

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université ABDERRAHMANE MIRA – Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Pharmacotoxicologie



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Évaluation de l'effet antioxydant et antibactérien de**  
*Marrubium vulgare*

Présenté par :

**MADANI Soria & MAOUCHE Ouassila**

Soutenu le : **26 Juin 2023**

Devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup> BOUREBABA. Y</b>	<b>MCB</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mr. BELKACEM. N</b>	<b>MCB</b>	<b>Encadrant</b>
<b>M<sup>me</sup> BOUDJOUAN. A</b>	<b>MAB</b>	<b>Examinatrice</b>

**Année universitaire : 2022 /2023**

## **Remerciements**

*La réalisation de ce mémoire trace la fin d'une aventure vécue tout au long d'une année*

*Au terme de cette étude Nous tenons là à remercier vivement :  
**Le Seigneur Dieu***

*Le tout puissant, de nous avoir, facilité le chemin du savoir et de la science On vous doit ce que nous sommes devenues Louanges et remerciements pour votre clémence et miséricorde.*

**À Notre promoteur Mr BELKACEM. N**

*On vous remercie vivement de nous avoir fait honneur de diriger ce travail  
On vous remercie pour vos qualités humaines Veillez  
trouver dans ce travail l'expression de notre grande estime et nos sentiments les plus  
sincères.*

**À Mme BOUREBABA. Y**

*C'est un honneur que vous nous faites en acceptant la présidence de notre jury  
D'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de  
juger ce travail.*

*Veillez accepter, l'assurance de notre estime et de notre profond respect.*

**À Mme BOUDJOUAN. A**

*On tient à vous remercier tout particulièrement d'avoir accepté de juger ce travail et  
de participer à notre Jury avec grande sympathie.  
Veillez croire en notre profond respect.  
On vous remercie pour le privilège que vous nous avez accordé en siégeant parmi ce jury.*

**Aux techniciens des laboratoires**

*Nous exprimons notre vive reconnaissance qui ont eu l'amabilité de nous accueillir, de nous  
conseiller et de nous orienter pendant toute la durée du cycle spécialement Mme. AOUANE  
**Meriem** qui nous à aider beaucoup dans ce travail.*

**À tous nos enseignants(es) du département de biologie**

*Et spécialement ceux de notre spécialité pharmacotoxicologie qui ont*

*Contribuées à notre formation.*

*À tous ceux qui ont Contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail grâce  
à leur disponibilité, Compréhension et collaboration*

## **Dédicaces**

*Ce travail est dédié à :*

*À ma chère mère*

*Toi qui m'as donné la vie, toi qui as gouverné mes premiers pas  
Toi qui m'as toujours donné le maximum de ce qu'elle pouvait, et qui a tant sacrifié pour  
nous*

*Tu m'as épaulé dans les moments difficiles.  
Que Dieu te bénisse, maman et te prête longue vie.*

*À mon cher père :*

*« C'est l'occasion pour moi de te remercier pour tous les sacrifices que tu as déployés à  
l'égard de tes filles ».*

*Toi qui as pu nous former en traversant toutes les vicissitudes de la vie ;  
Que Dieu vous bénisse et t'accorde une longue vie.*

*À mes chères sœurs/frère,*

*Sabah, Nabila, Alima, Mounira, Samiha, Souhila, Ouassila, Rima , Célia, Ammmar :  
Pour m'avoir tant soutenu et être toujours présentes à chaque moment de mes études.  
Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer mon amour envers vous.*

*À ma chère grand-mère :*

*Pour votre amour, et vos prières qui m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long  
parcours. J'implore Dieu pour qu'il nous permette de profiter de votre présence à nos côtés.*

*À mes nièces et mes neveux que j'aime beaucoup*

*À mes cousins, cousines*

*À ma chère amie et compagne de parcours Imene :  
Pour tous les moments qu'on a passés ensemble.*

*À ma chère binôme, Ouassila,*

*Pour sa patience infinie et sa sympathie*

*À mes très chères amis et collègues : Amani, Sara, Meriem, selsebil  
En souvenir des moments merveilleux que nous avons passés  
et aux liens solides qui nous unissent.  
Je vous souhaite beaucoup de réussite.*

*À tous la promotion de master pharmacotoxicologie 2023.*

**Soria**

## **Dédicaces**

*Avec l'aide de Dieu, le tout puissant qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :*

*À celle qui m'a donné la vie et l'amour, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère (Luiza).*

*À mon père (Mokrane) mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu et pour son aide matérielle et morale, vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.*

*À mes chers frères Jugurta (youyou), Farid et Nassim en reconnaissance de leur affection toujours constante.*

