University of Bejaia
Faculty of Technology
Laboratory of Organic Materials

OPEN ACCESS

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

2014, Vol.2, N° 2 (E- ISSN: 2353-0391)

Editor in chief:
Prof. Kamel BELHAMEL

Algerian Journal of Natural Products

(E-ISSN: 2353-0391)

Presentation

The Editor in-chief, on behalf of the Editorial Board and Reviewers, has great pleasure in presenting this number of **Algerian Journal of Natural Products** published on **July 2014**. This journal (E-ISSN:2353-0391) is an open access journal, free of charges, published **three times a year** by the Laboratory of Organic Materials (LOM), Faculty of Technology, University of Bejaia, ALGERIA. The journal is dedicated to research of all aspects of Plant and Natural Products. Authors can send their views and comments to the Editor in chief: kamel.belhamel@univ-bejaia.dz

The journal will cover research studies related to Natural products including some of the allied subjects. Articles with timely interest and newer research concepts will be given more preference. All manuscripts are subjected to RAPID peer review process. The Journal welcomes the submission of manuscripts that meet the general criteria of significance and scientific excellence.
Manuscripts that are found suitable for publication in ***Algerian J. Nat. Products*** are sent to two or more expert reviewers. During submission, the contributor is requested to provide names of two or three qualified reviewers who have had experience in the subject of the submitted manuscript.

Please send your manuscripts to : ajnp.2013@yahoo.fr

Use the template of the journal to write your manuscript: AJNP-template

Topics:

- Chemistry of Bio-active compounds
- Phytochemistry (Isolation, Structure elucidation, Spectroscopic properties)
- Antimicrobial, antiviral, antiparasite activities
- Biopolymers, biocomposites
- Electrochemical process using natural products
- Separation process using natural products
- Pharmacology, toxicology of plant and their active principles
- Pharmaceutical formulations and evaluation of natural products
- Environmental impact and risk assessment

Instructions for Authors

The manuscript should be prepared in French or in English. "Arial" font should be used. The font size should be of 11pt. All research articles should have the following sections: Title page, Abstract, Key words, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgement (if any) and References.

Title:
The title should then followed by the author name and the institution name and address by indicating suitable superscripts. Title page should contain title of the paper in arial bold face (font size 14), names of the authors in italic face, (font size 10) followed by the address(es) in italic face lower case. An asterisk (*) must be placed after the corresponding authors name as superscript whose email id, fax, telephone number can be given. Corresponding author has the responsibility to ensure that all co-authors are aware and approve the contents of the submitted manuscrip

Abstract:
This section should detail the problems, experimental approach, major findings and conclusion in one paragraph and should appear on the second page. Avoid abbreviation, diagram and references in the abstract. It should be single - spaced and should not exceed 150 words for full papers.

Keywords:
Author(s) must give about 4-6 key words which can identify the most important subjects covered by the paper. They must be placed at the end of the abstract.

Introduction:
The manuscript should include a brief introduction stating the purpose of the investigation and relating the manuscript to similar previous research. Only information essential to the arguments should be presented.

Materials and Methods:
This section must contain specific details about the materials studied, instruments used, specialized chemicals source and related experimental details which allows other research worker to reproduce the results. Obtain permission for all fully borrowed, adapted, and modified tables and provide a credit line in the footnote. Results and Discussions The results should be concisely presented. Results and discussion may be separate or combined based on the author's requirement. Tables and figures should be designed to maximize the comprehension of the experimental data. The interpreted results should be explained clearly in discussions and should relate them to the existing knowledge in the field as clearly as possible. Tables, Graphs and figures (Illustrations) should be inserted in to the main text at respective place they should appear when published and should have appropriate numbers and titles with an explanatory heading. Labels of the table, graph and figures MUST be in the text form and should not form part of the image. Colour photographs and illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs etc) must be clean originals or digital files would be charged that may be intimated along with the acceptance letter. Those photographs must be clear and sharp. Digital files are recommended for highest quality reproduction.

References:
References to the literature cited for the manuscript should be numbered in order of appearance in the manuscript and cited in the text with superscript numbers. The reference number should follow the following format.
For Journals Format : Author(s) of article (surname initials). Title of the manuscript. Journal title abbreviated Year of publication; volume number (issue number): page numbers.
Abderrahim A., Belhamel K., Jean-Claude Chalchat J-C., Figuérédo G., Chemical Composition of the Essential Oil from Artemisia arborescens L. Growing Wild in Algeria, Rec. Nat. Prod. 4:1 (2010) 87-90

For Books Format:
Author AA, Author BB, Author CC. Title of Book. Ed, Vol, Publisher, City, year, page numbers

Ethical Matters:
Authors involving in the usage of experimental animals and human subjects in their research article should seek approval from the appropriate Ethical committee in accordance with "Principles of Laboratory Animal Care". The Method section of the manuscript should include a statement to prove that the investigation was approved and that informed consent was obtained.

Revised manuscript submission:
When revision of a manuscript is requested, authors should return the revised version of their manuscript as soon as possible. Prompt action may ensure fast publication if a paper is finally accepted for publication.

Final proofreading:
Authors will receive a pdf file with the edited version of their manuscript for final proofreading. This is the last opportunity to view an article before its publication on the journal web site.

Online First service:

Manuscripts accepted for publication are published on-line in so called Online First service as soon as they are ready for publication (that is when final proofreading is performed by authors, and all concerns are resolved). Once a manuscript appears on the Web site it is considered as published.

Copyright:
Authors of articles published in ALGERIAN JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS retain the copyright of their articles and are free to reproduce and disseminate their work.

Editor in chief

Prof. Kamel BELHAMEL
Laboratory of Organic Materials,
Process Engineering Department,
Faculty of Technology,
University of Bejaia,
DZ-06000 Bejaia - ALGERIA

kamel.belhamel@univ-bejaia.dz
kamel.belhamel@yahoo.fr
ajnp.2013@yahoo.fr

Tel./Fax : 00 213 34 21 51 05

Editorial borad

- Prof. Boualem Saidani, University of Bejaia - Algeria
- Prof. Laid Makhloufi, University of Bejaia - Algeria
- Prof. Tahar Sadoun, University of Bejaia- Algeria
- Prof. Farouk Rezgui, University of Bejaia- Algeria
- Prof. Mohamed chérif ABERKANE, University of Batna-Algeria
- Prof. Ammar Dibi, University of Batna-Algeria
- Prof. Mohamed Yousfi, University of Laghouat- Algeria
- Prof. Hocine Ilikti, USTO- Algeria
- Prof. Armando J. D. Silvestre, University of Aveiro- Portugal
- Prof. Antonia Pérez de los Ríos, Universidad de Murcia- Spain
- Prof. Francesco Jose HERNANDEZ FERNANDEZ, Universidad de Murcia- Spain
- Prof. Salih S. AL-Juaid, King Abdulaziz University, Jeddah - Saudi Arabia
- Prof. Alessandro Casnati, University of Parma - Italy
- Prof. Emmanuel Rocca, University of Lorraine - France
- Prof. Azizi Omar, University of Setif- Algeria
- Prof. Rainer Ludwing, Freie Universität Berlin- Germany
- Prof. Yahia Harek, University of Tlemcen- Algeria
- Prof. Lahcen Larabi, University of Tlemcen- Algeria
- Prof. Larbi Zeroual, University of Setif- Algeria
- Prof. Abdelkrim Kahoul, University of Setif- Algeria
- Prof. Djaafar Benachour, University of Setif- Algeria
- Prof. Nacer-eddine Chelali, University of B.B.A-Algeria
- Prof. Khodir Madani, University of Bejaia- Algeria
- Prof. Fadila Benabdesselam, University of Bejaia - Algeria
- Prof. Salah Akkal, University of Constantine 1- Algeria
- Prof. Djamila Harrache, University of Sidi Bel Abbes -Algeria
- Prof. Rachid Salghi, National School of Applied Sciences, Agadir - Morocco
- Dr. Mohd. Hazwan Hussin, School of Chemical Sciences, Universiti Sains - Malaysia
- Prof. Noureddine Abidi, Fiber and Biopolymer Research Institute, Dept. of Plant and Soil Science, Texas Tech University, USA
- Prof. Hafida Merzouk, University of Tlemcen - Algeria

Contents of this issue:

Volume 2, Number 2, (2014)

Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie

Lamia LOUNACI, Souad ATHMANI-GUEMOURI
Algerian J. Nat. Products 2:2 (2014) 35-42
……35-42

Dégradation du Xyloglucane par les souches de *Paenibacillus polymyxa* isolées de la rhizosphère du blé dur sur des sols Algériens

Athmani-Guemouri S., Lounaci L., Djebbar R., Athmani R.,
Algerian J. Nat. Products 2:2 (2014) 43-55
……43-55

Evaluation de l'effet anti-oxydant des extraits de l'espèce Saharo-Endemique (*Myrtus nivellei Batt* & Trab.) obtenus in situ et in vitro

Meriem TOUAIBIA, Fatma Zohra CHAOUCH, Noria SMAIL, Fairouz SAIDI
Algerian J. Nat. Products, 2:2 (2014) 56-63
……56-63

Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L.

Nabil GHEDADBA, Leila HAMBABA, M. C. ABERKANE, S. M. Oueld-Mokhtar, Nassima FERCHA, Houas BOUSSELSELA.
Algerian J. Nat. Products, 2:2 (2014) 64-74
……..64-74

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391

Algerian Journal of Natural Products
www.ajnp.webs.com

Type of the Paper (Original paper)

Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie

Lamia Lounaci *, Souad Athmani-Guemouri

Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar, Alger, Algerie.
** Corresponding author: lounacilamia@yahoo.fr*
Téléphone: +21321247913. Fax : +21321247217

Received: 13-05-2014 / Revised: 28-05-2014/ Accepted:30-05-2014

Résumé: Les tests ont porté sur l'action de *P. polymyxa* SGK2 à l'égard de *F. graminearum, F. culmorum, F. verticillioides* et *M. nivale* agents de la fusariose du blé dur en Algérie.

La technique de confrontation directe en boîtes de Petri met en évidence une action inhibitrice caractérisée par un ralentissement de la croissance mycélienne. Après 7 jours d'incubation, un arrêt à distance des colonies du pathogène est observé. Nous étions également attachés à rechercher le (ou les) moyen utilisé par *P. polymyxa* SGK2 pour inhiber la croissance des mycètes tests. Cette capacité naturelle agit par la synthèse d'une (ou des) substance constitutive inhibitrice de la croissance des quatre champignons sur le milieu King B, d'une (ou des) substance inductible inhibitrice de la croissance du *F. culmorum* et *F. graminearum* sur le même milieu, et d'une (ou des) substance volatile inhibitrice de la croissance des quatre mycètes sur les milieux King B et PDA.

Mots clés: *F. culmorum*, *F. graminearum, F. verticillioides,* Fusariose, Lutte biologique, *M. nivale, P. polymyxa, Triticum durum.*

I- Introduction

Les produits chimiques utilisés à l'heure actuelle pour lutter contre les agents responsables de la fusariose du blé présentent des inconvénients. La plupart d'entre eux sont toxiques pour les utilisateurs qui entrent en contact avec la substance de préservation. Cela justifie les recherches actuellement menées dans ce domaine, qui tendent à mettre au point de nouvelles méthodes de lutte moins nuisibles pour l'environnement. *Paenibacillus polymyxa* (syn. *Bacillus polymyxa* [1]) représente un certain intérêt car elle appartient au groupe des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) [2]. La promotion de la croissance peut s'établir par l'intermédiaire de mécanismes directs ou indirects. Les effets directs s'observent dans le cas où les métabolites produits par la bactérie inoculée stimulent la croissance de la plante indépendamment de la microflore rhizosphérique native [3]. Au contraire, un effet indirect s'exerce par un comportement compétitif voire antagoniste de la population introduite, vis-à-vis de populations délétères ou pathogènes [4,5]. En Algérie, la lutte chimique n'a pas permis de maîtriser l'évolution inquiétante des agents de la fusariose sur une culture de blé de plus en plus importante. Ce travail s'intéresse à la mesure de l'action *in vitro* de *P. polymyxa* SGK2 sur *F. graminearum*, *F. culmorum, F.verticillioides*, et *M. nivale*, agents de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*), et de procéder à la recherche du moyen utilisé par cette souche bactérienne pour inhiber la croissance des mycètes tests.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

II. Matériel et Méthodes

II.1. Souches microbiennes

II.1.1. Matériel fongique

Les 4 champignons qui ont fait l'objet de l'étude ont été fournis par le laboratoire de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.) d'El-Harrach (Alger, Algérie). Il s'agit de *F. graminearum*, *F. culmorum, F.verticillioides*, et *M. nivale* (Tab.1)

Tableau 1: *Codes et origines des mycètes pathogènes*

Isolat N°	Code	Origine	Année d'isolement	Espèce
1	FG04/08	Hd blé tendre ITGC (collet)	2008	*F. graminearum*
2	FC01/08	Vitron ITGC (collet)	2008	*F. culmorum*
3	FV01/07	Variété Latino INA blé tendre (épis)	2007	*F. verticillioides*
4	MN01/08	Vitron INA (collet)	2008	*M. nivale*

II.1.2. Origine de la rhizobactérie isolée

La souche de *P.polymyxa* SGK2 utilisée dans ce travail a été isolée de la rhizosphère du blé dur sur un sol de Tiaret, cultivé depuis plus de 100 ans par une méthode immuno-Enzymatique (immuno-piégeage) [6]. Elle avait été identifiée et sa diversité recherchée à l'aide de différentes méthodes: API (Analytical Profile Index), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et séquençage du gène de l'ARNr16S [7]. Cette souche bactérienne appartient au groupe ERIC-PCR 1 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymeras Chain Reaction), elle fait partie du groupe de souches les plus adaptées à la rhizosphère du blé dur et elle est caractérisée par son pouvoir de dégradation du xyloglucane et sa capacité à entraver le développement *in vitro* de plusieurs mycètes phytopathogènes [8].

II.2. Confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Petri

Les milieux King B et PDA sont utilisés pour le test de confrontation *in vitro*. La bactérie est inoculée sous forme d'une strie rectiligne qui partage la boîte en deux parties égales. Deux disques, de 5 cm de diamètre, obtenus à l'emporte pièce, d'une culture de champignon sur gélose, sont déposés de part et d'autre de la strie à 1 cm du bord de la boîte. Les boîtes témoins ne sont pas ensemencées avec la bactérie. Les boîtes sont ensuite incubées à l'obscurité pendant 7 jours à 28°C. La durée d'incubation est prolongée pendant 30 jours afin de surveiller la stabilité des résultats obtenus dans ce test. Au cours de cette expérimentation, trois répétitions ont été retenues pour chaque test.

II.2.1. Calcul du pourcentage d'inhibition

Les mesures de la croissance mycélienne sont prisent quotidiennement et le test s'achève lorsque l'une des colonies aura couvert l'ensemble de la boîte.Pour l'estimation de la croissance mycélienne, qui consiste à mesurer quotidiennement (toutes les 24 heures) le diamètre de la colonie mycélienne du champignon pathogène à l'aide d'un pied à coulisse [9].L'évaluation de l'inhibition exercée par *P. polymyxa* SGK2 est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne selon la formule suivante [10]:

$$\mathbf{I\ (\%) = 1 - (C_n / C_o) \times 100}$$

où:

C_n: le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste.

C_o : le diamètre moyen des colonies témoins.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

II.2.2. Recherche d'une substance active sur le développement des champignons
II.2.2.1. Recherche d'une substance constitutive

On répète l'expérience portant sur la confrontation du champignon et de la bactérie en boîte de Petri. Cependant, on dépose un disque de gélose prélevé à proximité de la bactérie [11].

II.2.2.2. Recherche d'une substance inductible

On utilise comme matériel de départ des milieux en boîtes de Petri ensemencés avec le champignon et la bactérie. Un disque gélosé provenant de ces boîtes est prélevé dans la zone d'inhibition (entre le champignon et la bactérie). Il est placé entre 2 disques gélosés supportant le champignon [11].

II.2.2.3. Recherche d'une compétition trophique entre le champignon et la bactérie sur les milieux PDA et King B:

On utilise une boîte ensemencée avec le champignon et la bactérie. Cette boîte doit traduire un antagonisme entre la bactérie et le champignon. L'élimination de la moitié de la strie centrale en enlevant la gélose et la bactérie permet les interprétations exposées sur la figure 1.

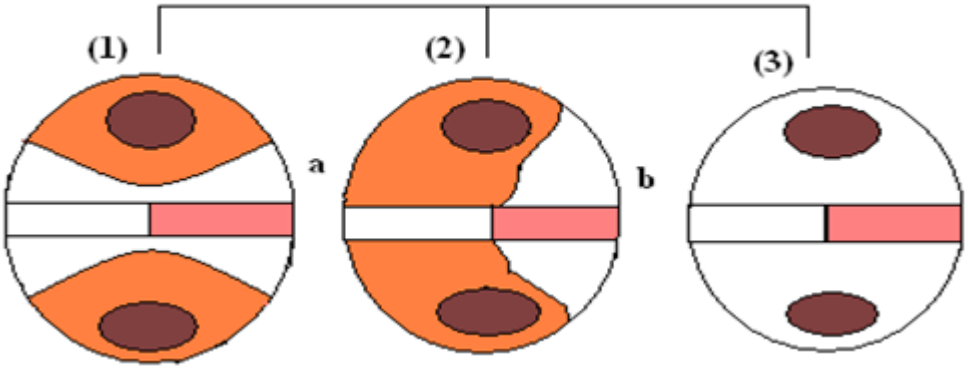


Figure 1: *Lecture des résultats de la recherche d'une compétition trophique. Le champignon reprend sa croissance uniformément (1) du côté ou la bactérie a été éliminée (2a) : pas d'inhibition trophique, par contre il y'a une inhibition trophique au niveau du compartiment (2b). Le champignon ne reprend pas sa croissance (3) : l'hypothèse de l'inhibition trophique reste possible.*

II.2.2.4. Recherche d'une substance inhibitrice volatile sur les milieux PDA et King B par l'utilisation de boîtes de Petri compartimentées:

Le champignon et la bactérie sont ensemencés dans une boîte de Petri à trois compartiments. On ensemence le champignon dans l'un des compartiments et la bactérie dans les deux autres. Les boîtes témoins sont ensemencées avec le champignon uniquement. On observe si la présence de la bactérie entraîne un retard de croissance du champignon [11].

