, le milieu Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre. Puis sontensemencées par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile, en tournant chaque fois la boîte environ 60° de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

A l'aide d'une pince stérile, les disques contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose. Chaque essai est répété deux fois dans les mêmes conditions d'expérimentation. Ainsi qu'un antibiogramme est réalisé avec des disques contenant des antibiotiques (Néomycine, Triméthoprim oxacilline, Cefaxoline, Colistine, Amoxicillin (témoin positif)) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés, et des disques imprégnés de DMSO (témoin négatif).

- Lecture des résultats

La lecture se fait par la mesure des diamètres de zone d'inhibition produite autour des disques, et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait testé (Ponce *et al.*, 2003).

- Souche non sensible (-) ou résistante : diamètre $<$ à 0,8cm ;
- Souche sensible (+) : diamètre compris entre 0,9 à 1,4cm ;
- Souche très sensible (++) : diamètre compris entre 1,5 et 1,9cm ;
- Souche extrêmement sensible (+++) : diamètre $>$ à 2,0cm

***CHAPITRE IV : RESULTATS ET
DISCUSSION***

IV.1. Rendement de l'extrait brut hydrométhanolique

L'extrait brut hydrométhanolique a été quantifié selon la formule :

$$R\% = \text{PEB}/\text{PMB} \times 100$$

R : rendement

PEB : poids de l'extrait brut hydrométhanolique/éthanolique (g)

PMVS : poids de la matière végétale sèche(g)

- **Rendements de l'extrait hydrométhanolique et éthanologique**

Extrait	PMVS	PEB	R
Hydrométhanolique	10g	2,1g	21%
Ethanologique	10g	1,2g	12%

La préparation de l'extrait brut hydrométhanolique de la poudre a donné un rendement de l'ordre de 2.1 g, ce qui correspond à un pourcentage de 21 %, tandis que l'extrait brut éthanologique de a donné un rendement de l'ordre de 1.2 g, ce qui correspond à un pourcentage de 12%.

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Etant donné la méthode utilisée pour l'extraction de l'extrait brut hydrométhanolique et l'extrait brut éthanologique est la même: macération sous agitation qui permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio activité de ses constituants. De ce fait la différence de rendement entre ces deux extraits résulte de la différence de solvant ainsi le méthanol donne le meilleur rendement.

IV. 2. Résultats de dosage des composés phénoliques totaux dans l'extrait brut hydrométhanolique

La teneur en composés phénoliques obtenus à partir de l'extrait brut hydrométhanolique à été estimée grâce à une courbe d'étalonnage, réalisée avec l'acide gallique à différentes concentrations (0,1mg, 0,2mg, 0,3mg, 0,4mg, 0,5mg/ mL).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS) (annexe 5) (tableau IV).

Tableau IV : Résultats de la teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait brut hydrométhanolique de *Marrubium vulgare*

	Teneur en composés phénoliques(mg EAG/ g MS d'extrait)
Extrait brut hydrométhanolique	5.21±0.07

Les résultats de dosage de phénols totaux révèlent que l'extrait brut hydrométhanolique de l'espèce *Marrubium vulgare*. Contient une teneur de l'ordre de 5.21 (mg EAG/g MS).

IV.3. Confirmation de la présence des flavonoïdes

En effet le test de confirmation nous a donné un mélange de couleur orangée comme c'est bien illustré dans la figure ci-dessous ce qui confirme la présence des flavonoïdes (figure 18).



Figure 18 : confirmation de la présence des flavonoïdes

IV.4. Rendement des différents extraits (Flavonoïdes, Aglycones, Anthocyanes, C- glycosides)

Tableau V: Rendement des différents extraits (Flavonoïdes, Aglycones, Anthocyanes, C- glycosides)

Les different extraits	PMV (g)	PEB (g)	R (%)
Flavonoids	10	0,9	9
Aglycones	10	0,3	3
Anthocyanes	10	1	10
C. glycosides	10	0,1	1

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés contenus dans les feuilles et tiges selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer ses composés selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes, aglycones, anthocyanes, et C. glycosides). Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.



Figure 19 : C-glycosides, Anthocyanes, Aglycones.

La teneur en polyphénol au niveau des feuilles et tiges du *Marrubium vulgare* est de 21 % pour l'extrait brut méthanolique et 12% pour l'extrait brut éthanolique. Parmi ces polyphénols nous avons calculé un taux de 9% de flavonoïdes, 3% d'aglycones, 10% d'anthocyanes et un taux de 1% de C. glycosides.

La même composition a été retrouvée chez la même espèce dans des travaux antérieurs réalisés récemment par Moussaid et *al.* (2012), Elberry et *al.* (2011) et Warda et *al.* (2009).

Un rendement de 39,2% de l'extrait brut hydrométhanolique 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 (21%) pour l'extrait hydrométhanolique et (12%) pour l'extrait éthanolique et un rendement de 5,9% a été trouvé par Djahra en 2014, un pourcentage inférieur à celui qu'on a trouvé (9%). Ceci pourrait être dû à la technique utilisée par l'auteur (extraction par soxhlet) et sous une température de 70 °C), ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à température ambiante par simple macération. En fait, 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.

Un taux de 18, 21mg EAG/gMS d'extrait a été avancé par Boudjelal, en (2012). Une teneur extrêmement importante par rapport à celle qu'on a trouvé (5.21 mg EAG/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, ou encore la quantité de drogue utilisée par le chercheur (100g), qui est inférieur à la quantité utilisée lors de notre étude (10g).

Par ailleurs nos résultats montrent que le rendement des polyphénols extraits par le méthanol (21%) est plus élevé que celui extraits par l'éthanol (12%), ceci nous mène à dire que le rendement des composés phénoliques dépend aussi du solvant utilisé.