*À ma très chère sœur Karima.*

*À l'âme de ma chère sœur Kahina qui n'est pas présente ce jour-là mais, toujours présente dans nos cœurs que son âme repose en paix dans le vaste paradis.*

*À toute ma famille et mes proches*

*À mon binôme Soria et sa famille*

*À mes très chères amies Dounia, Ahlem, Imane, Chafiaa, Sabrina, Zahra ...*

*À mes neveux Yani, Ilyas, Ilyan*

*À mes nièces Imene, Sara, Kahina*

*À toutes la promotion pharmacotoxicologie 2022 /2023*

*À tous ceux que j'apprécie et je n'ai pas mentionné mais que je n'ai pas oublié.*

***Ouassila***

---

## Tables des matières

Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographique</b>	
I.1. Généralités sur Marrubium vulgare.....	3
I.1.1. Présentation de la plante.....	3
I.1.2. Systématique .....	4
I.1.3. Nom vernaculaire .....	4
I.1.4. Description botanique .....	4
I.1.5. Composition chimique .....	5
I.1.6. Propriétés thérapeutiques .....	6
I.1.7. Toxicité.....	6
I.1.8. Métabolites secondaires .....	6
I.2. Activité anti-oxydante .....	7
I.2.1. Radicaux libres .....	7
I.2.2. Différents types des ROS .....	9
I.2.3. Stress oxydatif .....	10
I.2.4. Antioxydants .....	11
I.2.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante .....	12

I.3. Activité antibactérienne.....	12
I.3.1. Antimicrobiens et résistance bactérienne .....	12
I.3.2. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne .....	13
I.3.3. Description des bactéries étudiées.....	14

## **Chapitre II: Matériel et méthodes**

II.1. Matériel .....	15
II.1.1. Matériel végétal .....	15
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Extraction .....	16
II.2.2. Analyses phytochimiques .....	17
II.2.3. Évaluation de l'activité antioxydante.....	19
II.2.4. Évaluation de l'activité antibactérienne.....	22
II.3. Analyse statistique .....	23

## **Chapitre III: Résultats et discussion**

III.1. Rendement d'extraction.....	24
III.2. Études phytochimiques .....	25
III.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	26
III.2.2. Teneur en flavonoïdes .....	28
III.2.3. Teneur en tanins condensés .....	29
III.3. Évaluation de l'activité antioxydante .....	29
III.3.1. Inhibition du radical DPPH• .....	30

III.3.2. Réduction du radical-cation ABTS•+ .....	33
III.3.3. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP) .....	36
III.4. Activité antibactérienne .....	37
III.4.1. Résultats des CMI.....	37
Conclusion et perspectives .....	39
Références Bibliographiques .....	40
Annexe .....	50

## Liste des abréviations

**ABTS** : Acide 2, 2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique.

**AGPI**: Acides gras polyinsaturés

**APG III** : Angiosperm Phylogeny Group 2003.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**BHA**: Butylated hydroxyanisole.

**CA**: Capacité anti-oxydante.

**CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice.

**DMSO**: Dimethyl sulfoxyde.

**DPPH**: 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl

**EA**: Extrait acétonique

**EAA** : Équivalent en Acide ascorbique.

**EE** : Extrait éthanolique

**EM** : Extrait méthanolique

**EQ** : Équivalent Quercétine.

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.