III. Résultats et Discussion
III.1. Test de confrontation *in vitro*

Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne des souches témoins est plus importante par rapport à celle obtenue avec les différentes confrontations (Pathogène-Antagoniste). Après 7 jours d'incubation, une action inhibitrice exercée par la souche SGK2 vis-à-vis de la croissance mycélienne a été observée. Les pourcentages d'inhibition, calculés

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

pour les différentes confrontations sur les deux milieux de culture PDA et King B, sont indiqués dans le Tableau 2.

***Tableau. 2**: Pourcentage d'inhibition de la croissance des quatre mycètes tests en présence de P. polymyxa SGK2 après 7 jours d'incubation à 28°C.*

Milieux / Champignons	Pourcentage d'inhibition (%) King B	PDA
F. verticillioides	37,41	12,47
F. culmorum	58,73	0,97
F.graminearum	70,84	3,13
M. nivale	66,11	1,41

La souche *P. polymyxa* SGK2 inhibe le développement des champignons dans les proportions variant de 37,41 à 70,84% et de 0,97 à 12,47% respectivement sur le milieu King B et le milieu PDA. *F. graminearum* semble être le plus sensible sur le milieu King B avec un pourcentage d'inhibition de 70,84%, tandis que *F. verticillioides* semble le plus sensible sur le milieu PDA avec un pourcentage d'inhibition de 12,47%. On peut constater que la croissance de *F. graminearum, M. nivale* et *F. culmorum* est fortement inhibée par *P. polymyxa* SGK2 sur le milieu King B, avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%, alors que dans le milieu PDA, le pourcentage d'inhibition de ces trois champignons est inférieur à 4%, ceci laisse supposer que le mécanisme d'action de *P. polymyxa* SGK2 est différent sur les deux milieux de culture. Le fort pouvoir inhibiteur exercé par la souche SGK2 vis-à-vis du mycète cible sur le milieu King B carencé en fer peut être expliqué par un phénomène de compétition pour cet élément. L'inhibition des mycètes sur le milieu carencé en fer peut non seulement être due aux sidérophores, mais aussi à la production d'une substance antibiotique dépendante de la concentration en fer [12]. Mais le mécanisme le plus classique est que les souches sont capables de réduire la croissance de ces agents en synthétisant des sidérophores. Alternativement, la concurrence directe pour les aliments est un scénario possible. *P. polymyxa* SGK2 se développe plus rapidement par rapport aux mycètes en colonisant le milieu de culture et en ravissant les éléments nutritifs, c'est le phénomène de compétition. Sur milieu PDA, l'inhibition de la croissance du *F. graminearum, F. culmorum* et *M. nivale* n'était pas bien marquée. Ceci s'expliquerait par la vitesse de croissance plus importante de ces mycètes sur ce milieu en comparaison avec celles developpées sur le milieu King B.

III.2. Recherche du moyen utilisé par *P. polymyxa* SGK2 pour inhiber la croissance des mycètes tests

III.2.1. Recherche d'une substance constitutive inhibitrice de la croissance des champignons

La gélose prélevée à proximité de la bactérie est placée entre deux disques de gélose supportant le champignon. Cette expérience met en évidence une (ou des) substance produite par *P. polymyxa* SGK2 et active sur la croissance des mycètes tests sur le milieu King B. Des chercheurs sont attachés à déterminer le mode d'action de 03 *Bacillus* et 4 actinomycètes sur les champignons du bleuissement du bois. Ces bactéries n'agissent ni par la synthèse d'une substance volatile, ni par compétition trophique. L'antagonisme est lié à la production d'une ou de plusieurs substances inhibitrices constitutives qui diffusent dans le milieu de culture [10]. Dans le milieu PDA, le disque de gélose supposé contenir la substance inhibitrice, ne permet pas l'arrêt de la croissance des quatre mycètes. On peut supposer dans ce cas, que la rémanence de la substance est trop faible pour être mise en évidence. En effet, l'expérience dure 7 jours (délai nécessaire au recouvrement par le

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

champignon de la boîte témoin). Il est possible que la dégradation de la substance survienne bien avant la fin de l'expérience. La souche SGK2 semble inefficace sur le milieu PDA. Ce dernier est éliminé des expériences futures (recherche d'une substance inductible inhibitrice de la croissance des champignons et recherche d'une compétition trophique). Dans le cas positif, sur le milieu King B, on constate que la substance inhibitrice de la croissance des mycètes tests est toujours active 4 semaines après le début de l'expérience, ce qui confirme sa stabilité dans le temps.

III.2.2. Recherche d'une substance inductible inhibitrice de la croissance des champignons

Certaines bactéries produisent des métabolites de façon constante, c'est à dire indépendamment du milieu dans lequel elles se trouvent, d'autres par contre ne les produisent qu'en présence d'un inducteur. Dans le cas qui nous intéresse, l'inducteur pourrait être une substance produite par le champignon. L'expérience réalisée, ne permet pas la synthèse de ces substances inductibles si elles existent puisque le disque de gélose est prélevé d'une boîte de Petri ne contenant que la bactérie. C'est pourquoi nous avons réalisé une seconde expérience où le disque gélosé est prélevé d'une boîte de Petri dans laquelle sont cultivés à la fois la bactérie et le champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués dans le Tableau 3. Le disque gélosé supposé contenir la substance inhibitrice prélevé dans la zone d'inhibition (entre le champignon et la bactérie) est placé entre deux disques gélosés supportant le champignon, a permis d'entraver uniquement la croissance de *F. culmorum* et *F. graminearum*. Ces deux mycètes ont une influence sur la production d'antifongiques.Nous avons remarqué aussi que l'inhibition de la croissance des mycètes tests était plus importante en présence de *P. polymyxa* SGK2.

Tableau.3*: Mise en évidence d'une substance inductible inhibitrice de la croissance des champignons.*

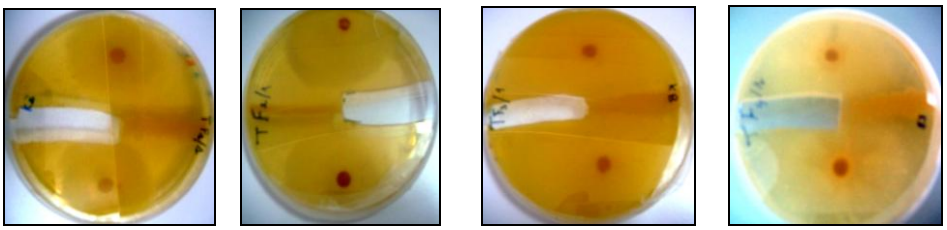
Milieux / Champignons	King B
F. verticillioides	-
F. culmorum	+
F.graminearum	+
M. nivale	-

- : Le champignon entre en contact avec le disque de gélose
+: Zone d'inhibition entre le champignon et le disque de gélose

III.2.3. Recherche d'une compétition trophique

Lorsque la moitié de la strie bactérienne est éliminée du milieu de culture, le champignon poursuit sa croissance de façon homogène, qu'il y ait, ou qu'il n'y ait plus la bactérie. Cette expérience montre que la croissance du champignon est ralentie, mais toujours possible (Figure.2). L'inhibition de la croissance n'est pas due à une compétition trophique, ou bien la substance inhibitrice n'est pas stable.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

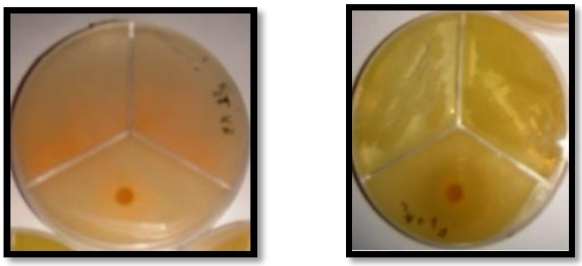


F. verticillioides *F. culmorum* *F.graminearum* *M. nivale*

***Figure.2**: Recherche d'une compétition trophique sur le milieu King B, après 7 jours d'incubation à 28°C à l'obscurité.*

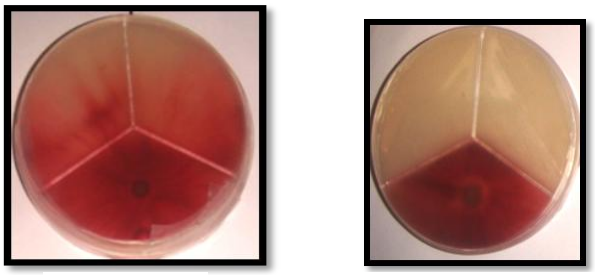
III.2.4. Recherche d'une substance volatile inhibitrice de la croissance des champignons

Le compartimentage évite le contact entre la gélose supportant la bactérie et la gélose sur laquelle se trouve le champignon. On empêche ainsi la diffusion de substances dans le milieu de culture. Seule une substance volatile produite par la bactérie pourra dans cet essai provoquer une inhibition de la croissance du champignon. Les résultats obtenus à la suite de cette expérience sont indiqués dans les figures 3 et 4. Il ressort que, malgré l'absence d'un contact direct entre les isolats de *Fusarium* testés et la souche *P. polymyxa* SGK2, cette dernière a pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies des mycètes agressifs. Ceci s'expliquerait par l'aptitude de l'antagoniste à produire des substances volatiles qui sont capables de limiter et même de stopper le développement des agents pathogènes.



Témoin SGK2+ *F. graminearum*

***Figure.3**: Recherche d'une substance volatile inhibitrice de la croissance du F.graminearum sur le milieu King B après 7 jours d'incubation à 28°C à l'obscurité (Utilisation de boîtes de Petri compartimentées).*



Témoin SGK2 + *F. culmorum*

***Figure. 4**: Recherche d'une substance volatile inhibitrice de la croissance du F. culmorum sur le milieu PDA après 7 jours d'incubation à 28°C à l'obscurité (Utilisation de boîtes de Petri compartimentées).*

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

De même, des chercheurs ont mis en évidence la production d'une substance volatile par la souche *P. polymyxa* E681. En effet, Les résultats ont démontré pour la première fois que cette souche produit un mélange volatil qui peut améliorer la croissance des plantes et susciter une résistance systémique induite contre *Pseudomonas syringae* en l'absence de contact physique avec les plantes [13].

IV. Conclusion et perspectives

Cette étude a montré l'effet nettement antagoniste de *P. polymyxa* SGK2 vis -à- vis de *F. graminearum*, *F. culmorum, F. verticillioides*, et *M. nivale*, agents responsables de la fusariose du blé en Algérie. En effet, les essais de confrontations entre ces mycètes et *P.polymyxa* SGK2, que ce soit d'une façon directe sur milieu de culture ou bien à distance, ont révélé une inhibition de la croissance mycélienne des pathogènes testés. Dans le cas de la confrontation à distance, malgré l'absence d'un contact direct entre les pathogènes et l'agent antagoniste, une réduction du diamètre des colonies des mycètes est observée par rapport au témoin non traité. Cela prouve qu'en plus de son pouvoir de produire une (ou des) substance constitutive, une (ou des) substance inductible, il est donc préférable d'appliquer celle- ci afin qu'elle assure une sécrétion continue. *P. polymyxa* SGK2 peut agir par la sécrétion de substances volatiles qui sont capables de stopper à distance le développement de l'agent pathogène. En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial d'utiliser la souche *P. polymyxa* SGK2 en tant qu'agent de lutte biologique contre la fusariose du blé.

V. Références bibliographiques:

[1] Ash C., Priest F.G and Collins M.D. Molecular identification of RNAr group 3 *Bacillus* using PCR prob test. Proposal for the creation of new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64 (1993) 253-260.

[2] Selim S., Neger J., Govaert C., Gianinazzi S. and Van Tuinen D. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by Paenibacillus polymyxa sp. Strain B2 isolated from the sorghum mycorhizosphère. *Appl Environ Microbiol* 71 (2005) 6501-6507.

[3] Timmusk S., Mechanism of Action of the Plant Growth Promoting Bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Technology, Uppsala, *Acta Universitatis Upsaliensis* 908 (2003) 40.

[4] Lorentz R.H., Artico S'da Silveira B.A., Einsfeld A. and Corcao G. Evaluation of antimicrobial activity environment in Paenibacillus spp. Syrains isolated from natural , *Letter in Appl. Microbiol.* 43(5) (2006) 541-547.

[5] Rasa W., Shen Q. Growth , Fe (3+) Reductase Activity, and Siderophores production by Paenibacillus Polymyxa SQR -21 Under Differential Iron Conditions. Rev. Current Microbiology, Edit. Springer New York. ISSN (2010) 8651.

[6] Guemouri, S. Isolement et caractérisation des souches de *Bacillus polymyxa* isolées de différents sols algériens, Thèse. Magister. U.S.T.H.B., Alger (1992) 111.

[7] Guemouri-Athmani, S.; Berge, O.; Bourrain, M.; Mavingui, P.; Thiéry, J.M.; Bhatnagar, T.; Heulin, T. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian Soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36 (2000)149-159.

[8] Athmani-Guemouri S. Adaptation des populations de *Paenibacillus polymyxa* aux racines de blé dur cultivé sur des sols algériens. Thèse Doctorat, USTHB, Alger (2006) 189 pp.

[9] Benkada Y.M., Bendahmane B.S. et Saiah F. Essai de lutte biologique *in vitro* par l'utilisation de *Trichoderma* sp. A l'égard de *Ascochyta Pinodella* agent de l'anthracnose du pois (*Pisum Sativum* L.). articl. Faculté des sciences de l'ingénieur, Université Abdelhamid Ibn Badis. Mustaganem Algérie (2010).

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

[10] Hmouni A., Hajlaoui MR., Mlaiki A. Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie, *OEPP/EPPO Bull.* 26 (1996) 697–705.

[11] Bezert G., Chappe P., Mourey A. and Loubinoux B. Action de *Bacillus* et d'actinomycètes sur les champignons du bleuissement du bois. Articl. LERMAB, Equipe Chimie Organique-Microbio. Univ. Henri Poincaré Nancy I, France 6 (1996) 174-190.

[12] Tomashow L.S. and Weller D.M. Role of antibiotics and sidérophores in biocontrol of take-all disease of wheat. *Plant Soil*. 129 (1990) 93-99.

[13] Lee B., Farag M.A., Park H.B., Kloepper J.W., Lee S.H. et Ryu C.M. Résistance systémique induite contre *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* par une longue chaîne bactérienne volatile émise par *Paenibacillus polymyxa* dans *Arabidopsis thaliana*. Les progrès récents en engrais biologiques et fongicides biologiques (PGPR) pour une agriculture durable. Actes du 3ème Conférence asiatique sur la croissance des plantes-Promouvoir Rhizobacteria (PGPR) et d'autres agents microbiens, Manille, Philippines, 21-24 (2012) 462-468.

Please cite this Article as:

Lamia Lounaci, Souad Athmani-Guemouri, Action de *Paenibacillus polymyxa* SGK2 sur quelques champignons de la fusariose du blé dur (*Triticum durum*) en Algérie, ***Algerian J. Nat. Products***, **2:2 (2014) 35-42.**

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391

Algerian Journal of Natural Products
www.ajnp.webs.com

Type of the Paper (Original paper)

Dégradation du Xyloglucane par les souches de *Paenibacillus polymyxa* isolées de la rhizosphère du blé dur sur des sols Algériens

Souad Athmani-Guemouri*, Lamia Lounaci, Reda Djebbar, Rabah Athmani

Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar, Alger, Algérie.
** Corresponding author: sguemouri_dz66@yahoo.fr*
Téléphone : +21321247913. Fax : +21321247217

Received: 27/04/2014/ Revised: 11-06-2014/ Accepted: 22-06-2014

Résumé : Les espèces du genre *Paenibacillus* secrètent une variété d'enzymes extracellulaires parmi lesquelles figurent plusieurs types de β glucanases.

Nous avons réalisé un test de dégradation du xyloglucane sur 29 souches isolées par immunopiégeage et identifiées à *P. polymyxa* par le système API50CHB. Ces souches ont été groupées en séries qui correspondent aux échantillons de sols à partir desquels elles avaient été isolées. Des souches de références et des souches type *E. coli* ont été intégrées lors de cette étude pour comparer leur activité à celles des souches isolées des sols d'Algérie.

Les résultats de cette recherche montrent que toutes les souches de *P. polymyxa* sont capables de dégrader le xyloglucane, alors que les souches des espèces testées n'ont pas cette activité. Ces résultats semblent suggérer que cette propriété est partagée par tous les *P. polymyxa* et qu'elle n'est pas liée au sol d'origine de nos souches ni à l'ancienneté de culture du blé de ces sols. Nous avons également montré que la xyloglucanase fait partie du pool d'enzymes inductibles qui ne sont normalement présentes qu'à l'état de traces dans les bactéries, et dont la synthèse est amplifiée considérablement en présence de leur substrat.

***Mots clés** : Paenibacillus polymyxa, xyloglucane, xyloglucanase.*

I- Introduction

La rhizosphère est un «réacteur» multi agents d'une grande complexité, dont l'équilibre est régi par une multitude de mécanismes fortement corrélés les uns aux autres.

Dans cet environnement complexe, les interactions entre les micro-organismes et les plantes sont variées. De nombreuses bactéries commensales se multiplient sans que leur influence sur le développement des végétaux soit bien définie. Certains micro-organismes (*Fusarium, Pythium*, *Verticillium*) ont une action pathogène qui conduit à une réduction plus ou moins marquée du développement des plantes. Il existe aussi des bactéries qui ont une activité antagoniste de ces mycètes pathogènes et entraînent donc une amélioration de la santé de la plante.