IV.5. Résultats de l'activité antioxydante par piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

L'activité antioxydante vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée par le spectrophotomètre suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur jaune au violet à 517 nm , la valeur du pouvoir réducteur (IC50) est de 95.21 %

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait brute hydrométhanolique et l'acide ascorbique portés sur les figures (20;21).

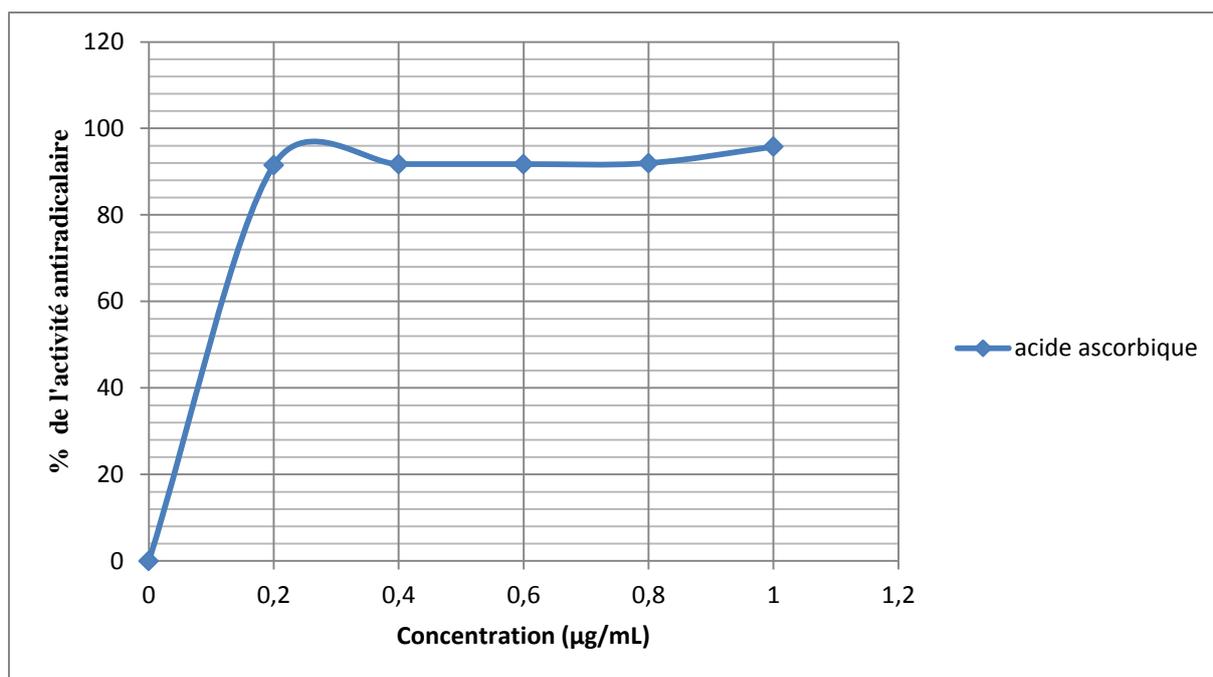


Figure 20 : Piégeage de DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.

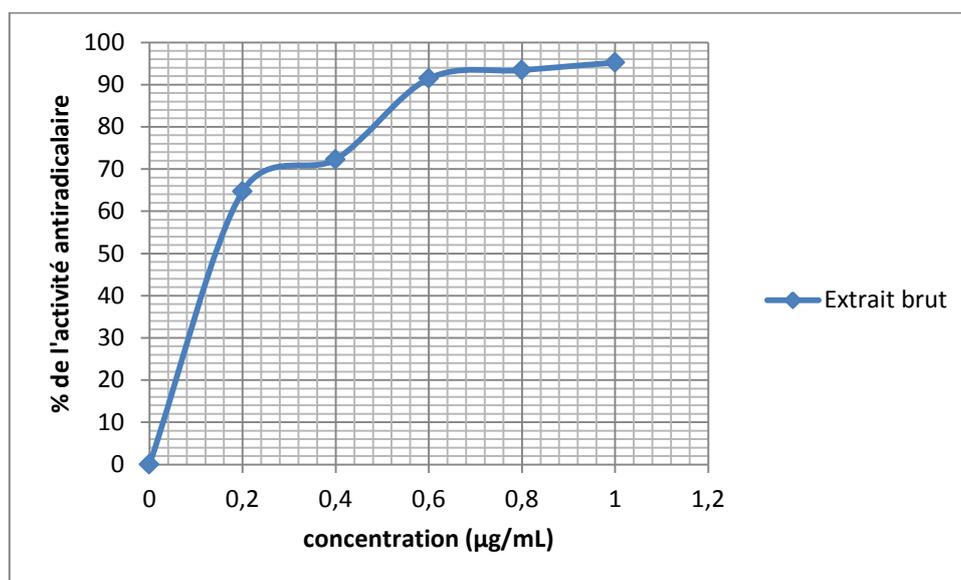


Figure 21 : Piégeage de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut hydro-méthanolique de *Marrubium vulgare*.

D'après ces résultats, on remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Le taux d'inhibition du DPPH enregistré en présence de l'extrait hydrométhanolique de la plante est presque égal à celui de l'acide ascorbique.

IV.6. Evaluation de l'IC50

IC50 est inversement lié 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 d'IC50 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.

L'extrait hydro méthanolique révèle des propriétés anti radicalaires intéressantes qui se manifestent par des faibles valeurs d'IC50.

D'après ces résultats, nous remarquons la valeur des IC50 de l'extrait hydro méthanolique est 0.50 mg/ml. Un fort pouvoir antiradicalaire est noté pour l'extrait brut se traduisant par un IC50 assez bas, comparable à celui du composé standard l'acide ascorbique qui est 0.52mg/ml.