L'utilisation de ces bactéries en agriculture peut être envisagée dans un objectif de lutte biologique contre les mycètes pathogènes du sol. En effet, les maladies fongiques sont

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

classiquement contrôlées par les fongicides, mais ceux-ci ne sont pas toujours efficaces contre les pathologies d'origine tellurique comme les fusarioses de pourriture et vasculaires, les verticillioses, le piétin échaudage. De plus, ils peuvent être néfastes pour l'environnement.

La prise de conscience de la nécessité de préserver l'environnement en limitant les pollutions chimiques oriente les stratégies de lutte contre les maladies et les ravageurs vers l'emploi de moyens biologiques pour substituer les moyens chimiques.

Deux grandes approches sont envisagées : l'une est la démarche classique d'amélioration des plantes pour sélectionner des caractères intrinsèques de résistance. Ce principe de sélection de variétés plus performantes est connu depuis longtemps et se faisait jusqu'à maintenant en effectuant des croisements entre espèces voisines ou écotypes. Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, il est devenu possible aussi de transformer génétiquement les plantes en leur introduisant des gènes dont la fonction est connue. Ces plantes « transgéniques » possèdent un gène supplémentaire dans leur patrimoine génétique permettant de résister à un pathogène.

Jack et *al*. (1992) [1] ont montré que la même plante transformée par une chitinase bactérienne s'est montrée résistante à *Rhizoctonia solani.* En introduisant dans le tabac un gène de chitinase de tabac, Vierheilig et *al.* (1993) [2] ont obtenu un résultat similaire. Toutefois la chitinase ne confère pas de résistance à tous les mycètes. Ainsi, ce tabac n'était pas résistant à *Cercospora nicotianae* [3]. Les auteurs ont tiré la conclusion que la chitinase seule n'agit pas sur ce mycète et qu'elle serait plus active en présence de β-1,3-xyloglucanase.

L'autre voie possible consiste à utiliser des micro-organismes naturellement antagonistes d'agents pathogènes qui, dispersés dans le sol ou apportés par enrobage ou encapsulation de semences, peuvent constituer une solution à la fois élégante et respectueuse de l'environnement. C'est un changement fondamental de la philosophie de la lutte contre les agents phytopathogènes. Une telle conception de la protection des végétaux pourrait satisfaire à la fois les exigences économiques, toxicologiques et écologiques.

L'espèce *P. polymyxa* est parmi les micro-organismes naturellement antagonistes des agents phytopathogènes. En effet, plusieurs travaux montrent une activité antagoniste contre les champignons pathogènes suivants : *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [4], *Penicillium hirsutum* [5], *Fusarium* [6, 7, 8, 9,10], *Pythium* [11, 12, 13], *Phytophthora palmivora* [14, 15, 16], *Aspergillus niger* [17], *Botrytis cinerea* [18] ainsi que contre plusieurs bactéries Gram positives et Gram négatives [19, 20, 21].

Compte tenu de ce qui précède, il nous a semblé opportun de procéder à la sélection des souches xyloglucanases positives sur un milieu nutritif contenant comme seule source de carbone et d'énergie du xyloglucane, et ce parmi 29 souches de *P. polymyxa*. Ce choix est guidé par le fait que les travaux réalisés jusqu'à présent concernent l'attaque d'autres hydrates de carbone comme la chitine, l'amygdaline et le mélibiose, alors qu'une faible attention s'est portée sur la dégradation de ce substrat. Pourtant le pouvoir de dégradation de ce polymère pourrait conférer aux souches bactériennes une action antagoniste contre certains mycètes phytopathogènes. De plus, la sélection des souches ayant une activité xyloglucanasique pourrait présenter un intérêt pratique si l'on se réfère à l'augmentation du pouvoir de défense de certaines plantes ayant reçu le gène de la xyloglucanase bactérienne contre des mycètes phytopathogènes. En outre, nous avons étudié l'effet de l'âge de la culture en blé et de l'origine des souches sur le pouvoir de dégradation de ce polymère. Pour finir, nous avons déterminé à quelle phase de la croissance bactérienne cette enzyme est synthétisée et à quelle catégorie elle appartient (enzyme constitutive ou inductible).

II. Matériel et Méthodes

II.1. Souches bactériennes

II.1.1. Souches de références et de collections

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Les souches *Rhizobium gallicum* R602^T, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Rhizobium* sp. YAS34, *Pseudomonas brassicacearum* NFM421, et *E. coli* EDCM367 obtenues des collections du LEMIR (CNRS, France) ont été utilisées lors de cette étude. Elles ont permis de comparer leur activité à celles des souches de *P. polymyxa* isolées d'Algérie pour le test de dégradation du xyloglucane.

II.1.2. Souches isolées de la rhizosphère du blé dur dans des sols Algériens

Les vingt neuf (29) souches de *P. polymyxa* utilisées dans ce travail, consacré à la recherche d'une activité xyloglucanasique, ont été isolées précédemment des sols algériens par une méthode immuno-enzymatique *immuno-piégeage*, utilisant comme piège les anticorps spécifiques de la bactérie à isoler [22]. Ces souches proviennent de différents sols cultivés avec du blé dur (*Triticum durum*, cv. Waha) plus précisément du sol rhizosphérique (Tab. 1). Les souches avaient été identifiées et leur diversité recherchée à l'aide des différentes méthodes Analytical Profile Index(API), Restriction Fragment Lenght Polymorphism(RFLP) et séquençage du gène de l'ARNr 16S [23].

II.2. Dégradation du xyloglucane

Dans le cadre de la recherche d'une activité xyloglucanasique, la réaction étudiée est l'assimilation. Elle se traduit par une croissance de la souche bactérienne quand le xyloglucane (Megazyme Sydney, Australia) est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie.

Pour faciliter la lecture et la fiabilité du test, nous avons utilisé un produit qui est le polymère lié au bleu brillant de Remazol (brillant blue R). La croissance est repérée facilement grâce à l'apparition d'une couleur bleue très intense au niveau de la colonie. En effet, le colorant qui, lorsque la bactérie dégrade le xyloglucane est libéré, diffuse dans la gélose et donne une couleur bleue très caractéristique.

II.2.1. Activité xyloglucanase des souches de *P. polymyxa*

Le test a été réalisé en microplaques de 12 puits contenant chacun un volume de 200 µl de milieu RCV agar additionné de xyloglucane (Solution II 50 mL/L, Tampon phosphate 15 mL/L, Extrait de levure 0,1 mL/L, Agar 15 g/L, Xyloglucane 1 g/L, Eau distillée qsp 1000 mL).

Chaque souche pure est cultivée en milieu liquide TSB/10 (TSB 3 g/L, Eau distillée qsp 1000mL) pendant 24 h à 30°C et atteint environ 10^8 bactéries/mL. Des dilutions 10^{-3} et 10^{-5} dans l'eau physiologique stérile 8,5 ‰ KCl sont réalisées. Des volumes de 10 µl de la culture dense et des deux dilutions sont ensuite déposés sur le milieu RCV-xyloglucane dans les puits de plaque afin de tester des niveaux d'inoculum d'environ 10^6, 10^3 et 10 cellules par puits.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Les microplaques sont incubées à 30° C. Une lecture visuelle des plaques est faite au bout de 24 et 48 h.

***Tableau 1** : Souches de Paenibacillus polymyxa, origine, âge de culture en blé dur et groupe Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR*) [22, 24].

Souches	Origine	Age de culture en blé dur (ans)	Groupe ERIC-PCR
SGT4	Tiaret	>100	1
SGT9			1
SGT12			2
SGT38			1
SGK2	Tiaret	>100	1
SGK12			5
SGK20			4
SGK28			4
SGK35			5
SGK37			6
SGD1	IDGC (Institut de développement des grandes cultures)	70	10
SGD4			11
SGD7			10
SGD8			9
SGD12			13
SGD13			12
SGD17			11
SGD18			9
SGZ1	Hamiz	26	15
SGZ5			16
SGZ8			17
SGZ10			14
SGZ11			15
SGZ12			18
SGH1	Hamiz	5	19
SGH2			20
SGH3			21
SGH4			22
SGH5			23

II.2.2. Production de xyloglucanase au cours de la croissance de *P. polymyxa* SGK2

II.2.2.1. Courbe de croissance de *P. polymyxa* SGK2

Afin de déterminer à quelle phase de la croissance bactérienne l'enzyme est produite, nous avons jugé utile de tracer la courbe de croissance de la souche SGK2. Pour cela, 30 mL de milieu Luria Bertani "LB"(Tryptone 10g/L, Extrait de levure 5 g/l, NaCl 5 g/L, Eau distillée qsp 1000 mL) sont ensemencés avec la souche sont ensemencés avec la souche et incubées à 30°C. Des prélèvements de 2 mL sont effectués à différents moments de la croissance (Tab. 2) et sont centrifugés à 10.000 trs/mn pendant 10 min. Après centrifugation des cultures, les culots cellulaires sont lavés avec 2 mL d'eau ultra pure stérile.

La densité optique est lue à une longueur d'onde de 600 nm au spectrophotomètre.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Tableau 2: *Les différents prélèvements effectués pour la réalisation de la courbe de croissance de la souche SGK2.*

Prélèvement	Age de la culture
1er	5 h
2ème	23 h 30
3ème	25 h
4ème	26 h 30
5ème	28 h
6ème	29 h 30
7ème	47 h 15
8ème	49 h
9ème	50 h 30
10ème	52 h
11ème	53 h 30
12ème	71 h 15
13ème	75 h 15

II.2.2.2. Phase de production de la xyloglucanase

Une fois la courbe de croissance tracée, nous avons procédé à la détermination de la phase de production de l'enzyme.

Pour cela, 10 µl de la culture bactérienne (et de ses dilutions 10^{-3} et 10^{-5}) âgée de 18, 20, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 50 et 52 h sont inoculés dans les puits de la plaque contenant le RCV-xyloglucane. Trois répétitions sont réalisées. Une lecture visuelle de la galerie est faite au bout de 24 et 48 h.

Une centrifugation de la culture bactérienne de la SGK2 dans du LB et réalisée afin de récupérer et tester le surnageant sur un milieu gélosé contenant du xyloglucane comme seule source de carbone et d'énergie.

- **Les étapes réalisées sont les suivantes :**

- La souche SGK2 est ensemencée dans le milieu LB puis incubée à 30° C.
- Après 31 h de croissance, un volume de 1 mL est prélevé et est centrifugé à 13 000 trs/mn pendant un temps de 15 min puis le surnageant est filtré en utilisant un filtre de 0,45 µm de diamètre.
- 10 µl du surnageant filtré sont inoculés dans un puits de la plaque contenant le milieu RCV-xyloglucane ; trois répétitions sont réalisées.
- La microplaque est incubée à 30° C. Une lecture visuelle est faite au bout de 24 h et 48 h.

III. Résultats et Discussion

III.1. Activité xyloglucanase des souches de *P. polymyxa*

Les enzymes peuvent être divisées en deux catégories selon leur localisation *in vivo* : les endo-enzymes, sont synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule ; les exo-enzymes, sont des enzymes extracellulaires qui diffusent dans les milieux de culture et qui ont pour mission de « découper » les grosses molécules de nutriments, incapables de pénétrer directement dans la cellule, comme le xyloglucane.
Nous avons réalisé un test de dégradation du xyloglucane sur vingt-neuf souches de *P. polymyxa* isolées de la rhizosphère du blé dur dans des sols algériens (Fig. 1).

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

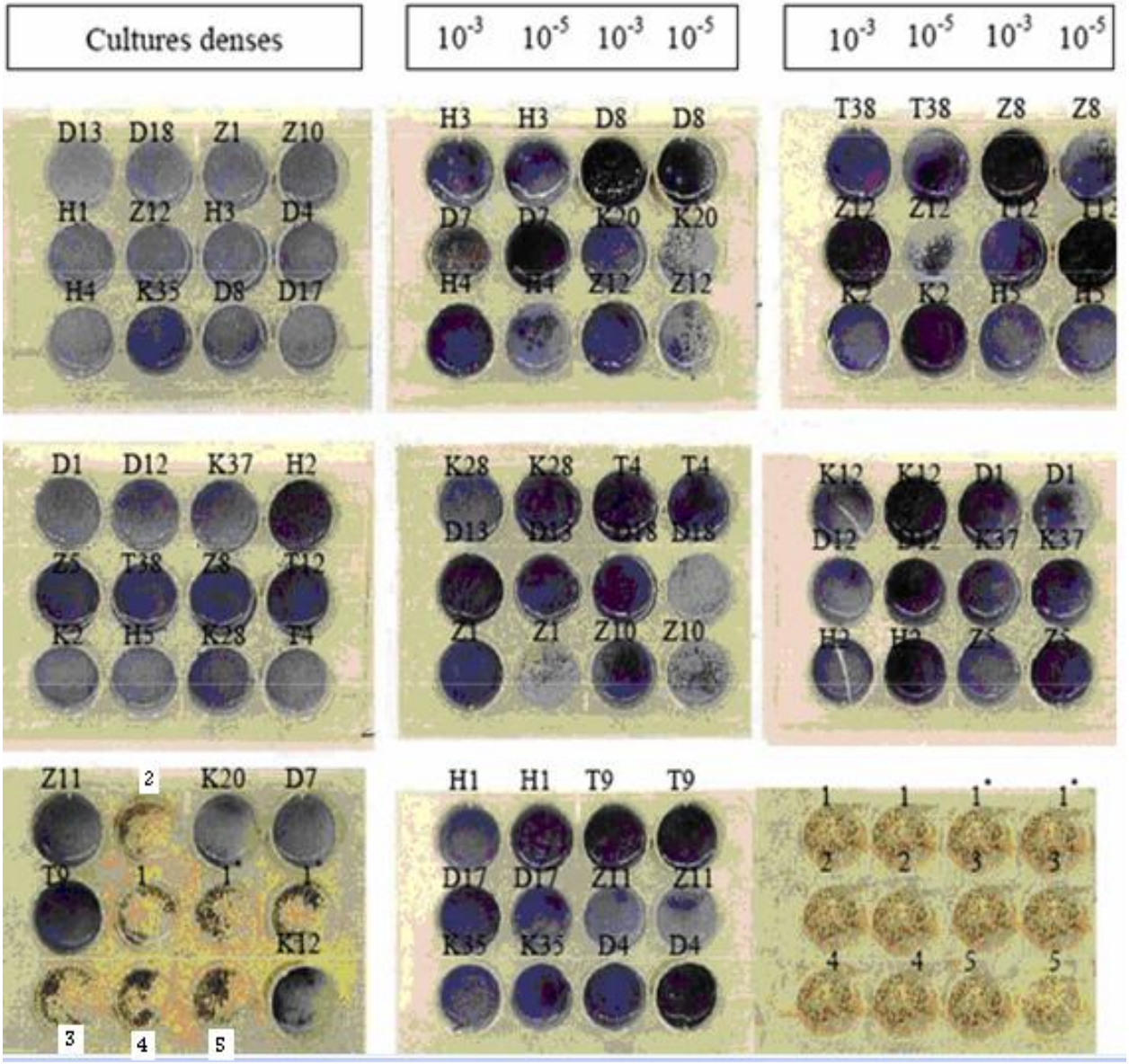


***Figure 1**: Dégradation du xyloglucane par 29 souches de P. polymyxa. L'incubation a lieu à 30° C pendant 48 h en microplaques. 1• : Répétition ; 1 : E. coli EDCM367 ; 2 : R. gallicum R602^T ; 3 : P. brassicacearum NFM421 ; 4 : Sinorhizobium meliloti 1021 ; 5 : Rhizobium sp.YAS34.*

La dégradation du xyloglucane par les souches de *P. polymyxa* en microplaques se traduit par l'apparition d'une couleur bleue. Il convient de noter que plus la dégradation du polymère est importante, plus l'intensité de la couleur augmente (Fig. 1).

Les résultats, synthétisés dans le Tableau 3, montrent que toutes les souches de *P. polymyxa* sont capables de dégrader le xyloglucane, alors que les souches des espèces testées n'ont pas cette activité (Fig. 1). Les trois concentrations de *P. polymyxa* ont montré cette activité, la culture dense ainsi que ses deux dilutions 10^{-3} et 10^{-5}.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Tableau 3: *Dégradation du xyloglucane par les 29 souches de P. polymyxa après incubation à 30°C pendant 48 heures.*

Souches	Culture dense	Dilution10^{-3}	Dilution10^{-5}
SGT4, SGT9, SGT12, SGT38, SGK2, SGK12, SGK20, SGK28, SGK35, SGK37, SGD1, SGD4, SGD7, SGD8, SGD12, SGD13, SGD17, SGD18, SGZ1, SGZ5, SGZ8, SGZ10, SGZ11, SGZ12, SGH1, SGH2, SGH3, SGH4, SGH5	+	+	+
E. coli EDCM 367, *R. gallicum* R602 ^{T}, *S. meliloti* 1021 *Rhisobium* sp. YAS34, *P. brassicacearum* NFM421	-	-	-

+:Souche capable de dégrader le xyloglucane.
-: Souche incapable de dégrader le xyloglucane.

Ces résultats semblent suggérer que cette propriété est partagée par tous les *P. polymyxa* et qu'elle n'est pas reliée au sol d'origine de nos souches, ni à l'ancienneté de culture du blé de ces sols.

III.2. Production de la xyloglucanase au cours de la croissance de la souche SGK2

III.2.1. Courbe de croissance

Chez les micro-organismes, la croissance représente l'augmentation du nombre des cellules ou plus exactement de la concentration cellulaire.

La courbe de croissance de *P. polymyxa* SGK2 cultivée en milieu liquide LB représentée par la densité optique en fonction du temps peut-être classiquement découpée en cinq phases (Fig. 2).

A- Phase d'accélération : elle correspond au démarrage de la croissance. La vitesse de croissance augmente d'abord lentement puis plus rapidement.