Nos résultats indiquent que l'extrait brut méthanolique présente une activité remarquable vis-à-vis du piégeage du DPPH avec un IC50 de 0,50 mg/ml. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Boudjelal, (2012), obtenus à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* qui a montré une activité antioxydante élevée avec une valeur d'IC50 de l'ordre de 0,49 mg/ml. Contrairement, les travaux réalisés par Orhan et al. (2010), affirment que l'extrait méthanolique est moins actif que l'extrait acétonique de la même espèce.

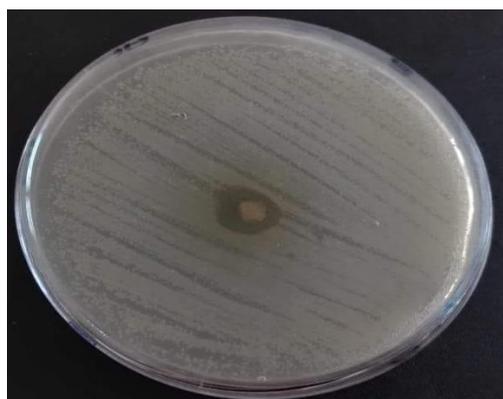
Dans une autre étude entreprise par Yumrutas et Saygideger (2010), sur le piégeage du DPPH où l'effet scavenger de l'extrait hexanique et l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'une autre espèce, *Marrubium parviflorum* il a été noté que l'extrait hexanique a donné une très faible activité antioxydante par rapport à celle retrouvée en présence de l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* avec des valeurs des IC50 plus élevées. A l'opposé, un puissant effet scavenger estimé lors des travaux réalisés par Milan (2011), à partir d'un extrait brut méthanolique d'une autre espèce de *Marrubium* (*Marrubium peregrinum*) où l'IC50 enregistrée était de 0,18 mg/ml.

IV.7. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *M. vulgare*

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* sont présentés dans le tableau VI. Pour l'ensemble des résultats, les diamètres d'inhibitions sont représentés avec les valeurs de l'écart type, le diamètre des disques es inclus dans les mesures.

Tableau VI : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *M. vulgare*

Souches	Solution mère	1/2	1/4	1/8	1/16	1 /32
<i>Escherichia coli</i>	14 ±0,14	11,5±0,21	10±00	09,5±0,07	09,5±0,07	09,5±0,07
<i>Staphyloccus aureus</i>	12,5±0,21	11±0,07	10,5±0,21	10±00	00±00	00±00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15±0,14	13±0,14	12±00	11±00	00±00	00±00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,5±0,07	10±0,14	10±00	07,5±0,07	00±00	00±00

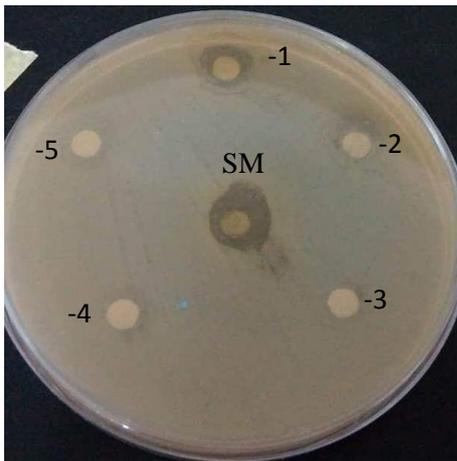
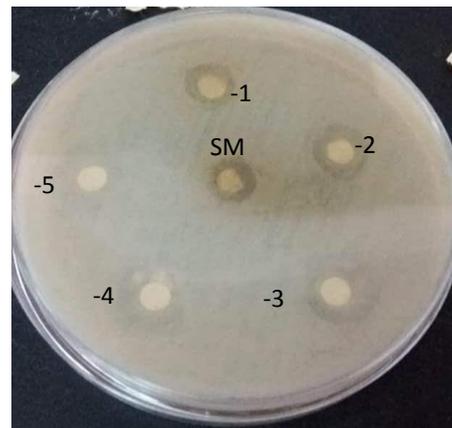


a



b

Figure 22 : Zones d'inhibition de l'extrait hydro méthanolique de *M. vulgare* vis-à-vis de :
a: Pseudomonas aeruginosa. b: Escherichia coli.

*S. aureus**E. coli**P. aeruginosa**k. pneumoniae***Figure 23** : Zones d'inhibition du test de la CMI sur les différentes souches

IV.8. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *M. vulgare*

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *M. vulgare* sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique de *M. vulgare*

Souches	Diametre d'inhibition \pm écart type
<i>Escherichia coli</i>	12,5 \pm 0,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,5 \pm 0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 \pm 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 \pm 00



A



B

Figure 24 : Zones d'inhibition de l'extrait éthanolique de *M. vulgare* vis-à-vis de :

a: *Staphylococcus aureus* ;**b:** *Pseudomonas aeruginosa*.

IV.9. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïque de *M. vulgare*

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïque sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait flavonoïque de *M. vulgare*

Souches	Diamètre d'inhibition \pm écart type
<i>Escherichia coli</i>	12 \pm 0,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	07,5 \pm 0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10 \pm 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09 \pm 0,14



A



B

Figure 25 : Zones d'inhibition de l'extrait flavonoïque de *M. vulgare* vis-à-vis de :

a: Staphylococcus aureus ; b:klebsiella pneumoniae.

IV.10. Activité antibactérienne de l'extrait des Aglycones de *M. vulgare*

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'extrait des aglycones sont présentés dans le IX

Tableau IX : Activité antibactérienne de l'extrait des Aglycones de *M. vulgare*

Souches	Diamètre d'inhibition ± écart type
<i>Escherichia coli</i>	10,5±0,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5±0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09±0,14
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,5±0,07



A



B

Figure 26 : Zones d'inhibition de l'extrait des Aglycones de *M. vulgare* vis-à-vis de :

a : Staphylococcus aureus. b : klebsiella pneumoniae.

IV.11. Activité antibactérienne de l'extrait des C.glycosides

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'extrait C.glycosides sont présentés dans le tableau X.

Tableau X : Activité antibactérienne de l'extrait des C.glycosides

Souches	Diamètre d'inhibition± écart type
<i>Escherichia coli</i>	19,5±0,07
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,5±0,91
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10±00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10±00



A



B

Figure 27 : Zones d'inhibition de l'extrait des C. glycosides de *M. vulgare* vis-à-vis de :
a: Escherichia coli ; *b:Staphylococcus aureus*.

IV.12. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait des Anthocyanes de *M. vulgare*

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne de l'extrait des anthocyanes de *M. Vulgare* sont présentés dans le tableau XI.

Tableau XI : Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait des Anthocyanes de *M. vulgare*

Souches	Diamètre d'inhibition± écart type
<i>Escherichia coli</i>	14±0,14
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,5±0,21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15±00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15±00



A



B

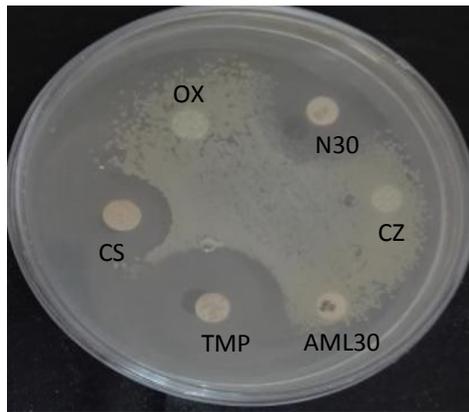
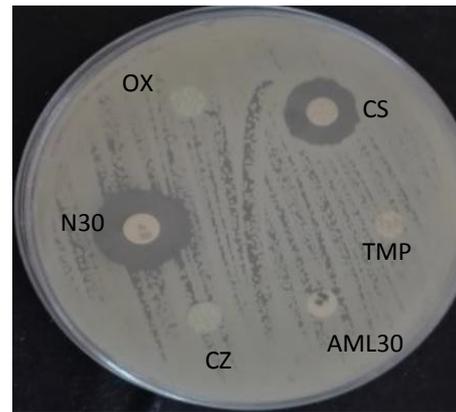
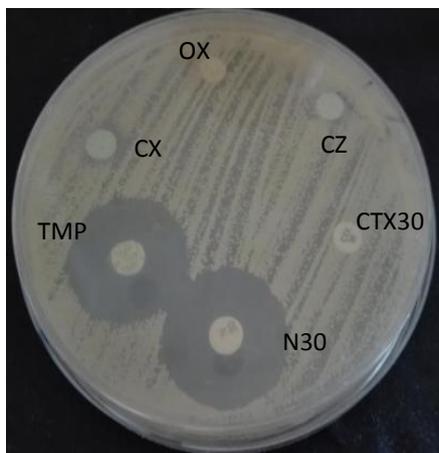
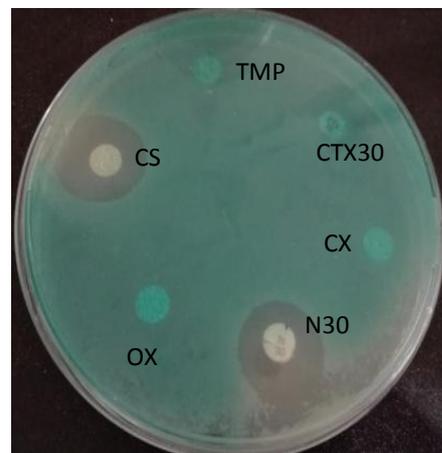
Figure 28 : Zones d'inhibition de l'extrait des Anthocyanes de *M. vulgare* vis-à-vis de :
a: Escherichia coli ; b:Staphylococcus aureus

IV.13. Activité antibactérienne des différents antibiotiques sur les quatre souches microbiennes

Les résultats des différents tests de l'activité antibactérienne des différents antibiotiques sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Activité antibactérienne des différents antibiotiques sur les quatre souches microbiennes

Antibiotiques	Nom des souches			
	Diamètre d'inhibition			
	<i>E. coli</i>	<i>p.aeruginosa</i>	<i>S .aureus</i>	<i>k.pneumoniae</i>
Néomycine (N 30)	26,5±0,35	16±00	23,5±0,07	16,5±0,07
Trimethoprim oxacilline (TMP)	29,5±0,07	00±00	23,5±0,07	00±00
Cefaxoline (CX30)	22±0,42	18,5±0,07	00±00	18,5±0,07
Colistine (FIN)	00±00	00±00	00±00	00±00
Amoxicillin (AML 30)	00±00	00±00	00±00	00±00

*E. coli**k. pneumoniae**S. aureus**P. aeruginosa***Figure 29** : Zones d'inhibition des différents antibiotiques vis-à-vis les souches étudiées

- **Test du DMSO sur les quatre souches bactériennes**

Le DMSO constitue le témoin négatif, testée sur les quatre souches bactériennes où aucune zone d'inhibition n'a été signalée