B- Phase logarithmique ou exponentielle de la croissance. Les bactéries se multiplient sans entrave, le taux de croissance est maximal et constant, le temps de génération est minimal. Le taux de croissance est sous la dépendance des conditions environnementales comme la température, le pH, la nature et la concentration des aliments.

C- Phase de ralentissement : elle correspond au point d'inflexion sur la courbe de croissance qui indique une diminution de la croissance. Elle est due à l'épuisement du milieu de culture du fait de la disparition de un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance, de l'accumulation de métabolites inhibiteurs et de l'évolution défavorable de l'environnement physique (pH).

D- Phase stationnaire : le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Le nombre des cellules viables reste constant. Il peut correspondre à un équilibre entre le nombre de cellules provenant de la division et le nombre de cellules qui disparaissent par lyse. Il peut aussi traduire la persistance des *P. polymyxa* vivants en l'absence de tout développement (formation des spores). Cette phase est caractérisée par une diminution ou une annulation du taux de croissance. On peut l'attribuer à un certain nombre de causes au premier rang desquelles s'inscrirait l'épuisement de l'aliment ou l'accumulation de déchets toxiques ou l'évolution défavorable de l'environnement physique (pH).

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

E- Phase de décroissance ou de déclin : la mortalité des bactéries domine et devient de plus en plus importante. Cette mortalité cellulaire s'accompagne de deux phénomènes :

• Lyse des bactéries : il s'agit de la destruction des corps bactériens morts par des éléments que les cellules libèrent elles-mêmes au moment de leur mort.

• Le phénomène d'involution : les cellules se déforment pour aboutir à des éléments non-viables de morphologie anormale.

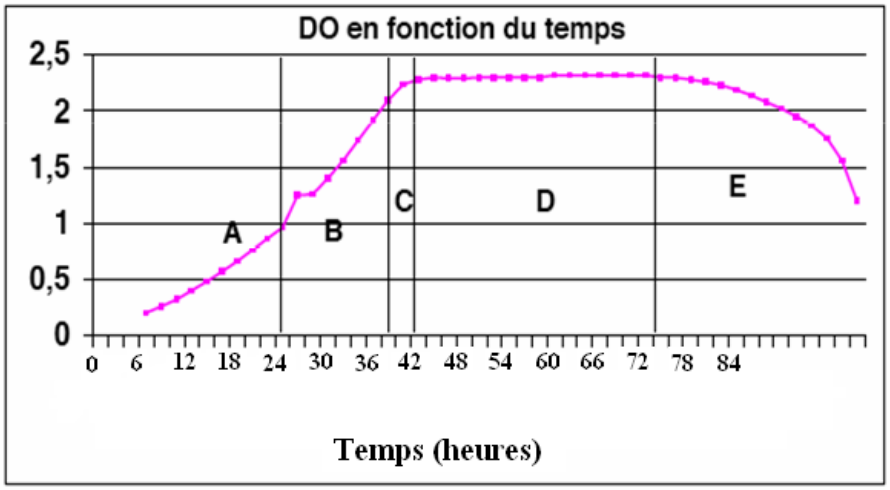


Figure 2 : *Courbe de croissance de la souche SGK2.* ***A*** *: phase d'accélération ;* ***B*** *: phase logarithmique ;* ***C*** *: phase de ralentissement ;* ***D*** *: phase stationnaire ;* ***E*** *: phase de déclin.*

III.2.2. Phase de production de xyloglucanase et induction de l'activité

L'activité xyloglucanase de la souche SGK2 a été testée pendant les différentes phases de croissance décrites.

Après 48 h d'incubation de la microplaque une dégradation est observée pour tous les traitements (tab. 4), comme dans l'expérience précédente.

Tableau 4 : *Temps d'incubation nécessaire à la souche SGK2 à 30° C pour montrer une activité xyloglucanase.*

Age (heures)	Phase de croissance	Culture dense	Dilution 10^{-3}	Dilution 10^{-5}
18 20	Accélération	48 h	48 h	48 h
24 26	Exponentielle	48 h	48 h	48 h
27 28 29 30 31	Ralentissement	48 h	48 h	48 h
50 52	Stationnaire	48 h	48 h	48 h

Il semble donc, que quelque soit le stade de croissance, des cellules inoculées aux puits contenant le xyloglucane il faut un certain temps d'adaptation à SGK2 pour produire l'activité xyloglucanase qui semble avoir donc une activité inductible.

L'absence de couleur bleue dans les cupules inoculées avec le surnageant filtré d'une culture bactérienne de 31 h dans le milieu Luria Bertani (LB), confirme que la xyloglucanase

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

de *P. polymyxa* est une enzyme inductible, sa synthèse ne peut se faire qu'en présence de xyloglucane. Cette synthèse semble dépendre surtout du temps de contact avec le substrat et non pas du stade de croissance de la bactérie. Elle fait donc partie du pool d'enzymes adaptatives ou inductibles qui ne sont normalement présentes qu'à l'état de traces dans les bactéries, et dont la synthèse est amplifiée considérablement en présence de leur substrat. D'après Leclerc et *al.* [25], les enzymes inductibles ne sont synthétisées qu'en cas de besoin, ce qui est une source d'économie pour la cellule.

III.3. Intérêt des bactéries capables de dégrader le xyloglucane

Dans ce travail, nous nous sommes interrogés sur le rôle que pourrait jouer une bactérie capable de dégrader le xyloglucane, car beaucoup de questions sont en suspens. Nous tentons ici de présenter quelques propriétés que pourrait avoir une bactérie xyloglucanase positive.

III.3.1. Elicitation de la défense de la plante

L'initiation d'une réaction de défense par une plante nécessite la perception de molécules « signal » qui appartiennent à l'organisme envahisseur ou qui sont produites par les parois de la plante que l'organisme envahisseur a franchi. Ces signaux moléculaires sont globalement appelés « éliciteurs ». Le terme éliciteur a été employé pour la première fois en 1972 par Keen et *al*. [26] et, aujourd'hui, décrit une molécule produite par un agent phytopathogène ou par l'agresseur, qui induit chez la plante le déclenchement de mécanismes de défense avec production de molécules spécifiques. Ces éliciteurs sont de nature chimique variée et ils ont la capacité d'activer les réponses de défenses de nombreuses plantes [27] à des concentrations allant du nano au micromolaire. Donc lorsqu'un stress, comme les molécules issues de la dégradation par *P. polymyxa* de la paroi de certains mycètes phytopathogènes contenant le xyloglucane, a été détecté par des senseurs, la plante peut développer, de façon coordonnée, des réactions de défense pour restreindre la diffusion et la croissance du pathogène qui se trouve dans le sol afin de le détruire.

De nombreux micro-organismes pathogènes savent contourner les systèmes de défense de la plante. La maladie se développe lorsque le micro-organisme potentiellement pathogène contourne les défenses passives de la plante, évite l'élicitation de la réponse de défense ou en inhibe l'induction par la sécrétion de toxines métaboliques ou de facteurs nécrotiques. Si on dispose de bactéries capables de dégrader le xyloglucane, on peut, par les techniques de biologie moléculaire, améliorer l'efficacité du système de défense de la plante par activation et maintien en latence du système de défense et ce avant l'attaque d'éventuels pathogènes. Une telle résistance est possible, en insérant le gène bactérien de la xyloglucanase. Ceci permet à la plante d'être dans un état défensif latent et de réagir plus rapidement aux futures attaques de pathogènes. En effet, Degraeve [28] en cultivant un colza transgénique exprimant constitutivement un gène de chitinase de haricot, et son témoin non-transformé, a pu constater que la plante transgénique exprime, dans ses racines, une activité chitinolytique significativement supérieure à celle observée dans les racines de la plante témoin. Cette nouvelle voie offre un mécanisme naturel de contrôle biologique des pathogènes des plantes.

III.3.2. Dégradation de débris végétaux, source de nutriments

L'architecture des cellules végétales est un assemblage complexe de polysaccharides de structure (la cellulose) et d'une matrice (les pectines et les hémicelluloses). Les souches de *P. polymyxa* produisent des enzymes cellulasiques [29]. Parmi ces enzymes, la xyloglucanase qui est certainement importante pour les micro-organismes telluriques quand on sait que le xyloglucane peut représenter 20 % du poids sec de la paroi primaire des végétaux.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

La dégradation des débris végétaux par la xyloglucanase de *P. polymyxa* pourrait conduire à la libération de composés de faibles poids moléculaires. Ces derniers pourraient servir de nutriments à la microflore tellurique.

III.3.3. Effet sur la croissance racinaire

Les xyloglucanes sont connus pour leur rôle important dans la structuration de la paroi. Mc Cann et *al*. [30] ont montré que les xyloglucanes lient les bobines de cellulose entre elles. La dégradation du xyloglucane, polysaccharide hémicellulosique structural de la paroi primaire des cellules végétales vivantes, est importante dans le cycle de croissance végétale. En effet, cette dégradation permet l'élongation de la cellulose mise en jeu lors de la croissance racinaire d'où l'importance pour la plante d'avoir des bactéries possédant une activité xyloglucanasique dans la rhizosphère.

III.3.4. Lien avec la colonisation bactérienne des racines

Bekri [31] a montré que grâce à des enzymes produites par la bactérie (dont la pectinase) qui peuvent digérer certains composants de la paroi des cellules végétales, la bactérie peut coloniser les racines rendant l'interaction métaboliquement productive *in situ*. En utilisant une protéine fluorescente verte (GFP) liée à *P. polymyxa*, Timmusk [15] a montré que les racines d'*Arabidopsis thaliana* peuvent être colonisées par cette même espèce bactérienne. Il a constaté que cette dernière pénètre dans les tissus des racines et est abondamment présente dans l'espace intercellulaire.

Les résultats trouvés par ces deux chercheurs nous laissent penser que l'aptitude à dégrader le xyloglucane par les 29 souches de *P. polymyxa* testées pourrait avoir un intérêt *in situ*, car grâce à la xyloglucanase, la paroi des cellules végétales peut être digérée et *P. polymyxa* peut coloniser les racines rendant ainsi l'interaction métaboliquement productive *in situ*. La capacité de ces souches à fixer l'azote [23] ainsi que la production de certaines hormones végétales [15], qui amplifient le développement des racines et améliore ainsi la prise d'eau et d'éléments minéraux, rendent l'interaction potentiellement bénéfique entre les bactéries et la plante.

III.3.5. Autres applications

En plus des propriétés agronomiques que pourrait avoir une bactérie productrice de xyloglucanase, cette enzyme bactérienne pourrait être utilisée en industrie de fabrication des textiles [32]. Donc, l'ensemble de ces points démontre l'importance d'avoir des souches possédant le gène codant pour une xyloglucanase.

IV. Conclusion et perspectives

Le sol renferme un nombre très élevé de bactéries qui appartiennent à une multitude d'espèces. Parmi elles, les bactéries du genre *Bacillus sensu lato* ont longtemps été considérées comme des organismes particulièrement adaptés à un mode de vie saprophytique car elles sont connues pour leur cortège d'exo-enzymes et leur capacité à sporuler et donc à résister aux stress de la rizosphère.

Des travaux publiés au cours des dernières décennies ont montré qu'un certain nombre d'espèces, et en particulier celles du genre *Paenibacillus*, sont performantes dans leur interaction avec les plantes. L'une d'elle, *P. polymyxa*, a été maintes fois isolée de la rhizosphère du blé ainsi que d'autres plantes, ce qui montre qu'elle est compétitive pour cet environnement. Cette espèce bactérienne présente en effet un potentiel important d'activités qui peuvent participer à l'établissement d'une interaction bénéfique avec le blé au niveau de la rhizosphère et certaines souches sont déjà utilisées en inoculation pour améliorer la croissance et la santé des plantes.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

Nous nous sommes proposés de déterminer la présence d'une activité xyloglucanasique chez vingt neuf souches de *P.polymyxa* isolées de différents sols algériens.Le test de dégradation du xyloglucane a été réalisé sur un milieu de culture contenant comme seule source de carbone et d'énergie ce polymère.

La dégradation de ce substrat par les vingt neuf souches de *P. polymyxa* testées n'a pas permis de déduire un effet quelconque de l'âge ou de l'origine des souches sur la sélection de *P. polymyxa* ayant une activité xyloglucanase positive. Cette activité xyloglucanasique est inductible.

Les fortes activités de dégradation du xyloglucane par les souches de *P. polymyxa* isolées des sols algériens peuvent être reliées à leur activité d'antibiose vis-à-vis des mycètes pathogènes et à leur vie saprophytique dans le sol.

Les perspectives à envisager seraient l'exploitation des souches de *P. polymyxa* testées, comme agents de lutte biologique pour une agriculture durable. Deux approches sont envisagées :

- l'une consiste à améliorer les plantes pour leur conférer intrinsèquement les moyens de résister, en leur introduisant par transformation génétique, un gène bactérien de xyloglucanase,
- l'autre voie possible est d'utiliser les souches naturellement antagonistes d'agents pathogènes, soit par aspersion dans le sol ou apportées par enrobage ou encapsulation des semences.

V. Références bibliographiques:

[1] Jack, G.; Logemann, S.; Wolf, G.; Oppenheim, A.; Chet, I.; Schell, J.; Logemann, J.; Expression of bacterial chitinase leads to improved resistance of transgenic tobacco plants against fungal infection. *Bioprac.* 1 (1992)1-9.

[2] Vierheilig, H.; Alt, M.; Neuhaus, J.M.; Boller, J.; Wiemken, A. Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase, by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 6 (1993) 261-264.

[3] Neuhaus, J.M.; Ahl-Goy, P.; Hinz, U.; Flores, S.; Meins, F. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection*. Plant Mol.Biol.* 16 (1991) 141-151.

[4] Mavingui, P.; Laguerre, G.; Berge, O.; Heulin, T. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992)1894-1903.

[5] Smid, E.J.; Beek, J.A.M.; Gorris L.G.M. Biological control of *Paenibacillus hirsutum* by antagonistic soil bacteria. *In* Fokkema N.J., Koihl J., Elad Y. (eds) Biological control of foliar and Post- harvest diseases vol.16 (1993) IOBC/WPRS Bulletin, Wageningen, The Netherlands, pp190-193.

[6] Nielsen, P.; Sorensen, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22 (1997)183-192.

[7] Dijksterhuis, J.; Sanders, M.; Gorris, K.G.M.; Smid E.J. Antibiosis play a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999)13-21.

[8] Beatty, P.H.; Jensen, S.E. *Paenibacillus polymyxa* produces Fusaricidin-type antifungal antibiotic active against *Leptosphearia maculans*, the causative agent of blackleg disease of Canola*. Can. J. Microbiol.* 48:2 (2002)159-169.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

[9] He, J.; Boland, G.J.; Zhou, T. Concurrent selection for microbial suppression of *Fusarium graminearum*, Fusarium head blight and deoxynivalenol in wheat. *J. Appl. Microbiol.* 106 (2009)1805–1817.

[10] Kharbanda, P., Développement et evolution du *Paenibacillus polymyxa* PKB1 comme biofongicide pour les concombres et les poivrons de serre.Agriculture et Agroalimentaire.Canada, BPI (2011) 6-90.

[11] Walker, R.; Powell, A.A.; Seddon, B. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J.Appl. Microbiol.* 84 (1998) 791-801.

[12] Barkley, S.; Yang, J.; Kharbanda, P.D. La diversification de récolte. Projets de recherche / service de transfert de technologie (2001).

[13] Yang, J.; Kharbanda, P.D.; Mirza, M. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* PKB1 for biocontrol of Pythium disease of cucumber in hydroponic system. *Acta Horticulturae* (2002)635 59-66.

[14] Timmusk, S.; Wagner E.G.H. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:2 (1999) 951-959.

[15] Timmusk S., Mechanism of Action of the Plant Growth Promoting Bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Science and Technology, Uppsala, *Acta Universitatis Upsaliensis* 908 (2003) 40pp.

[16] Lee, S.H.,Cho J.E., Park, S.H., Balaraju, K., Park, J.W., Lee S.W.and Park, K. Un fusaricidine antibiotiques: un depsipeptide cyclique de *Paenibacillus polymyxa* E681 induit une résistance systémique contre Mildiou de poivron rouge .J.Microbiol.41(2013) 49-58.

[17] Haggag, M.W. Colonization of exopolysaccharide producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease. *Afr. J. Biotech.* 6:13 (2007) 1568-1577.

[18] Helbig, J. Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. Ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate18191). *J. Phytopathol.* 149 (2001) 265-273.

[19] Choi, S.K.; Park, S.Y.; Kim, R., Kim, S-B., Lee, C-H.; Kim, J.F.; Park S.H. Identification of a polymyxine synthetase gene cluster of *Paenibacillus polymyxa* and heterologous expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191 (2009) 3350-3358.

[20] Naghmouchi, K., Hammani, R., Fliss I., Teather, R., Baah, J.and Drider, D. Colistin B among inhibitory substances of *Paenibacillus polymyxa* JB 05-01-1.Arc Microbiol.,194(5) (2012)363-70.

[21] Niu, B., Vater J., Ruechert C., Blom J., Lehmann M., Ru J.J., Chen X.H., Wang Q., and Borriss R. Polymyxin P is the active principal in suppressing phytopathogenic Erwinia spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M.1. BMC Microbiol (2013) 13-137.

[22] Guemouri, S. Isolement et caractérisation des souches de *Bacillus polymyxa* isolées de différents sols algériens, Thèse. Magister. U.S.T.H.B., Alger (1992) 111.

[23] Athmani-Guemouri S. Adaptation des populations de *Paenibacillus polymyxa* aux racines de blé dur cultivé sur des sols algériens. Thèse Doctorat, USTHB, Alger (2006) 189.

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

[24] Guemouri-Athmani, S.; Berge, O.; Bourrain, M.; Mavingui, P.; Thiéry, J.M.; Bhatnagar, T.; Heulin, T. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations in the rhizosphere of wheat (*Triticum durum*) in Algerian Soils. *Eur. J. Soil Biol.* 36 (2000)149-159.