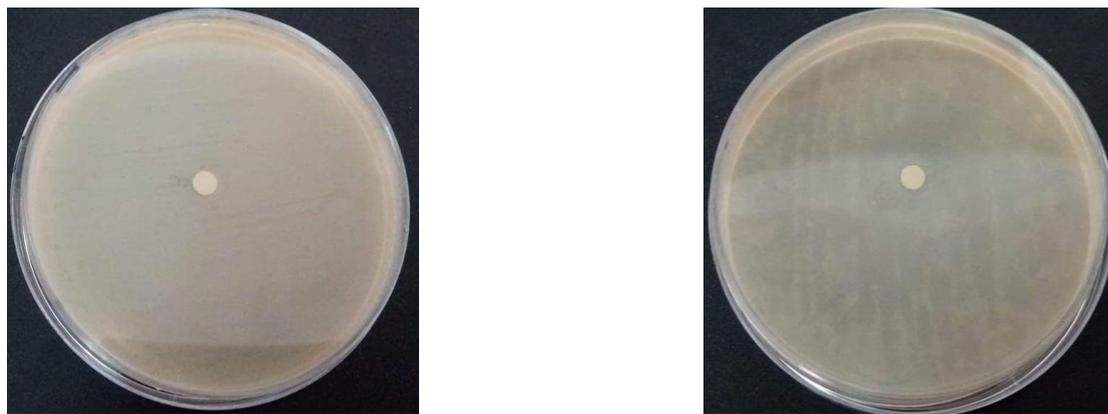


Figure 30: Test du DMSO sur les quatre souches bactériennes.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l'efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antiseptique qui vient rivaliser celui des antibiotiques. De nombreux travaux soulignent cet effet antibactérien des principes actifs naturels. En effet, Mubashir et *al.*(2009), signalent que l'extrait aqueux des feuilles de l'espèce *Marrubium vulgare* exerce une forte activité inhibitrice sur les souches de *Staphylococcus aureus* et une activité de degré moindre sur et *E. coli*.

Dans notre cas, l'activité des différents extraits est variables, les extraits hydro méthanoliques et éthanoliques de polyphénols totaux ainsi que les flavonoïdes, les c. glycosides et les anthocyanes ont une activité moyenne vis-à-vis de *E. coli* dont les diamètres moyens varient entre 12mm et 14mm, tandis que les aglycones, ont une activité légèrement plus élevée que celle des autres extraits sur la même souche dont le diamètre moyen est 19,5 mm.

Staphylococcus aureus elle aussi ne réagit pas de la même manière aux différents extraits, elle est moyennement sensible aux extraits bruts hydro méthanolique et éthanolique des polyphénols, ainsi vis-à-vis aglycones et des c-glycosides dont les diamètres moyens se situent entre 11,5mm et 13,5 mm, cependant elle est faiblement sensible aux flavonoïdes avec un diamètre moyen de 7,5mm et fortement sensible aux anthocyanes avec un diamètre moyen de 18,5mm.

Des résultats similaires ont été obtenus par Ulukanli et Akkaya (2011), sur *Staphylococcus aureus* à partir de l'extrait hydro méthanolique la partie aérienne d'une autre espèce de *Marrubium*: *Marrubium catariifolium*.

Quand à *Pseudomonas aeruginosa*, elle présente une sensibilité plus au moins importante vis-à-vis de ces extraits, c'est également le cas de *klebsiella pneumoniae* avec des diamètres moyens entre 9mm et 15mm.

Selon une étude entreprise par Hamdani et al en 2018, l'effet des polyphénols totaux de la plante *Raphanus sativus* L, a révélé des diamètres de zones d'inhibition de 12mm, 10mm, 10mm, 9mm sur *s.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* et *k.pneumoniae* respectivement. Si on compare nos résultats au siens on peut dire que le *marrubium vulgare* est doté d'une activité antibactérienne largement élevée comparant a celle de *Raphanus sativus* L.

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, L'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. 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).

Cette 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 différente manière selon les auteurs. Selon 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 (β) sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

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 ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Marrubium vulgare est une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle.

L'étude de la partie aérienne du *Marrubium vulgare* a permis d'obtenir un bon rendement en termes d'extrait brut sec (21%). L'extrait brut renferme une teneur en phénols totaux égal à 5,21mg EAG/g MS. La présence de plusieurs groupes de composés polyphénoliques a été également révélée au cours de cette étude, notamment les anthocyanes, les flavonoïdes, les aglycones et les c-glycosides, avec des rendements variables de 10%, 9%, 3% et 1% respectivement.

Ces principes actifs majeurs, de la plante étudiée *Marrubium vulgare* possèdent diverses activités biologiques telles que les activités antibactérienne et antioxydante. En effet, de l'activité antimicrobienne évaluée par le test *in vitro*, il ressort que les différents extraits possèdent un pouvoir antimicrobien important sur les germes multi résistants responsables des maladies infectieuses. L'inhibition de la croissance varie en fonction de l'espèce bactérienne, et de la nature du produit testé.

Les anthocyanes semblent les plus efficaces que les autres extraits vis-à-vis les bactéries testées (*Staphylococcus aureus* (18,5mm±0,21) suivie par *Pseudomonas aeruginosa* et *klebsiella pneumoniae* avec un diamètre d'inhibition qui est de (15mm±00) alors que sur *Escherichia coli* une zone d'inhibition enregistré était de (14mm±0,14).

Les souches bactériennes testées, sont classées de très sensibles à sensibles vis-à-vis des extraits étudiés et les zones d'inhibition sont souvent élevées.

L'activité anti-oxydante de l'extrait hydrométhanolique de polyphénols de *Marrubium vulgare* a montré un pouvoir antiradicalaire presque égal à celui de l'acide ascorbique qui est de (IC50= 0.52mg/ml) et (IC50= 0.50mg/ml) respectivement. Ce qui nous permet de suggérer l'utilisation des extraits de cette plante comme conservateurs alimentaires.