[25] Leclerc, H.; Izard, D.; Husson, MO.; Wattre, P.; Jakubczak, E. Microbiologie générale 2ème édition – deuxième tirage (1983).

[26] Keen, N.T.; Patridge, J.E.; Zaki, A. Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soy bean monogenetically resistant to *Phytophtora* megasperma var.sojae. *Phytopathol.* 62 (1972) 768.

[27] Radman, R.; Saez, T.; Bucke, C.; Keshavarz T. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37 (2003) 91-102.

[28] Degraeve, S. Les peuplements et populations de bactéries associées aux racines de colza transformé par l'introduction d'un gène de chitinase.Thèse Doctorat,Nancy (1994) 176.

[29] Forgarty, W.M.; Griffin, P.J. Physiochemical properties of native zinc and manganese prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa. Appl. Environ .Microbiol.* 25 (1973) 229-238.

[30] Mc Cann, M.C.; Wells, B.; Roberts, K. Direct visualization of cross- links in the primary plant cell wall. *J. Cell. Sci.* 96 (1990) 323-334.

[31] Bekri A. Genetic Analysis of Pectinolytic and cellulolytic activities of *Azospirillum Irakense* KBC1. Ph.D. thesis. Leuven, Belgium: K.U. Leuven (1998).

[32] Yuan, S.; Wu, Y.; Cosgrove, J.D. A fungal Endoglucanase with plant cell wall extension activity. *Plant physiol.* 127 (2001) 324-333.

Please cite this Article as:

Athmani-Guemouri S., Lounaci L., Djebbar R., Athmani R., Dégradation du Xyloglucane par les souches de *Paenibacillus polymyxa* isolées de la rhizosphère du blé dur sur des sols Algériens, ***Algerian J. Nat. Products*, 2:2 (2014) 43-55**

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Online ISSN: 2353-0391

Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL

Copyright © 2013, Algerian Journal of Natural Products, All rights reserved

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391
Algerian Journal of Natural Products
www.ajnp.webs.com

Type of the Paper (Original paper)

Evaluation de l'effet anti-oxydant des extraits de l'espèce Saharo-Endemique (*Myrtus nivellei* Batt & Trab.) obtenus *in situ* et *in vitro*

Meriem TOUAIBIA [1,*], Fatma Zohra CHAOUCH[2] , Noria SMAIL[3] , Fairouz SAIDI[1]

[1] *Département de Biologie, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie.*
[2] *Département d'Agronomie, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie.*
[3]*Laboratoire des produits Naturels, Université Mouloud Maameri de Tizi Ouzou, Algérie.*

** Meriem TOUAIBIA, e-mail:biomeriem@hotmail.com*

Received: 27/05/2014 /Accepted:25/07/2014

Résumé: *Myrtus nivellei* Batt & Trab. est une plante saharo-endémique, très réputée au sud algérien pour ses vertus thérapeutiques en médecine populaire. Cependant, ses usages restent, toutefois, exclusivement limités au savoir-faire ancestral. Ce travail apporte une première contribution à l'investigation du pouvoir anti-oxydant des extraits méthanoliques de cette espèce récoltée *in situ* ainsi que des cals multipliés *in vitro*.
Les analyses spectrophotométriques effectuées ont montré que l'extrait méthanolique de la plante récoltée *in situ* s'est avéré plus riche en polyphenols par rapport à l'extrait des cals. Il a éventuellement exprimé un bon pouvoir de capture des radicaux libres avec une EC_{50}=0,98 mg/ml, et un très bon pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique estimé à 74,01%, qui s'est avéré largement supérieur à celui exprimé par l'acide ascorbique (50,57%) utilisé comme contrôle positif. Néanmoins, les extraits méthanoliques préparés à partir des cals ont exprimé le meilleur pouvoir chélateur des ions Fe^{2+} estimé à 66,71%.

Mots clés: *Myrtus nivellei Batt & Trab., anti-oxydant, in situ, in vitro, extraits méthanoliques.*

I. Introduction

L'utilisation des antioxydants de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels. Désormais, de nouvelles sources végétales d'anti-oxydants naturels sont recherchées [1]. En effet, les composés phénoliques sont des molécules naturelles très répondues dans le règne végétal. Ces derniers regagnent une importance croissante grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé [2]. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite un très grand intérêt, notamment pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [3]; ils sont également utilisés en tant qu'additifs en industrie agroalimentaire, en pharmacie et en cosmétologie. *Myrtus nivellei* Batt & Trab. une espèce saharo-endémique, restreinte aux montagnes du Tassili n'Ajjer, Tassili n'Immidir, Tefedest et des massifs de l'Ahaggar algérien [4]. Elle apparait au delà de 1400 à 2000 mètres d'altitude [5]. Cette plante est listée parmi les espèces en voie de disparition (décret exécutif N°93-285 du 23/11/1993 fixant la liste des espèces végétales protégées en Algérie).

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Cette plante est très réputée au sud algérien pour ses vertus thérapeutiques en médecine populaire [6,7]. Pour traiter le mal de gorge et la fièvre, ses feuilles sont préparées en décoction avec des figues et des raisins secs, elles sont utilisées pour traiter les problèmes gastro-intestinaux, les mycoses et le diabète ainsi que les problèmes hépatiques [8]. Les baies très sucrées sont consommées soit fraiches ou séchées pour traiter les aphtes de la sphère bucco-dentaire [7]. Les feuilles sont utilisées également comme produit de beauté en macération dans du beurre fondu, servant à coiffer les cheveux et à parfumer le corps [9].La population locale l'utilise aussi comme ressource pastorale pour la faune domestique, comme aromate ou condiment culinaire, et parfois même comme matériaux de l'artisanat et à la construction d'habitats ou à la production énergétique au même titre que l'acacias, l'olivier, le ficus et bien d'autres espèces encore, ainsi que pour teinter les peaux d'animaux destinées à la fabrication de sacs et des ceintures.

Dans ce papier, nous ferons le point, pour la première fois, sur la composition en polyphénols des extraits de *M nivellei Batt* & Trab. obtenus *in situ* et *in vitro*, ainsi que leurs éventuels effets anti-oxydants. Cette étude s'intègre également dans le contexte plus global de la mise en valeur de la biodiversité des plantes aromatiques algériennes, ainsi que dans le cadre de la préservation des espèces endémiques du Sahara central.

II. **Matériel et méthodes**

II.1. Matériel végétal *in situ*

Les rameaux feuillés de *M nivellei* Batt & Trab. ont été récoltés sur des pieds adultes, à 146 km du chef lieu de la wilaya de Djanet, cette station est située à 94,8 km au sud de *Ihrir*, faisant partie du parc national du Tassili (tableau1). Le séchage est effectué dans une étuve réglée à 75°C durant 72h. La masse végétale séchée est ensuite réduite en poudre fine et bien conservée jusqu'à son utilisation.

***Tableau 1**: Coordonnés géographiques du site de récolte M nivellei Batt & Trab.*

Région	Localisation	Altitude	Latitude	Longitude	Période de récolte	Etage bioclimatique
Tassili n'Ajjer	Wilaya de Djanet	2018 m	24°59' Nord	8°07' Ouest	09/2013	Aride à hiver frais (Sahara central)

II.2. Mise en place et suivi des cultures *in vitro*

Des cals ont été initiés à partir de limbes foliaires issus de vitro-semis, sur un milieu MS [10], contenant une combinaison hormonale équilibrée (Kinetine/ANA ou Kinetine/2,4-D: 0,5/0,5 mg/l) et additionné de saccharose (30g/l), de gélose (8g/l) et des vitamines de Morel. Des cals primaires se sont développés après 6 semaines, les cultures ont été entretenues par repiquages successifs chaque 21 jours. Les cals sont récupérés après 12 semaines, séchés ensuite broyés en poudre fine et bien conservés pour la suite des travaux.

II.3. Extraction

Elle est réalisée par épuisements de la poudre végétale à chaud par Soxhlet dans le méthanol, l'extrait brut obtenu est soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif [11]. Le résidu sec récupéré est pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon sombre bien fermé, jusqu'à leur usage.

II.4. Dosage

Les extraits obtenus ont été soumis à une série de dosages spectrophotométriques afin de quantifier leur teneur en polyphénols totaux selon la methode Folin-Ciocalteu [12].

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Un millilitre de la solution à analyser, contenant 1mg de l'extrait methanolique sec, est ajouté à 46 ml d'eau distillée et 1 ml de FCR, l'ensemble est bien homogénéisé. Après trois minutes, 3 ml d'une solution de carbonate de sodium (2%) sont ajoutés au mélange, qui est maintenu en agitation permanente durant 2 heures à température ambiante, l'absorbance est lue à 760 nm. L'indice de Folin-Ciocalteu est exprimé en microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg eq Ac gallique/mg ES), on utilise une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique. La concentration des composés phénoliques est calculée selon l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

II.5. Evaluation du pouvoir anti-oxydant des extraits

Le pouvoir antioxydant des extraits a été évalué par le test DPPH [13]. Le pouvoir inhibiteur de la peroxydation de l'acide linoléique est déterminé par la méthode thiocyanate [14]. Cependant, le pouvoir chélateur des ions Fe^{2+} est mesuré selon le protocole rapporté par Decker et Welch [15].

III. Résultats et Discussion

III.1.Caractérisation physico-chimiques des extraits obtenus

Les extraits méthanoliques (MeOH) issus de la plante obtenue *in situ*, présentent une couleur marron très foncé avec un rendement de 59,15%, alors que les extraits des cals ont plutôt une couleur vert foncé associée à un rendement de l'ordre de 40,45% (tableau 2).

***Tableau 2**: Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.*

	Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait (%)	Aspect de l'extrait	Couleur de l'extrait
In vitro	Extrait MeOH	40,45	Collant pâteux	Vert foncé
In situ	Extrait MeOH	**59,15**	Collant pâteux	Marron foncé

Touaibia et Chaouch [16] ont rapporté que le rendement des extraits de cette plante varie en fonction du protocole d'extraction choisi, de la nature du solvant utilisé, ainsi que de la période de récolte de cette plante, les extraits de cette plante récoltés au moi de Mai, ont présenté un rendement de 11,12% pour le macérât éthanoliques et 12,45% pour l'extrait méthanolique. Il parait ainsi clairement que ce dernier atteint son maximum lorsque la plante est récoltée en pleine floraison.

III.2. Résultats des analyses spectrophotométriques

Les extraits ont été soumis à un dosage spectrophotométrique, afin de déterminer la teneur des polyphénols (tableau 3) dans l'extrait méthanolique de la plante obtenue *in situ,* qui se sont montré nettement plus élevés que leurs homologues obtenus à partir des cals.

***Tableau 3**: Dosage des composés phénoliques dans les extraits méthanoliques.*

Paramètre	Etalon sélectionné	Longueur d'onde (nm)	Teneur (µg eq/mg ES)*	
			In situ	*In vitro*
Polyphenols totaux	Acide gallique	760	**348**	73

*microgramme équivalent/milligramme d'extrait sec

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Pour pallier au faible taux des polyphénols dans l'extrait obtenu in vitro, il conviendrait probablement de jouer sur certaines conditions de culture (l'intensité et/ou la durée d'éclairage) afin d'optimiser la synthèse de ces métabolites. Dans ce même contexte, une série de travaux portant sur l'optimisation des conditions de culture de *Fagopyrum esculentum* ont permis d'obtenir des quantités intéressantes en polyphenols, mais qui suggèrent l'exposition des cals à un éclairage permanant 24h/24h [17].

Bahorun et *al.* [18] ont rapporté que l'introduction de l'acide shikimique au milieu de culture augmente le rendement en polyphenols, ces résultats rejoignent aussi les observations faites par Shah et Mehta [19], qui ont amélioré la production de *Crotalaria* en introduisant différents acides phénoliques dans le milieu de culture.

En comparant ces resultats avec ceux obtenus dans un travail antérieur [16], nous pouvons conclure que la variation saisonnière n'influe pas sur la teneur en polyphénols des extraits methanoliques obtenus *in situ* de cette plante. Cependant, cette dernière est fortement influencée par la nature chimique du solvant utilisé ainsi que la méthode d'extraction utilisée.

Selon Gardeli et *al*. [20], la teneur de l'extrait méthanolique en polyphenols chez *M communis* varie entre 352 et 373µg eq/mg ES, et atteint son maximum en période de pleine floraison. Cependant, Ammar et *al*. [21] rapportent que sa teneur égale 227µg eq/mg ES.

III.3. Résultats du test DPPH

Une réduction de l'absorbance du DPPH en solution est observée avec l'augmentation de la dose des extraits (figure 1 et figure 2).

Les extraits ont manifesté un pouvoir anti-oxydant en piégeant les molécules du radical libre DPPH, mais cette capacité est d'une puissance accrue avec l'acide ascorbique, alors que l'extrait des cals a présenté une capacité faible en comparaison avec les contrôles positifs.

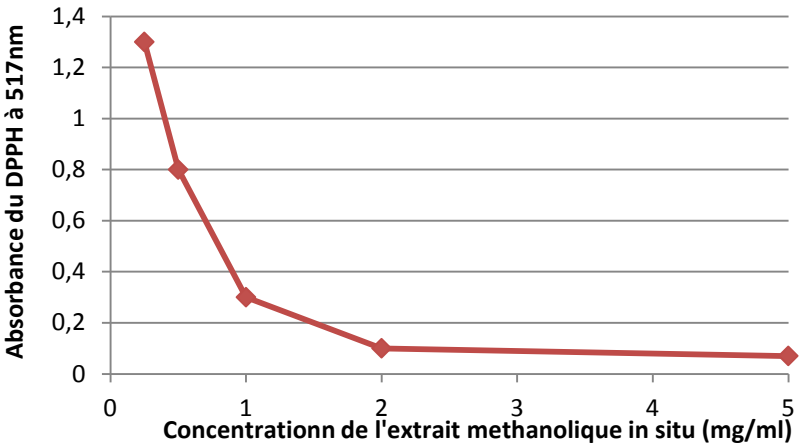


***Figure 1**: Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait de M nivellei Batt & Trab. (in situ)*

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

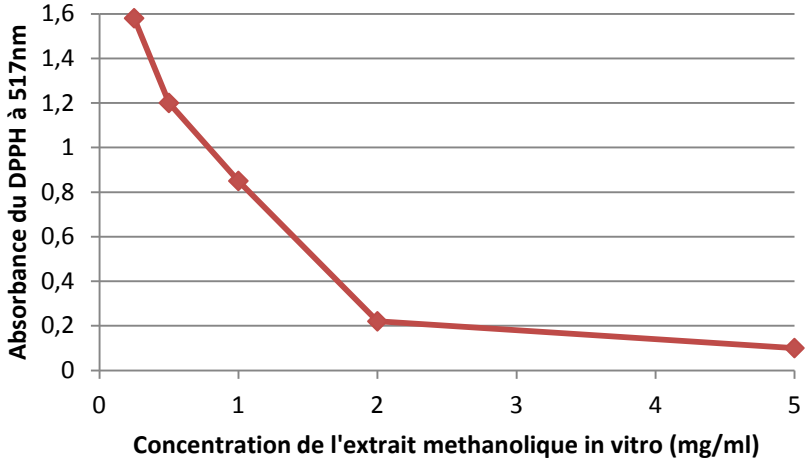


***Figure 2**: Réduction de l'absorbance du DPPH en fonction de la dose de l'extrait de M nivellei Batt & Trab. (in vitro)*

Les valeurs EC50 déterminées en mg/ml expriment la concentration efficace de l'extrait anti-oxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de molécules de DPPH mises en solution dans le méthanol (Tableau 4). Un autre paramètre exprimant la puissance anti-radicalaire à été calculé nommé "ARP" qui est égale à 1/EC_{50}.

Selon les résultats enregistrés, l'extrait de la plante obtenue *in situ* est doté d'un bon pouvoir anti-oxydant (EC50=0,98mg/ml), meilleur que celui exprimé par l'α-tocophérol (EC_{50}=0,99mg/ml), mais il reste d'une efficacité moindre par rapport à celle exprimée par l'acide ascorbique et la quercétine respectivement. L'extrait des cals a présenté un pouvoir anti-oxydant très faible avec une EC50=1,44mg/ml.

Pour l'acide ascorbique (Cp), la réaction de réduction du DPPH en solution est rapide et instantanée. Le changement de couleur, exprimant le passage du radical DPPH de la forme oxydée ($DPPH^{\bullet}$) à la forme réduite stable (DPPH-H), se fait dans un temps extrêmement court où l'état d'équilibre est atteint immédiatement et la réduction est presque complète.

En comparant les résultats obtenus avec les extraits de la plante et les standards, on peut classer l'activité et la puissance anti-oxydante selon l'ordre suivant:

Acide ascorbique > quercetine > extrait de la plante (*in situ*) > α-tocophérol > extrait des cals (*in vitro*)

***Tableau 4:** Effet anti-oxydant des extraits de M nivellei Batt & Trab.*

Substance chimique testée	% d'inhibition	EC_{50}(mg/ml)	PAR
Extrait methanolique (*in situ*)	52,00	0,98	1,02
Extrait methanolique (*in vitro*)	33,49	1,44	0,69
Quercetine (Cp)	**85,56**	0,43	2,33
Alpha tocophérol (Cp)	51,27	0,99	1,01
Acide ascorbique (Cp)	**86,62**	0,39	2,56

L'activité anti-oxydante des extraits dépend essentiellement du taux des polyphenols accumulés durant le cycle végétatif de la plante [22]. La EC_{50} de l'espèce *M communis* L., rapportée par les travaux de Gardeli et *al*. [20] est incluse entre 0,17 et 0,95mg/ml, ils ont aussi démontré que les extraits de *M communis* L. récoltés en période estivale étaient les plus anti-oxydants.