Les résultats obtenus mettent en exergue, l'effet prometteur des composés phénoliques de la partie aérienne du *Marrubium vulgare* quant à leur pouvoir antibactérien et antioxydant.

En perspectives, les résultats obtenus de l'étude de l'activité antimicrobienne confirment que les composés phénoliques pourraient bien rivaliser les produits chimiques synthétiques. Néanmoins, la purification et l'identification des différents phénols ayant une activité antiseptique restent fortement recommandées pour approfondir non seulement les connaissances sur les différentes molécules pourvues de cette activité mais aussi pour cerner

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

d'une manière plus fine les différentes actions possibles de ces composés et leur synergie. Ceci permettra dans le futur la synthèse de molécules potentiellement actives et des applications *in vivo* dans le traitement des certaines pathologies pourraient être envisagées pour valider ces premiers résultats.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Albano S. M., Miguel M.G., (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. 33: 1-6.

Ait Youssef, M. (2006). Plantes médicinales de Kabylie. Préface du docteur J.-P. Brette. Ibis Press, Paris. p.349.

Anonyme 1 : www.arizonensis.org ; www.conabio.gob.mx

Anonyme 2 : www.summagallicana.it

Bellakhdar J., (1997). Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle. IBS Press. pp. 340-341.

Benzie I.F., Strain J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.

Bhat, S.V., Nagasampigi, B.A., Sivakumar, M. (2005). Chemistry of Natural Products 1: Narosa, Springer, 1, 115-252.

Bonnier G., (1990). La grande Flore française Ed. Billin ; Complète. Tome : 09. 25-26. La Végétation de la France, Suisse et Belgique.

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.

Bremness, Lesley., (2005). The Complete Book of Herbs : A Practical Guide to Growing & Using Herbs, Montréal, Reader's Digest, 272 p.

Bruneton J., (1987). Eléments de phytochimie et de pharmacognosie, Ed : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 584 p.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} Ed : Tec & Doc Lavoisier. Paris. 1120 p.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 4ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Bubonja-Sonje M., Giacometti J., Abram M., (2011).Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chemistry. 127: 1821-1827.

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.

Catier, O., Roux, D. (2007). Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3eme éd. France : Wolters Kluwer.

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

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

Dellile, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie.

Dey P.M., Harborne J.B., (1991).Methods in plant biochemistry.Terpenoids.London Academicpress.pp. 7.

Docteurs Max Rombi et Dominique Robert., (2007). 120 plantes médicinales, composition, mode d'action et intérêt thérapeutique, Alpen Éditions .

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

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 Marrubiumvulgareameliorateshyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats.International JournalofDiabetMellitus. 2: 171-177.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

El-Rhaffari, L., Zaid, A. (2004). Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes. pp.293-318.

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.

Grolier, P., Borel, P., Scalbert, A., Remesy, C. (2001). Les phytomicronutriments. In : *Traite de nutrition clinique de l'adulte*, Medecine-Sciences, Flammarion. pp. 165-177.

Guignard J.L., (2000). Botanique systématique moléculaire. Ed: Masson. Paris. 290 p.

Guignard, J.L.(1995). Abrégé de biochimie végétale, Ed. Masson, Paris. pp.160.

Gulcin I., Huyut Z., Elmastas M., Aboul-Enein H.Y., (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 3: 43-53.

Hannebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérap.* Springer-Verlag, 1, 3-6.

Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68, 2831-2846.

Hatzidimitriou E.F., Nenadis N., Tsimidou M.Z., (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*. 105: 1504-1511.

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

Hu F.B.,(2003). Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*. 78: 544-551.

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kanyonga P.M, Faouzi M.A, Meddah B, Mpona M, Essassi E.M, Cherrah Y., (2011).** Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* 3: 199-204.
- Ketsawatsakul U., Whiteman M., Halliwell B., (2000).** A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 279: 692-699.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdely C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol. Bioch.,* 45, 244-249.
- Lafay, S., Gil-Izquierdo, A. (2008).** Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev.,* 7, 301-311.
- Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research.* 46: 244-282.
- Leong, L.P., Shui, G. (2002).** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.,* 76, 69-75.
- Macheix, J.J., Fleriet, A., Christian, A. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. *PPTUR Lausanne.* pp.39.
- 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., Bourhim N., Benaissa M., (2012).** Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). *International Journal of Natural Products Research.* 1 (1) : 11-13.
- Newan, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *J. of Natural Products,* 66, 1022 - 1037.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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.ClinNut*, 74, 418–425.

Nissiotis, M. et Tasioula-Margari, M. (2002). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food chemistry*, 77, 371- 376.

Paris M., Hurabielle M., (1980). Abrégé de matière médicale Pharmacognosie. Tome 1ere Ed: Masson. Paris. pp. 82-89.

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.4* : 25-39

Pierre Lieutaghi., (2004). Le Livres des Arbres, Arbustes & Arbrisseaux , (nouvelle édition par Actes Sud .1322 p.

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.

Quezel. F et Santa. S., (1963). Nouvelle Flore de L'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol. 1-2, 801-802, Ed.CNRS, Paris France, 1962,1963.

Raven, H., Evert, R.F., Eichhon, S.E. (2000).Biologie végétale. 6^{ème}. traduit par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrard. De BoeckUniversité-Paris.pp.944.

Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P., (2011).A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *International PharmaceuticaScientia*. 1 (1): 25-41.

Sarni- Machado, P., Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en Agroalimentaire. Techniques et documentation. Lavoisier. Paris. pp. 398.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., (1999).Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods inEnzymology*. Orlando Academic Press: 152-178.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Solfo R.R., (1973). Etude d'une Plante Médicinale Malgache Buxusmadagascariensis Bail et ses variétés. Ed : O.R.S.T.O.M.