Il a été démontré que les molécules anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique, l'α-tocophérol ainsi que les composés phénoliques réduisent et décolorent le radical DPPH à cause de leur capacité à céder l'hydrogène [23,24,25,26]. La richesse de l'extrait méthanolique *in situ* en composés

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

phénoliques témoigne de son remarquable effet anti-oxydant enregistré par rapport à son homologue *in vitro*. Les valeurs de l'EC_{50} des extraits methanoliques de l'espèce méditerranéenne *Myrtus communis* L., rapportée dans un travail antérieur [27] ont montré également que l'extrait *in situ* avait un excellent effet anti-oxydant (EC_{50}=0,69mg/ml) par rapport à l'extrait *in vitro*. Cela revient au fait que les composés phénoliques sont plus abondants dans les plantes adultes.

III.3. Résultats de l'activité anti-peroxydasique de l'acide linoléique

Pour évaluer l'action des extraits sur l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, le test a été prolongé sur une période d'une semaine (168h). L'extrait obtenu *in situ* et celui préparé à partir des cals ont respectivement montré, des pourcentages d'inhibition de la lipo-peroxydation qui se sont avéré largement supérieurs au contrôle positif (tableau 5).

Tableau 5 *: Pourcentages d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique.*

Extraits de *M nivellei* Batt & Trab.	Pourcentage d'inhibition (%)
In situ	**74,01**
In vitro	**82,88**
Acide ascorbique (Cp)	50,57

Quant à l'aspect biochimique des cals, Thorpe et Gasper [29] ont montré une augmentation de l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals issus de différents explants, et ont constaté que la perte de l'activité caulogène d'un cal correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique. Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait indiquer une réduction du niveau auxinique endogène. Cet accroissement de l'activité peroxydasique préalable à l'initiation des bourgeons végétatifs pourrait indiquer une réduction du niveau auxinique endogène.

III.4. Résultats du pouvoir chélateur du fer

Le pourcentage de chélation des ions Fe^{2+} exercé par l'acide ascorbique est égal à 43,22%, il parait être dix fois plus important, que celui de la quercétine n'ayant exprimé que 4,98% (figure 3). Quant aux extraits testés, nous pouvons déduire que l'extrait des cals présente un pouvoir chélateur de 66,71%, ce dernier est largement supérieur à son homologue *in situ* (3,31%) ainsi qu'a celui des contrôles positifs (Quercétine :4,98%, Acide ascorbique:43,22%).

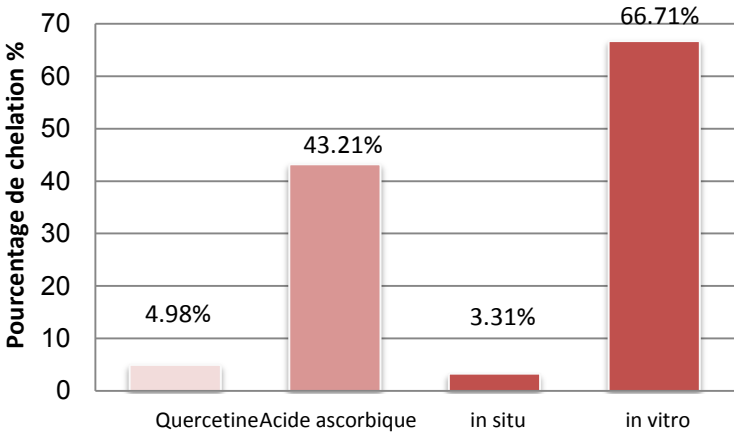


Figure 3*: Pouvoir chélateur des ions Fe^{2+} exercé par les extraits de M nivellei Batt & Trab. obtenus in situ et in vitro*

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

D'aprés Gardeli et *al*. [20], l'extrait méthanolique de *M communis* L. exerce un important effet chélateur en pourcentage de réduction des ions Fe^{2+} estimé entre 63,4±0,4 et 70,2±2,3 mmol Fe^{2+}/l, il a aussi confirmé qu'il varie significativement selon les saisons.

IV. CONCLUSION

Les extraits méthanoliques de *Myrtus nivellei* Batt & Trab. obtenus *in situ* et *in vitro* sont potentiellement riches en composés polyphénoliques et peuvent être considérés comme une source naturelle très importante de constituants phytopharmaceutiques utilisés pour éradiquer les radicaux libres responsables de nombreuses pathologies.

Cependant, ces extraits sont constitués d'un mélange de plusieurs composés de nature chimique différente. Il est ainsi très probable qu'ils contiennent des molécules susceptibles d'avoir des propriétés anti-oxydantes similaires à celle de la l'acide ascorbique, ce qui ouvre de larges perspectives pour établir des études plus approfondies afin de les isoler et les identifier.

V. Références

[1] Tadhani, M.B., Patel, V.H., et Subhash, R. In vitro antioxidant activities of Stevia rebaudiana leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis. 20 (2007) 323-329.

[2] Koechlin-Ramonato, C. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition Clinique et Métabolique. 20 (2006) 165-177.

[3] Vârban, D.I., Duda, M., Vârban, R., et Muntean, S. Research Concerning the Organic Technology for Satureja Hortensis L. Culture. Bulletin UASVM Agriculture. 66 (2009) 225-229.

[4] Ozenda, P. Flore du Sahara. Edition CNRS. Paris. 1977. 623p.

[5] Maka, M. Fleurs du Sahara, arbres et arbustes au cœur de leurs usages avec les touareg du Tassili. Phytotherapia. 2 (2004) 191-197.

[6] Bouzabata, A., Bazzali, O., Cabral, C., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Bighelli, A., Cavaleiro, C., Casanova, J., Salgueiro, L., Tomi, F. New compounds, chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil from *Myrtus nivellei* Batt &Trab., an endemic species of Central Sahara. Journal of Ethnopharmacology. 149 (2013) 613-620

[7] Hammiche, V., Maiza, K. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopeia of Tassili N'ajjer. Journal of Ethnopharmacology. 105 (2006) 358–367.

[8] Maiza, K. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara algérien. Thèse de doctorat. Université AbouBakr Belkaid (Ph.D.).Algerie. 2008. p. 386.

[9] Wichens, G.E.Ecophisyology of economic plants in arid and semi arid lands. Edition Springer.1998. 343p.

[10] Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology of plants. 15 (1962) 473-497.

[11] William, B. J. The original of the Soxhlet extractor. Journal of chemical education. 84 (2007) 1913-1915

[12] Slinkard, K. et Singleton, V.L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. American journal of viticulture. 28 (1977) 49-55.

[13] Cuendet. M., Hostettmann. K., Potterat. O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica. Chimica. act. 80 (1997) 1144-1152.

[14] Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. Antioxidant activity of *Vitis vinefera* extracts on peroxidation modes in vitro. Food chemistry. 73 (2001) 285-290.

[15] Decker, E.A., Welch, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and food chemistry. 38 (1990) 674-677.

[16] Touaibia, M. et Chaouch, F.Z. Evaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux, méthanolique et éthanolique de l'espèce saharo-endémique Myrtus nivellei Batt et Trab. (Myrtaceae).international journal of applied science. 6 (2014) 407-413

[17] Pousset, J.L. Plantes médicinales africaines: utilisation pratique. Paris. (1989). In: Keita, Y., Koné, O., Ly, A.K., Häkkinen, V. Étude chimique et de l'activité anti-bactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. Comptes rendus de chimie. 1 (2004) 1095-1100.

[18] Bahorun, T. Substances naturelles actives: La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. Edition Mauritius. 1997. 133p

[19] Shah, R.R. et Mehta, A.R. Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in Crotalaria callus cultures. Bangladesh journal of botany. 7 (1978) 51-57.

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

[20] Gardeli, C., Vassiliki, P., Athanasios, M., Kibouris, T. et Komaltis, M. Essential oil composition of *Pistasia lentiscus* L. et *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. Food chemistry. 107 (2008) 1120-1130.
[21] Ammar, H., Lopez, S. et Gonzalez, J.S. Assessment of the digestibility of some mediterranean shrubs by in vitro techniques. Animal feed science and technology. 119 (2005) 323-331
[22] Burda, S. et Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Food chemistry. 49 (2001) 2774-2779.
[23] De Pooter, L.H. et Schamp, N. Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. (1986) 139-150.
[24] Chu, Y., Sun, J., Wu, X. et Liu, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. J Agric Food Chem., 50 (2002) 6910-6916.
[25] Oboh, G. et Rocha, J.B.T. Antioxidants in foods: A new challenge for food processors: Leading edge antioxidants research. New York: Nova Science Publishers Inc. (2007) 35-64.
[26] Oboh, G., Raddatz, H. et Henle, T. Antioxidant properties of polar and non-polar extracts of some tropical green leafy vegetables. J. Sci. Food Agric. 88 (2008) 2486-2492.
[27] Touaibia, M. et Chaouch F.Z. Pouvoir antioxydant des extraits de *Myrtus communis* L. obtenus in situ et in vitro. Nature et technologie. 10 (2014) 3-8.
[28] Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. Journal of Food chemistry. 90 (2005) 727-733
[29] Thorpe, T.A. et Gasper, T.H. Changes in isoperoxidase during shoot formation in tobacco callus in vitro. Journal of Physiology. 14 (1978) 522-526.

Please cite this Article as:

Meriem TOUAIBIA , Fatma Zohra CHAOUCH, Noria SMAIL, Fairouz SAIDI, Evaluation de l'effet anti-oxydant des extraits de l'espèce Saharo-Endemique (*Myrtus nivellei* Batt & Trab.) obtenus *in situ* et *in vitro*, ***Algerian J. Nat. Products*, 2:2 (2014) 56-63**

www.ajnp.webs.com

www.univ-bejaia.dz/ajnp

Online ISSN: 2353-0391

Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Algerian Journal of Natural Products 2:2 (2014) 64-74

OPEN ACCESS

Online ISSN: 2353-0391

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com

Type of the Paper (Article)

Évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L.

Nabil GHEDADBA [1,*], Leila HAMBABA[1], M. C. ABERKANE [2], S. M. Oueld-Mokhtar [3], Nassima FERCHA [1], Houas BOUSSELSELA[1]

[1]Laboratoire de chimie des matériaux et des vivants: Activité et Réactivité. Département des sciences de la nature et de la vie, Faculté des Sciences, Université El-Hadj-Lakhdar. 05000. Batna, Algérie.
[2] Laboratoire de Phytochimie, Faculté des Sciences, Département des Sciences de la matière, Université El-Hadj-Lakhdar, Batna. Algérie.
[3]Unité de Biodiversité et Valorisation des Ressources Végétales (BVRV) – Faculté des Sciences et Techniques (FST)- Université des Sciences, de Technologie et de Médecine (USTM) Nouakchott, Mauritanie.

***** *E-mail: viamessi@gmail.com*

Received: 11-05-2014 /Accepted: 05-08-2014

Résumé: L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'activité hémostatique des métabolites secondaires des feuilles de *Marrubium vulgare*. L'analyse qualitative de l'extrait aqueux (EAQ) par la chromatographie sur couche mince a révélé la présence de la quercétine, la rutine et le kaempférol. La quantification des phénols totaux par la méthode de Folin Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode $AlCl_3$ a donné des valeurs élevées avec l'EAQ : 175 ± 0,80 mg EAG/100g de MS, 23,86 ± 0,36 mg EQ/100g de MS. De plus, le dosage des tanins condensés par la méthode de la vanilline a montré que l'EAQ contient la valeur la plus élevée : 16,55 ± 0,03 mg E-Catéchine/100g de MS. L'évaluation de l'activité hémostatique par la méthode de recalcification du plasma décalcifié nous a permis de découvrir l'effet anticoagulant de l'EAQ lyophilisé des feuilles de *M. vulgare*. Une corrélation linéaire positive entre les deux paramètres étudiés (la teneur en tanins condensés et l'activité hémostatique (r = 0,96)) ont permis de mettre en évidence un rôle probable de ces composés qui sont des vaso-constricteurs puissants dans l'activité hémostatique.

Mots clés : *Marrubium vulgare* L; extrait aqueux; dosage des composés phénoliques; activité hémostatique; tanins condensés.

I. Introduction

L'analyse de coagulation sanguine pour empêcher l'hémorragie ou éviter le souffrant de thrombose nous a motivé de rechercher de molécules bioactives naturelles capablent de coaguler le sang en testant l'activité hémostatique. *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae), riche essentiellement en composés phénoliques, est employée couramment dans la médecine traditionnelle pour guérir certaines maladies [1, 2, 3].

Marrubium vulgare possède des effets hypoglycémiants et hypolipidémiants [2, 4, 5]. Arellano *et al*. [4], ont démontré que cette plante diminue la glycémie (effet hypoglycémiant) et les taux de lipides sériques (effet hypolipimiant) chez les patients diabétiques de type 2 (syndrome polyuro-polydipsie). Une étude plus récente établie par Elberry *et al*. [2], a montré que l'administration de l'extrait méthanolique du marrube (500 mg/Kg par jour) chez les rats diabétiques induits par la stréptozotocine a eu comme effet une réduction considérable du glucose en entrainant la stimulation du pancréas [2], vasorelaxant et antihypertensif par effet antagoniste calcique, provoque une

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

relaxation artérielle identique à celle de l'amlodipine et supérieure à celle de l'adrénaline (marrubénol), entraine une correction du dysfonctionnement endothélial dû à l'hypertension [6], anticholinestérase contre l'acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase sous l'action de l'eugénol [7].

M. vulgare possède aussi un effet antioxydant [8], en effet la richesse de cette plante par des phénylpropanoïdes glycosides a pu expliquer son activité antioxydante, en empêchant l'oxydation de LDL et augmentant le transport renversé de cholestérol et peuvent empêcher ainsi le développement des maladies cardiovasculaires. Ces propriétés antioxydantes augmentent le potentiel anti-athérogénique de HDL en favorisant le flux de cholestérol dans les macrophages humains THP1 [1], antimicrobien selon les travaux de Castillo-Juáreza *et al*. [9], l'extrait méthanolique de la plante *M. vulgare* à une concentration de 31.2 µg/ml possède une activité anti-*Helicobacter pylori* ATCC 43504 significative. Cela est dû au flavonoïde (la quercétine) qui a un effet inhibiteur sur l'uréase de la bactérie [10]. Une autre étude réalisée par Molina-Salinas *et al*. [11] a révélé que l'extrait méthanolique, aqueux, l'extrait de l'acétone et de l'hexane de la plante ont eu l'effet inhibiteur efficace contre *Mycobacterium tuberculosis* (agent causatif de la tuberculose) à une concentration supérieur à 200 µg/ml [11], antispasmodique, anti-inflammatoire par inhibition de la cyclooxygénase Cox2, analgésique [12,13]. Ce potentiel d'activités biologiques est dû à la richesse de *M.vulgare* en principes actifs: les diterpènes comme la marrubiine et le marrubénol [14], les flavonoïdes comme ladanéine, l'apigénol, le quercétol [15], les huiles essentielles comme l'eugénol, β-caryophyllène [16], les acides phénoliques comme l'acide gallique [16] et les tanins [17]. Récemment, Ohtera *et al*. [18] ont pu identifier un nouveau composé a partir de l'extrait méthanolique de *M. vulgare* c'est l'acide 6-octadécynoique. L'objectif global de cette étude est de déterminer la teneur des extraits de *M. vulgare* en métabolites secondaires particulièrement en tanins condensés et d'évaluer *in vitro* l'activité hémostatique des extraits des feuilles de cette plante par la méthode de recalcification du plasma décalcifié.

II. Matériels et Méthodes

II. 1. Matériel vegetal

L'espèce sélectionnée a été collectée dans leur habitat naturel. Le *Marrubium vulgare* récolté dans la région de Touffana à 52 Km de la ville de Batna (Nord-est de l'Algérie) entre le mois d'Avril et Mai 2012. Après la récolte, le matériel végétal est séché à l'ombre (à température ambiante) dans un endroit sec et aéré, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, en minimisant les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents au caractère organique de cette matière première. Ensuite, le matériel végétal est séché dans une étuve à 30°C pour éliminer l'humidité totale, puis finnement broyé au laboratoire de Zootechnie (Institut des Sciences Vétérinaires et Sciences Agronomiques

II. 2. Préparation des extraits des feuilles de *Marrubium vulgare*

Selon le protocole de Diallo *et al*. [14], les différents types d'extraits ont été préparés à partir des feuilles pulvérisées (100g) en utilisant 1L des solvants à polarité croissante (éther de pétrole, dichlorométhane, butanol, méthanol). A la fin de l'extraction, les quatre extraits organiques ont été concentrés sous vide au Rotavapor (HEIDOLPH ROTAVAPOR) aux températures 35 C°, 40 C° et 50 C° respectivement. Après concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre. Pour l'extrait aqueux, une macération aqueuse de 100 g de la poudre à raison de 1 L d'eau distillée a également été effectuée. L'extrait aqueux obtenu est ensuite centrifugé à 1000 tours/min pendant 10 minutes pour se débarrasser des débris de plante. La phase aqueuse du macérat a été ensuite filtrée sur un papier filtre. Le filtrat obtenu est ensuite mis dans des tubes, congelé à -20°C puis lyophilisé. La congélation de l'extrait lyophilisé à -20°C est une condition nécessaire afin de garder intacte les molécules extraite de la partie aérienne de *M. vulgare*.

II. 3. Criblage phytochimique

II. 3. 1. Caractérisation des Flavonoïdes (*Test de Shibata ou Shinoda test*)

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

La présence des flavonoïdes dans les différents extraits à été mise en évidence par la réaction à la cyanidine. Une quantité de 0,5 g de chaque extrait a été dissous dans 1,5 ml du méthanol (50%) et chauffé sur le bain d'eau bouillante. Cinq ml d'HCl et quelques fragments de magnésium ont été ajouté. Après dégagement d'hydrogène par réduction des flavonoïdes aglycones en anthocyanes, nous obtiendrons une coloration rouge [15].

II. 3. 2. Caractérisation des Tanins (*Test au $FeCl_3$*)

Une quantité de 15 ml du réactif de Stiasny a été ajoutée à 5 ml de chaque extrait. Le mélange a été maintenu au bain-marie à 80°C pendant 30 min. L'observation d'un précipité en gros flocons caractérise la présens des tanins catéchiques. Pour les tanins galliques, nous avons filtrés la solution précédente. Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de $FeCl_3$ provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense, signe de la présence de tanins galliques [16].

II. 4. Caractérisation des extraits aqueux par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les cinq extraits ont été analysés en utilisant la chromatographie sur couche mince en tant qu'empreinte digitale. Des plaques en aluminium (silica-gel, de marque Merck, 60 GF_{254} ,de taille 20 x 20 cm ont été utilisées en employant un éluent: chloroforme/méthanol /eau (65:35:5; v/v/v) en tant que système de solvants pour les extraits polaires, tandis que pour les extraits apolaires en utilisant: l'éther de pétrole/acétate éthylique (80:20; v/v) [14].

Sept témoins ont été employés: la quercétine, la rutine, le kaempférol, l'acide gallique, l'acide caféique, acide *trans*-Cinnamique, acide 4-hydroxybenzoïque (Sigma Aldrich). La chromatographie sur couche mince a été observée sous la lampe UV à 254-366 nm et par la pulvérisation du réactif: la vanilline sulfurique. La détection des composés ayant un balayage d'activité de DPPH est effectuée par pulvérisation d'une solution méthanolique de DPPH (à 2 mg/ml). Les taches jaunes indiquent la présence des composés actifs. Les rapports frontaux (R_f) des taches résultantes de la séparation ont été calculés et comparés à ceux des témoins [14].

II. 5. Dosage des polyphénols totaux

200 µl de chaque extrait ont été mélangés à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois et à 2 ml de H_2O, et incubés à la température ambiante pendant 4 minutes. Après addition de 0,8 ml de bicarbonate de sodium de 7,5 % au mélange, les polyphénols totaux étaient déterminés après 2 heures d'incubation à la température ambiante. L'absorbance de la couleur bleue a été mesurée au λ_{max} = 765 nm avec un spectrophotomètre de Shimadzu UV-VIS. La quantification a été faite en utilisant une courbe standard de l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique (EAG) par 100g de la matière sèche [19].

II. 6. Dosage des flavonoïdes totaux

Une quantité de 1 ml de chaque échantillon et de standard (préparée dans le méthanol) a été ajoutée à 1 ml de la solution d'$AlCl_3$ (2 % dissous au méthanol). Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée par rapport au blanc préparé de réactif au λ_{max} = 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-35 µg/ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de quercétine par 100g de la matière séchée: mg EQ/100g de la matière sèche [20].

II. 7. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés a été réalisé par la méthode de la vanilline décrite par Julkumen-Titto [21]. En effet, la vanilline réagit avec les flavan 3-*ols* libres et les unités terminales des proanthocyanidines donnant une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle aux taux de flavanols présents dans le milieu et qui présente un maximum d'absorption à 500 nm de longueur d'onde.

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Des aliquotes de 0,1 à 1 ml de la solution mère (0,5 mg/ml) de catéchine et des extraits ont été introduits dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 1ml par addition de méthanol absolu. 1,5 ml de la vanilline à 4% solubilisé dans le méthanol et 750 µl de l'HCl (12M) à 37% ont été ajoutés et à une minute d'intervalle à chaque tube de la série et mis par la suite au bain marie réglé à 30°C pendant 20 minutes. Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents de catéchine (mg EC) par 100g de la matière sèche.

II. 8. Test de l'activité hémostatique

Ce test a été effectué *in vitro* sur le plasma sanguin provenant d'une personne saine adulte mâle (25 ans) avec l'extrait aqueux de la partie aerienne du *Marrubium vulgare*. Le principe de ce test consiste à mesurer le temps de coagulation d'un plasma décalcifié après recalcification [22]. Pour cela, Le sang est recueilli sur citrate de sodium chez des sujets sains. Le plasma est obtenu à partir du sang centrifugé à 3600 tours par minute, pendant 10 minutes.

Ensuite, À l'aide d'une micropipette des volumes de 10 µl à 500 µl, nous avons reparti à raison de 10µl, 50 µl, 100 µl, et 200 µl d'extrait aqueux (100 mg/1ml) dans des tubes à essai pour chaque volume. Un autre tube à essai vide a servi de témoin n'a reçu aucune dose de l'extrait. Les tubes sont maintenus au bain marie à 37° C. Nous ajoutons dans chaque tube 200 µl de plasma et 200 µl de chlorure de calcium ($Cacl_2$) à 0,025M.

Le chronomètre a été déclenché dès la pénétration du plasma dans le tube. Les observations ont commencés dès toutes les 30 secondes au début, puis fréquemment par la suite, jusqu'à ce que l'on observe la prise en masse du caillot, en notant le temps de coagulation pour les 2 tubes de chaque dose. L'évaluation de la coagulation a été faite en penchant le tube sous un angle de 45° afin de constater la présence ou non d'un coagula. Le test est positif si le temps de coagulation d'un sang contenant un extrait est inférieur à celui du sang témoin.

II. 9. Analyse statistique

Toutes les mesures expérimentales ont été effectuées en triple et sont exprimées en tant que moyenne d'écart type ± de trois analyses (moyen (SE) ± d'écart type). L'analyse statistique a été exécutée en utilisant l'analyse de la variance à sens unique (ANOVA). Si la *P*-valeur globale s'avérait statistiquement significative ($P < 0,05$). Toute l'analyse statistique et l'importance de la corrélation entre les variables ont été exécutées en utilisant le logiciel (Graph Pad Prism V 5.00).

III. Résultats et Discussion

III. 1. Rendement des extraits de *Marrubium vulgare*

Chaque extrait a été caractérisé par son rendement, son aspect et sa couleur par rapport à la poudre sèche. Ces éléments sont présentés dans la Figure 1.

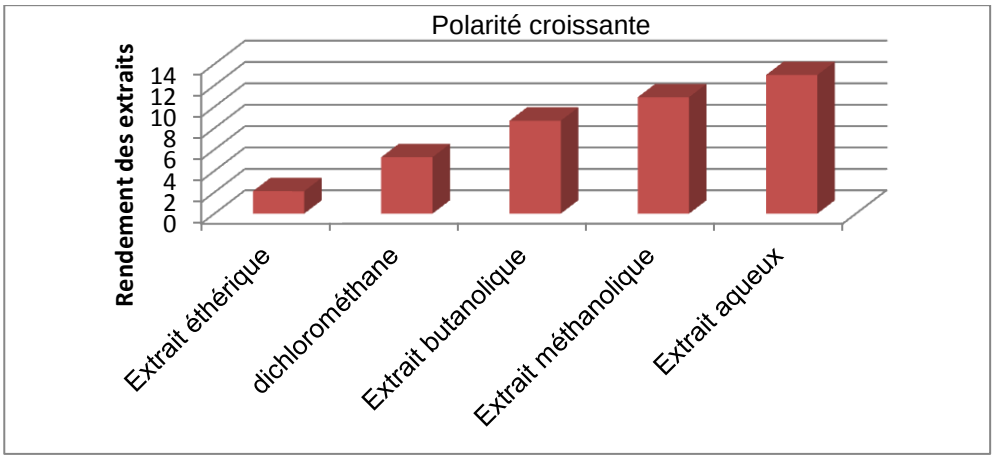


Figure 1. *Rendement des extraits des feuilles de Marrubium vulgare en fonction des solvants de polarité croissante.*

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Les résultats présentés dans la figure 1 montrent que l'extrait aqueux (EAQ) lyophilisé donne la valeur la plus élevée (12,98 %), suivi par l'extrait méthanolique (EMeOH) qui a donné un rendement de (10,9 %). Cependant, l'extraction à l'éther de pétrole, qui a pour but de délipider la matière végétale, a conduit à un rendement faible de 2,1 %. Nous pouvons dire que les solvants polaires donnent des rendements meilleurs que les solvants apolaires, étant donné que les solvants polaires ont la capacité de diffuser a l'intérieur de la poudre végétale, d'atteindre la matrice végétale et de récupérer par conséquent le plus possible des métabolites. Tandis que les solvants apolaires, non miscibles avec l'eau, n'ont pas la capacité d'extraire le maximum des molecules bioactives à cause de la présence de l'eau contenue dans le tissu végétal.

Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs, plus récemment Stanković [23] a préparé cinq extraits, un à l'acétone, un à l'acétate d'éthyle, un à l'éther de pétrole et deux extraits polaires (aqueux et méthanolique) à partir de la plante *Marrubium peregrinum* et a montré que l'extraction méthanolique permettait d'atteindre un rendement de 1.98 ± 0.082 g, alors que l'extraction a l'éther de pétrole conduisait à un rendement limité de 0.15 ± 0.014 g. Il s'ensuit, que le rendement d'extraction et la composition des extraits varient selon la nature du solvant, la période, le lieu de la récolte et la durée de séchage. La méthode d'extraction peut influer elle-même sur le rendement d'extraction, Erdogan-Orhan et al. [7] ont réalisé une extraction par lixiviation à chaud (percolation type soxhlet 8 à 12h) de *M. vulgare* en utilisant l'acétone comme solvant. Ces auteurs ont obtenu un rendement de 6,6 % (P/P), valeur sensiblement supérieure à celle que nous avons obtenu dans cette étude en utlisant le dichlorométhane (5,28 %) (P/P). Cela peut est expliqué probablement par l'effet que l'efficacité de l'extraction au soxhlet est liée au solvant qui se condense et qui vient au contact du végétal est toujours pur, permettant de meilleurs coefficients de partage, alors que dans le cas de la macération, le solvant utilisé pour l'extraction de la matière végétale peut arriver à un certain degré de saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé.

III. 2. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Le suivi des extraits par chromatographie sur couche mince en utilisant le réactif de Godin a montré plusieurs taches dans chaque extrait. Après comparaison avec les standards disponibles, les taches ont été éluées dans le système $CHCl_3$/MeOH/H_2O (65:35:5). Nous avons révélés la probabilité de présence de l'acide gallique (R_f = 0,82) qui a été identifié dans nos précédents travaux [8], de la quercétine (R_f = 0,66), de la rutine (R_f= 0,51), de kaempférol 3-*O*-glucoside (R_f= 0,62) dans l'EMeOH. Ces flavonoïdes ont été mis en évidence et purifiés à partir de différents végétaux. Par exemple, Rigano *et al* [24] ont identifié et purifié 11 flavonoïdes à partir de l'extrait méthanolique de la plante *Marrubium globosum* dont le kaempférol-3-*O*-glucoside et la quercétine. De plus, deux nouveaux métabolites ont été révélés pour la première fois : l'acide *trans*-Cinnamique : $C_9H_8O_2$ (R_f= 0,59) et l'acide 4-hydroxybenzoïque : $C_7H_6O_3$ (R_f= 0,54). Les taches des chromatogrammes des extraits d'éther de pétrole (R_f = 0,18; 0,34; 0,47; 0,71), dichlorométhane (R_f = 0,25; 0,47; 0,72; 0,69) se colorent en violet après révélation au réactif de Godin. Ces taches indiquent la présence, probablement des stérols et des triterpènes.

Après révélation à l'aide d'une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml (mise en évidence de l'activité antiradicalaire), les extraits dichlorométhanique, butanolique, méthanolique et aqueux ont donné des taches jaunes, ce qui indique que les composés antioxydants inclus par chaque extrait ont la capacité de réduire le radical de DPPH.

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

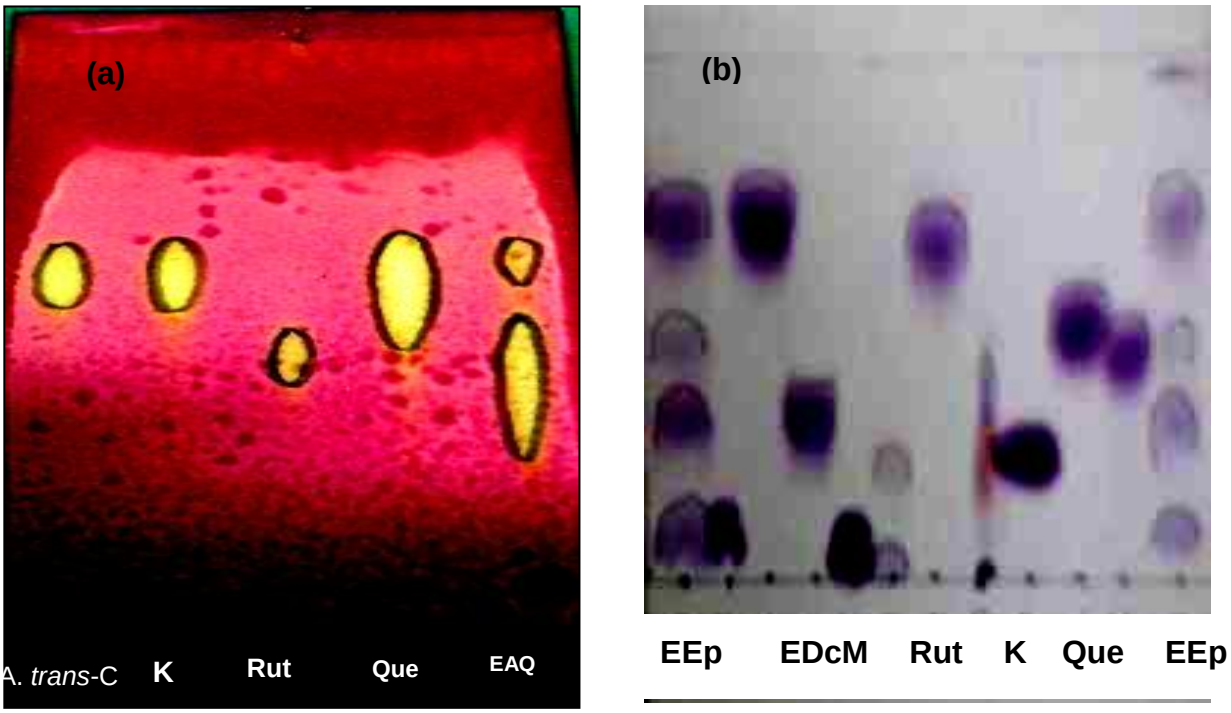


Figure 2. *Chrommatogrames des extraits de M. vulgare: (a) Activité antiradicalire de l'EAQ de M. vulgare (révélation par une solution méthanolique de DPPH). (b) Mise en évidence des stérols et triterpènes dans l'EDcM et l'EEp de Marrubium vulgare.*

III. 3. Dosage des Polyphénols et des Flavonoïdes :

Le contenu phénolique dans les extraits examinés de *M. vulgare* utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est exprimé en termes d'équivalents d'acide gallique (courbe d'étalonnage : y = 0,008x + 0,070; R^2 = 0,992). Les résultats obtenus, exprimés en mg EAG/100g de la matière sèche (Figure 3), varient entre 25 ± 0,2 et 195 ± 0,36 mg EAG/100g de MS. La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique et aqueux. La teneur élevé en polyphénols dans l'extrait méthanolique est liée à la solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires.

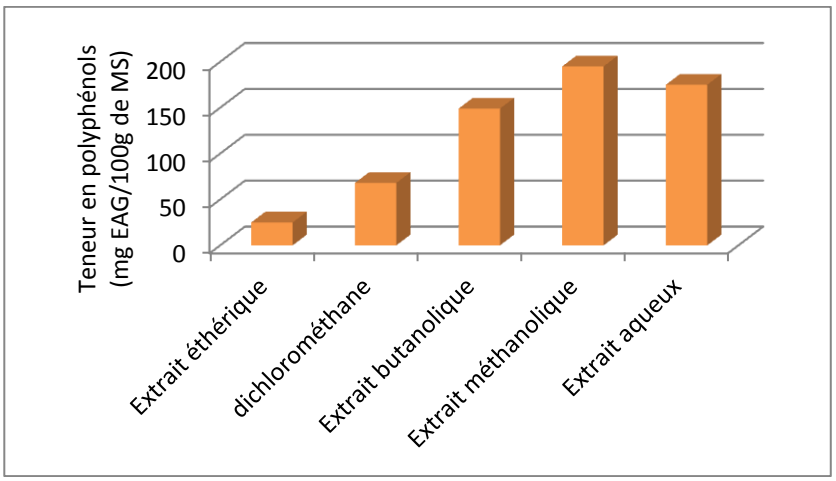


Figure 3. *Teneur des polyphénols totaux dans les extraits de M. vulgare.*

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Les concentrations des flavonoïdes dans les différents extraits du *Marrubium vulgare, reprénsentée par* la Figure 4, a été déterminée en utilisant la méthode spectrophotométrique avec du chlorure d'aluminium. Cette concentration est exprimée en mg équivalent de quercétine EQ/100g de la matière sèche. La courbe d'étalonnage : y = 0,032x – 0,002; R^2 = 0,994. Les résultats obtenus montrent que les concentrations des flavonoïdes dans les extraits de *M. vulgare* varient entre 3,15 et 33,10 mg EQ/100g de MS. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait de méthanol était 33,10 ± 0,60 mg EQ/100g de MS, suivie par l'extrait aqueux lyophilisé (23,86 ± 0,36) et butanolique (20,90 ± 0,78). La plus faible concentration de flavonoïde a été mesurée dans l'EEp (3,15 ± 0,17 mg EQ/100g de MS). La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits [8, 25].