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.

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., Labbé C., Guerrero J., (2006). Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*.

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

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.

Yi-Zhong C., Mei S., Jie X., Qiong L., Corke H., (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. 78(25): 2872-2888.

Zenk, M.H., Juenger, M. (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry Review*, 6, 2757 – 2772.

ANNEXES

ANNEXE 1

Materiels utilisés

Etuve 37°C MEMMERT	
Spectrophotomètre (MEDLINE)	
Bain marie	
Autoclave de paille (WEBECO)	
Plaque chauffante (RYPA)	
Balance de précision 0,001g (KERN 770)	

ANNEXE 2

Milieux de culture utilisés	- Gélose Mueller Hinton (M-H)
-----------------------------	-------------------------------

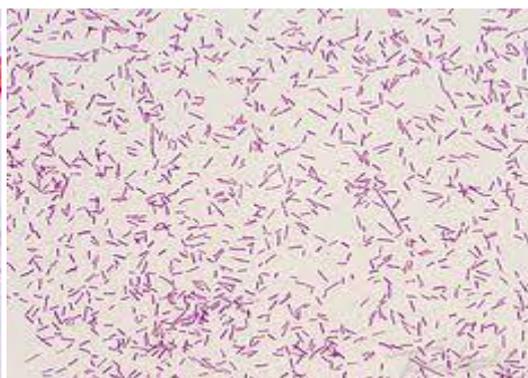
ANNEXE 3

Tableau XIII : les souches bactériennes testées

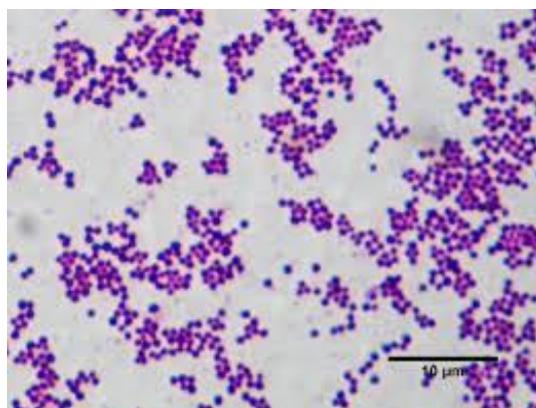
Famille	Genre et espèce	Gram
Enterobacteriacées	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif
Enterobacteriacées	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955	Négatif
Staphylococcacées	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positif
Pseudomonadacées	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Négatif



Escherichia coli (GX1000)



Klebsiella pneumoniae (GX1000)



Staphylococcus aureus (GX1000)



Pseudomonas aeruginosa (GX1000)

ANNEXE 4

Liste des solvants et réactifs utilisés
Acidegallique
Méthanol
Ethanol
RéactifFolin-Ciocalteu
Chlorureferrique
n-butanol
l'éther di-éthylique
l'acétate
l'HCl

ANNEXE 5

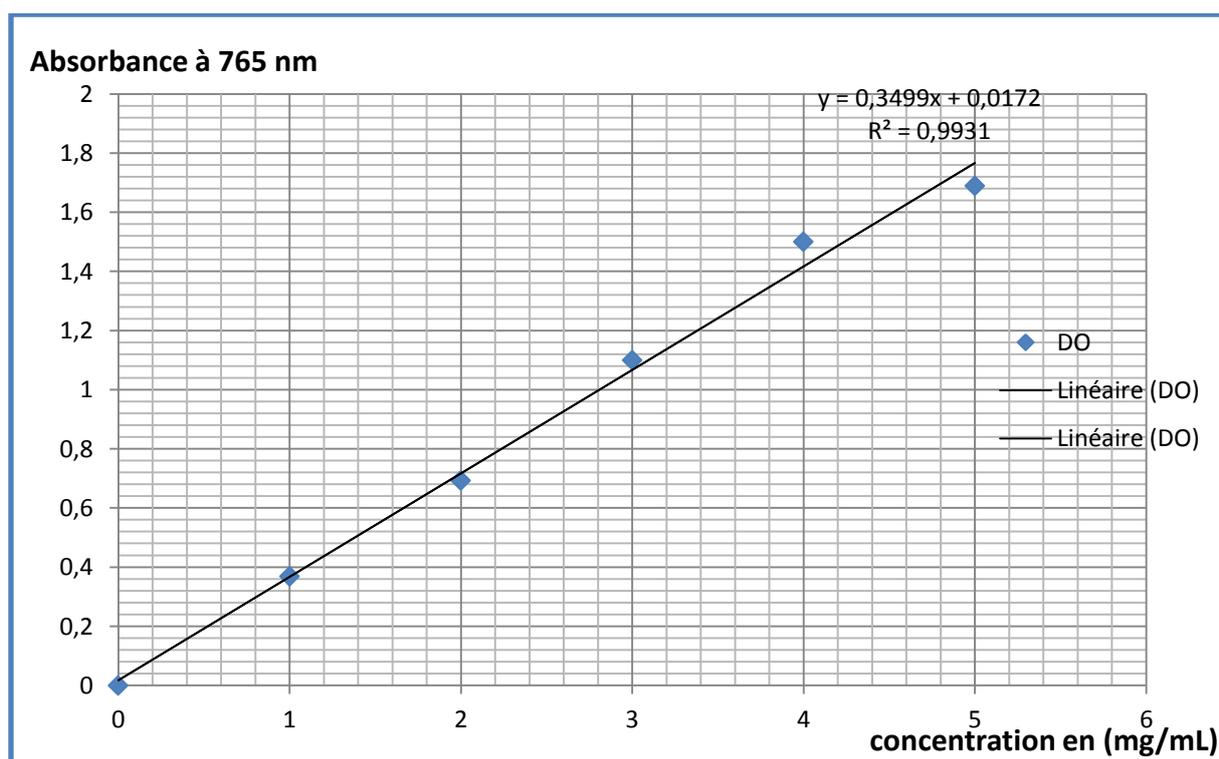


Figure 17 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

RESUME

Parmi les plantes médicinales recensées auprès des populations et bénéficiant de bonnes renommées thérapeutiques et qui de ce fait devront être mises à l'épreuve d'investigations sérieuses de décryptages chimiques et biologiques, le *Marrubium vulgare*. Afin d'apporter les preuves de son innocuité et de rendre son utilisation plus efficiente, une étude a été réalisée, où les activités biologiques antimicrobienne et antioxydante ont été déterminées.

L'étude a permis d'isoler les principaux métabolites secondaires notamment, les flavonoïdes, les aglycones, anthocyanes, c-glycosides et les polyphénols totaux, à partir de la partie aérienne du *Marrubium vulgare*, récoltée dans la région de Bouzeguene, la wilaya de Tizi-Ouzou.

La drogue est dotée de divers composés chimiques avec des rendements variables selon le type de l'extrait. Un rendement de polyphénols de 5.21 mg EAG/gMS est obtenu par l'extrait brut hydro méthanolique.

Les différents extraits de la partie aérienne de la plante étudiée ont donné un pouvoir antimicrobien satisfaisant à savoir : l'extrait hydrométhanolique qui est le plus active contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de (15mm±0.14) suivie par *Escherichia coli* sur la qu'elle nous avons enregistré une zone d'inhibition de (14mm±0.07) alors que sur *Staphylococcus aureus* et *klebsiella pneumoniae* les zones d'inhibition étaient respectivement de (12,5mm±0.21) et (10.5mm±0.07). Pour l'extrait éthanolique et les flavonoïdes étaient à leur tour actifs que sur *Escherichia coli* avec un même diamètre d'inhibition qui est de (12.5mm±0.07) et sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de (11.5mm±0.07) ; (7.5mm0.07) respectivement.

En ce qui concerne les anthocyanes, ont montré un très bon pouvoir antimicrobien avec un diamètre d'inhibition important sur *Staphylococcus aureus* (18.5mm±0.21) suivie par *Pseudomonas aeruginosa* et *klebsiella pneumoniae* avec un même diamètre d'inhibition qui est de (15mm±0.07), alors que sur *Escherichia coli* était de (14mm±0.14).

L'évaluation de l'effet antibactérien des C-glycosides de cette plante a montré un effet inhibiteur important sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec une zone de (19.5mm±0.07) et (13.5mm±0.91)respectivement, tandis que les aglycones étaient légèrement actifs sur les souches testées où nous avons enregistré un diamètre d'inhibition de (12.5mm±0.07) sur *Staphylococcus aureus* et *klebsiella pneumoniae*, alors que cette zone était de (10.5mm±0.07) et (09mm±0.04) sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement.

L'activité antiradicalaire a montré que les polyphénols sont dotés d'un pouvoir antioxydant Elevé avec un IC50 = 0,50mg/ml.

Mots clés : *Marrubium vulgare*, activité antimicrobienne, Antioxydant, polyphénols, flavonoïdes, IC50.

ABSTRACT

Among the medicinal plants identified with the populations and benefiting from good therapeutic renames and which thus will have to be tested of serious investigations of chemical and biological decodings, the *Marrubium vulgare*. In order to provide evidence of its safety and to make its use more efficient, a study was carried out, where antimicrobial and antioxidant biological activities were determined.

The study made it possible to isolate the main secondary metabolites especially, flavonoids, aglycones, anthocyanins, C-glycosides and total polyphenols, from the aerial part of the *Marrubium vulgare*, harvested in the Bouzeguene region, the department of Tizi-Ouzou.

The drug is endowed with various chemical compounds with varying yields depending on the type of the extract. A yield of polyphenols of 0.63 mg EAG/GMS is obtained by the crude Methanolic extract.

The different extracts from the aerial part of the studied plant gave a satisfying antimicrobial power to know : The most active hydromethanolic extract against *Pseudomonas aeruginosa* with an inhibition diameter of (15mm \pm 0.14) followed by *Escherichia coli* on which we recorded an inhibition zone of (14mm \pm 0.07) while on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* the inhibition zones were (12, 5mm \pm 0.21) and (10.5 mm \pm 0.07) respectively for the ethanol extract and the flavonoids were in turn active only on *Escherichia coli* with the same diameter Inhibition of (12.5 mm \pm 0.07) and *Staphylococcus aureus* with an inhibition zone of (11.5 mm \pm 0.07); (7.5 mm 0.07) respectively.

With regard to anthocyanins, showed very good antimicrobial power with a large inhibition diameter on *Staphylococcus aureus* (18.5 mm \pm 0.21) followed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* with the same inhibition diameter which is (15mm \pm 0.07) while on *Escherichia coli* was (14mm \pm 0.14).

Assessment of the antibacterial effect of C-glycosides of this plant showed a significant inhibitory effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with an area of (19.5 mm \pm 0.07) and (13.5 mm \pm 0.91), respectively, whereas Aglycones were Slightly active on the strains tested where we recorded an inhibition diameter of (12.5 mm \pm 0.07) on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, whereas this area was (10.5 mm \pm 0.07) and (09mm \pm 0.04) on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

The antibacterial effect varies depending on the nature of the strain and the substance tested.

Antiradical activity has shown that polyphenols have an antioxidant power elevated with a IC50 = 0, 50mg/ml.

Key words: *Marrubium vulgare*, antimicrobial activity, antioxidant, polyphenols, flavonoids, IC50.