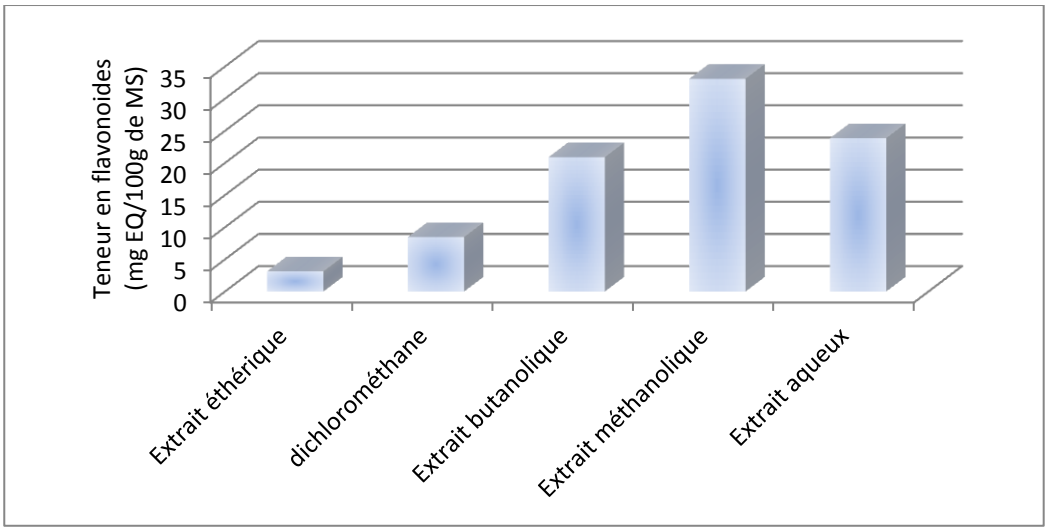


Figure 4. *Teneur en flavonoïdes dans les extraits de M. vulgare.*

La teneur des molécules bioactives varient selon certains paramètres pendant la croissance de la plante telles que: la salinité, sécheresse et exposition solaire qui agissent sur la biosynthèse des métabolites secondaires. [26]. Selon Wojdylo *et al*. [27], la teneur en composés phénoliques variées également en fonction de la méthode d'extraction. En outre, Wojdylo *et al*. [27] ont testé six espèces de *Labiatae*, ils ont constaté que les teneurs phénoliques totales de ces six espèces ont diminuées dans l'ordre suivant : baume > sauge > marrube > romarin > thymus > origan. La teneur en composés phénoliques peut correspondre en premier lieu aux flavonoïdes, car selon certains auteurs, le Marrube contient des taux significatifs en flavones et en flavonols [28]. La teneur en composés phénoliques des extraits organiques et aqueux peut correspondre secondairement aux tanins sous forme condensée, aux acides phénoliques. Ainsi, Wojdylo *et al*. [27] ont indiqué la présence de l'acide caféique, l'acide *p*-comarique et l'acide férulique. Il faut tenir compte que le contenu en composés phénoliques totaux peut correspondre à un moindre degré aux stérols présumés être dans le Marrube [29, 30]. Selon Boizot et Charpentier [31]; Gomez-Caravaca *et al*. [32**]**, les résultats de dosage des composés phénoliques totaux ne peuvent pas indiquer exactement les teneurs des extraits en ces composés, parce que malgré la sensibilité de la méthode de Folin Ciocalteu, ce réactif peut réagir encore avec les acides aminés aromatiques des protéines (surtout avec le tryptophane), les glucides réducteurs comme le glucose et le fructose et la vitamine C (problèmes d'interférences).

La teneur en flavonoïde varie en fonction de solvant utilisé, c'est pourquoi, Bruneton [33]; Stanković [23] ont signalé que les hétérosides de flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires comme les mélanges méthanol-eau parfois et l'Acétonitrile-eau, alors que pour les génines (partie aglycone des flavonoïdes) sont solubles dans les solvants apolaires. Dans ce dosage, il est apparait que la plupart des flavonoïdes de *M. vulgare* sont des flavonoïdes glycosylés car ont le pouvoir d'être mieux solubilisé dans les solvants polaires que les solvants apolaires.

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

III. 4. Dosage des tanins condensés

Les concentrations des tannins condensés sont reportées dans le Tableau 1.

Tableau 1. *Contenu total de tanins condensés dans les extraits de feuilles de M. vulgare.*

Extrait	Tanins *
Ether de pétrole	-
Dichlorométhane	-
n-Butanol	0,92 ± 0,16
Méthanol	5,75 ± 0,42
Eau (extrait aqueux)	16,55 ± 0,03 **

* mg EC par 100 g de la matière sèche ;
** valeur hautement significative ($P \leq 0,001$).

D'après le tableau 1, l'extrait aqueux contient la teneur en tanins la plus élevée (16,55 ± 0,03 mg EC par 100g de MS). Ce resultat est en accord avec de nombreux résultats de chercheurs qui ont indiqués que l'extrait aqueux enregistre des teneurs les plus élevées en tanins condensés suivie par l'extrait éthanolique. Par contre, le méthanol extrait faiblement les tanins quel que soit la méthode d'extraction. Cependant, à haute température, l'eau et l'acétone extraient aussi des substances indésirables comme les protéines, les lipides et les colorants non phénoliques qui causent des interférences lors de dosage des tanins. Nous pouvons alors conclure que l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires. Or, les teneurs en tanins condensés peuvent être variables aussi en raison de plusieurs facteurs tels que : la sensibilité des tanins à des plusieurs voies de dégradation (l'oxydation, la lumière...), le stade de maturité des fruits, les conditions culturales, climatiques, pédologiques ou le stress de prédation [34].

III. 5. Activité hémostatique

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

Tableau 2. *Temps de recalcification du plasma en tube de l'extrait aqueux des feuilles sèches de Marrubium vulgare.*

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

Aux doses de 20 µl, 50,100 et 200 µl successivement de l'extrait lyophilisé des feuilles sèches de *Marrubium vulgare* confère une diminution du temps de recalcification de plasma *in vitro* en tube. C'est une diminution dose dépendante de cet extrait, donc notre extrait accélère la coagulation du plasma. Ce résultat est une indication intéressante en faveur d'une activité hémostatique et astringente de l'extrait aqueux de *Marrubium vulgare.* Il est important de souligner ici que cette activité astringente favorise la vasoconstriction, ce qui est un paramètre important dans l'hémostase. Cette vasoconstriction est due à la présence de tanins dans cette plante. Ces résultats sont

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

semblables à ceux trouvés par Aouissa [35]. Ce dernier a constaté que la propriété astringente est liée à la teneur des tanins dans les feuilles de *Mangifera indica.* Ce résultat a été confirmé par Dandjesso *et al.* [36] en étudiant les extraits des feuilles de quatre plantes médicinales couramment vendus par les herboristes dans le sud du Bénin pour le traitement des saignements, il s'agit des plantes suivantes : *Annona senegalensis*, *Newbouldia laevis*, *Cassytha filiformis et Cissampelos mucronata.*

En effet, les tanins ont un effet hémostatique et vasoconstricteur sur les petits vaisseaux, ainsi que leur utilisation contre les varices et les hémorroïdes [33]. Selon Bruneton [33], les tanins utilisés par voie orale, sont vasoprotectrice; ils limitent la perte des liquides et favorisent la régénération des tissus en cas de blessure ou de brûlure superficielle.

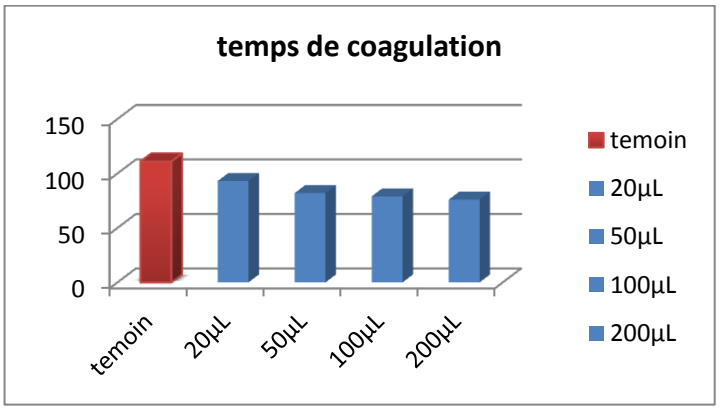


Figure 5. *La diminution du temps de recalcification avec la croissance de dose de l'extrait aqueux des feuilles sèches de Marrubium vulgare.*

D'après les résultats trouvés, nous pouvons dire qu'il existe une corrélation linéaire positive entre les deux paramètres étudiés : la teneur en tanins condensés et l'activité hémostatique (r = 0,96).

IV. Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail confirment l'importance et l'effet thérapeutique de l'espèce *M. vulgare.* Cette plante es considérée une source naturelle de composés anticoagulants d'importance élevée. L'analyse qualitative par la CCM a montré la présence de l'acide gallique, la quercétine, la rutine, kaempférol 3-*O* glucoside et deux nouveaux métabolites: l'acide *trans*-Cinnamique et l'acide 4-hydroxybenzoïque. La concentration la plus élevée des composés phénoliques a été obtenue en utilisant des solvants de polarité croissante. L'extrait méthanolique a donné la plus grande valeur en composés phénoliques et en flavonoïdes. Tandis que, l'extrait aqueux lyophilisé a donné la valeur la plus élevée en tannins condensés. Le contenu élevé des composés phénoliques et la corrélation linéaire significative entre les valeurs de la concentration des composés phénoliques et l'activité hémostatique a indiqué que ces composés contribuent à l'activité anticoagulante. Cela peut être dû aux groupements hydroxyles phénoliques des tanins comme le catéchine capables de réagir avec de fortes liaisons hydrogène avec les atomes de la protéine de liaison peptidique en inhibant la thrombine par exemple, une enzyme protéolytique qui transforme le fibrinogène une molécule soluble en une molécule insoluble, la fibrine. Des études plus approfondie *in vivo* sur l'activité antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-apoptotique et antiproléfirative seraient nécessaires dans les années à venir pour mieux comprendre le mécanisme d'action des molécules bioactives de cette plante, leur dose thérapeutique ainsi que leur site d'action au niveau de la cellule.

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

V. Reférences bibliographiques

[1] Berrougui, H., Maxim, I., Cherki, M., Khalil, A., *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP macrophage, *Life Sciences*, 80(2006) 105–112.

[2] Elberry, A. A., Harraz, F. M., Ghareib, S. A., *et al*., Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in Streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. J. Diabetes Mellit,* 11(2011) 1877-1888.

[3] Pukalskas, A., Venskutonis, P. R., Salido, S., *et al*., Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (*Marrubium vulgare* L.) cultivated in Lithuania, *Food Chem*, 130(2012) 695–701.

[4] Arellano, A. H., Santamaría, L. A., Hernandéz, B. G., Torres, N. P., et Tortoriello, J., Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics, *Phytomedicine*, 11(2004) 561–566.

[5] Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., Ruberto, G., Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian Marrubium vulgare L. infusion, *Fitoterapia*, 83 (2012) 286-292.

[6] El-Bardai, S., Lyoussi, B., Wibo, M., Morel, N., Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat, *Clin Experiment Hypertension*, 26(2004) 465-474.

[7] Erdogan-Orhan, E., Belhattab, R., Senol, F. S., Gülpinar, A. R., Hosbas, S., et Kartal, M., Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium, A. herba-alba, A. fragrans, Marrubium vulgare, M. astranicum, Origanum vulgare subsp. glandulossum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species, *Industrial Crops and Products,* 32(2010) 566-571.

[8] Ghedadba, N., Bousselsela, H., Hambaba, L., Benbia S., Mouloud, Y., Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare* L, *Phytothérapie,* 12(2014) 15-24.

[9] Castillo-Juáreza, I., Gonzaleza, V., Jaime Aguilara, H., Martineza, G., Linaresb, E., Byeb, R., et Romeroa, I., Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders, *J. Ethnopharmacol,* 122(2009) 402–405.

[10] Cushnie, T. P. T., Lamb, A.J., Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids, *Int J Antimicrob Agents*, 38(2011) 99-107.

[11] Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B. D., Becerril-Montes, P., et Saïd-Fernandez, S., Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Arc. Med. Res,* 37(2006) 45-49.

[12] Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Zampirolo, J. A., Cechinel-Filho, V., et Schlemper, V., Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*, *Journal of Ethnopharmacology*, 108:3(2006) 379-384.

[13] Meyre-Silva, C., Yunes, R. A., Schlemper, V., Campos-Buzzi, F., et Cechinel-Filho, V., Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpène present in *Marrubium vulgare*, *Brazil Farmaco*, 60 :4(2005) 321–326.

[14] Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traré, A., Coulibaly, K., Maïga, A., Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali, *C.R.Chimie.*, 7 (2004) 1073-1080.

[15] Aliyu, A. B., Musa, A. M., Abdullahi, M. S., Ibrahim, H., et Oyewale, A. O., Phytochemical screening and antibacterial activities of *Vernonia ambigua, Vernonia blumeoides* and *Vernonia oocephala* (ASTERACEAE), *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68(2011) 67-73.

[16] N'GUESSAN, K., KADJA, B., ZIRIHI, G. N., TRAORÉ, D., AKÉ-ASSI, L., Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire), *Sciences & Nature,* 6(2009) 1-15.

[17] Djahra, A. B., Bordjiba, O., Benkherara, S., Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.), *Phytothérapie*, 11 (2013) 348-352.

[18] Ohtera, A., Miyamae, Y., Nakai, N., Kawachi, A., *et al*., Identification of 6-octadecynoic acid from a methanol extract of *Marrubium vulgare* L. as a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440 (2013) 204-209.

[19] Wong, S. P., Leong, L. P., William-Koh, J. H., Antioxidant activities of extracts of selected plants, *Food Chem*, 99(2006) 775–783.

[20] Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., *et al*., Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation, *Arznein Forsch/Drug Res,* 46(1996) 1–6.

[21] Julkumen-Titto, R., Phenolic constituent in the leaves of northern willows : Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 33 (1985) 213-217.

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

[22] Brummel, K. E., Paradis, S. G., Butenas, S., Mann, K. G., Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation, *Blood,* 100:1(2002) 148-152.
[23] Stanković, M. S., Total phenolic content, flavonoïd concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts, *Kragujevac J. Sci*., 33(2011) 63-72.
[24] Rigano, D., Aviello, G., Bruno, M., Formisano, C., Rosselli, S., Capasso, R., Senatore, F., Izzo, A. A., Borrelli, F., Antispasmodic effects and structure-activity relationships of labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum, J. Nat. Prod,* 72(2009) 1477–1481.
[25] Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., Stocker, P., Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from Cleome arabica in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants, *Food Chem Toxicol*, 48(2010) 2599–606.
[26] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *C. R. Biologies*, 331(2008) 372-379.
[27] Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chem,* 105(2007) 940–949.
[28] Nawwar, M. A. M., El-Mousallamy, A. M. D., Barakat, H. H., Buddrus, J., et Linscheid, M., Flavonoids lactates from leaves of *Marrubium vulgare*, *Phytochemistry,* 28(1989) 3201–3206.
[29] Zlatanov, M. D., et Antova, G. A., Composition of biologically active lipids of *Lamiaceae* seed oils, *Grasas y Aceites*, 55(2004) 143-147.
[30] Dendougui, H., Seghir, S., Belloum, Z., Benayache, F., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., et Benayache, S., A New Labdane Diterpene and Other Constituents from *Marrubium deserti* Noe ex coss, *Rec. Nat. Prod*, 5 :4(2011) 300-304.
[31] Boizot, N., et Charpentier J. P., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier, *Le cahier des Techniques de l'Inra*, (2006) 79-82.
[32] Gomez-Caravaca, A. M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., et Fernandez-Gutierrez, A., Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(2006) 1220-1234.
[33] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, *4e éd., revue et augmentée*, *Tec & Doc - Éditions médicales internationales*, Paris, (2009), 1288.
[34] Mahmoudi, S., Khali, M., et Mahmoudi, N., Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut : *Cynara scolymus* L, *Nature & Technologie*, 9(2013) 35- 40.
[35] Aouissa, I. W. R., Etude des activités biologiques et de la toxicité aigüe de l'extrait aqueux des feuilles de *Mangifera indica L.* (Anacardiaceae), Thèse de pharmacie. Bamako: Université de Bamako, (2002) 127.
[36] Dandjesso, C., Klotoé, J. R., Dougnon, T. V., Sègbo, L. J., Atègbo, J. M., Gbaguidi, F., Fahl, L., Fanoul, B., Lokol, F., Dramane, K., Phytochemistry and hemostatic properties of some medicinal plants sold as anti-hemorrhagic in Cotonou markets (Benin), *Indian Journal of Science and Technology*, 5:8(2012) 6854-6846.

Please cite this Article as:

Nabil GHEDADBA, Leila HAMBABA, M. C. ABERKANE, S. M. Oueld-Mokhtar, Nassima FERCHA, Houas BOUSSELSELA, Évaluation de l'activité hémostatique *in vitro* de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L., ***Algerian J. Nat. Products*, 2:2 (2014) 64-74**

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp
Online ISSN: 2353-0391
Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL

Copyright © 2014, Algerian Journal of Natural Products (Online ISSN: 2353-0391), All rights reserved

Algerian Journal of Natural Products

www.ajnp.webs.com
www.univ-bejaia.dz/ajnp

Reviewers Guide

PART A: ***Editorial Office Only***

SECTION I

Reviewer's Name:	
E-Mail:	
Manuscript Number:	
Title:	
Date Sent To Reviewer:	
Date Expected From Reviewer:	

PART B: ***Reviewer Only***

SECTION II: Comments per Section of Manuscript

General comment:	
Introduction:	
Methodology:	
Results:	
Discussion:	

SECTION II (Cont.)

Bibliography/References:	
Others:	
Decision:	

SECTION III - Please rate the following: ***(1 = Excellent) (2 = Good) (3 = Fair) (4 = poor)***

Originality:	
Contribution To The Field:	
Technical Quality:	
Clarity of Presentation :	
Depth of Research:	

SECTION IV - Recommendation: (*Kindly Mark With An X*)

Accept As Is:	
Requires Minor Corrections:	
Requires Moderate Revision:	
Requires Major Revision:	
Submit To Another Publication Such As:	
Reject On Grounds Of (Please Be Specific):	