**FC**: Folin-Ciocalteu

**FRAP**: Ferric Reducing Antioxydant Power.

**GPx**: Glutathion peroxydase.

**IC50**: Concentration inhibitrice de 50% d'une activité.

**LPS**: Lipoposaccharides.

**MHB**: Muller Hinton Broth.

**RNS**: Reactive Nitrogen Species.

**ROS**: Reactive Oxygen Species.

**SOD**: Super Oxyde Dismutase.

**TROLOX**: 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid.

**TPTZ** : 2, 4, 6-tris 2-pyridyl-1, 3, 5-s-triazine

## Listes des figures

Figure 1-Photo originale du <i>Marrubium vulgare</i> .....	3
Figure 2-Morphologie des fleurs et fruits de <i>M. vulgare</i> (Boullard, 2001).....	5
Figure 3- Neutralisation de RL par un antioxydant (Valerie, 2019).....	8
Figure 4-Origines des radicaux libres (Favier, 2006).....	8
Figure 5-Photo originale pour coupage et rinçage des feuilles du <i>Marrubium</i> .....	16
Figure 6- (1) Séchage - (2) Broyage - (3) Poudre (4) Conservation .....	16
Figure 7-Rendement d'extraction. ....	24
Figure 8-Teneur en polyphénols des extraits (EA, EM, EE).....	27
Figure 9-Teneur en flavonoïdes des extraits (EA, EM, EE).....	28
Figure 10-Pourcentages d'inhibition du radical DPPH <sup>*</sup> par les standards, la Vit C ....	30
Figure 11-Pourcentages d'inhibition du radical DPPH <sup>*</sup> par les extraits .....	31
Figure 12-Valeurs des IC50 de Vit C, BHA et les extraits EA, EE, EM .....	32
Figure 13-Pourcentage d'inhibition de radical ABTS <sup>•+</sup> en présence de Vit C et BHA	34
Figure 14-Pourcentage d'inhibition du radical ABTS <sup>•+</sup> des extraits EA, EE et EM...	35
Figure 15-Valeurs des IC50 des standards et des extraits EA, EE et EM. ....	35
Figure 16-Pouvoir réducteur de EE, EA, EM comparativement au vit C .....	36
Figure 17-Résultats d'ensemencement pour chaque souche bactérienne. ....	38

## Liste des tableaux

Table 1-Principaux radicaux libres.....	10
---	----

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

---

Les plantes médicinales sont la source d'une immense variété de molécules bioactives. Ces substances naturelles ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie pharmaceutique en particulier, qui utilise encore une grande proportion de médicaments d'origine végétale (Aquaron, 2005).

Une plante est dite médicinale lorsqu'au moins une partie possède des propriétés curatives ou préventives d'une ou de plusieurs maladies (Bruneton, 1999). Parmi ces différentes familles de plantes médicinales, on trouve les lamiacées qui sont l'une des familles connues depuis longtemps pour leurs propriétés médicinales, aromatique ou culinaire. Elle renferme différentes plantes telles que : la menthe, le basilic, la sauge et aussi le marrube blanc (*Marrubium vulgare*) (Youssef, 2006)

Le *Marrubium vulgare* est une plante médicinale fréquente dans toute l'Algérie, plus précisément dans notre région : la Kabylie où elle est utilisée depuis longtemps dans le traitement de divers troubles. Traditionnellement, elle a été utilisée pour traiter des affections telles que les maladies du foie et de la vésicule biliaire, la constipation, les infections des voies respiratoires, les ballonnements, ainsi que les douleurs et crampes abdominales (Hesini et al., 2007). Cette plante est un réservoir potentiel de composés attribué aux métabolites secondaires (Boudjelal, 2013). Les polyphénols sont parmi ces composés, largement retrouvés chez les végétaux. Ils sont de plus en plus reconnus pour leurs diverses activités biologiques, dont la plus importante étant l'activité antioxydante et antibactérienne (Nawaz et al., 2006).

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydatifs et antioxydants de l'organisme. Il a en effet été décrit comme un agent causal critique impliqué dans de nombreuses maladies humaines chroniques tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, l'inflammation, le diabète sucré et le vieillissement (Uttara et al., 2009). Ces dommages oxydatifs sont obtenus par l'attaque des radicaux libres sur diverses biomolécules, en particulier les protéines, les lipides et l'ADN ; ce qui conduit finalement à la dégradation et à la mort des cellules (Moon et Shibamoto, 2009).

En outre, les infections bactériennes sont causées par divers micro-organismes et sont à l'origine des maladies les plus meurtrières et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques ont été développés pour les traiter, mais leur abus a abouti à l'émergence de multi-résistances bactériennes (Hesini et al., 2007).

## INTRODUCTION

---

Le but principal de notre étude est d'élucider *in vitro* l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits des feuilles de *Marrubium vulgare*. Pour atteindre cet objectif, le présent travail sera divisé en deux parties :

- Une partie bibliographique dans laquelle seront rapportées certaines informations de base nécessaires pour la compréhension du travail expérimental relatives à la plante étudiée et les principales activités biologiques.
- Une partie expérimentale dans laquelle seront exposés le matériel utilisé et la méthodologie adoptée ainsi que la présentation des résultats et leur discussion.

# CHAPITRE I: SYNTHÈSE

## BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1. Généralités sur *Marrubium vulgare*

Certaines plantes possèdent des propriétés thérapeutiques et sont classées comme plantes médicinales (Farnsworth et al., 1986).

Environ 35 000 espèces de plantes sont utilisées dans le monde à des fins médicinales, qui constituent la plus grande biodiversité utilisée par les êtres humains (Iserin, 2001). Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et al., 2007).

### I.1.1. Présentation de la plante

*Marrubium vulgare* L. ou marrube blanc est une espèce très répandue dans le bassin méditerranéen et utilisée pour ses vertus thérapeutiques (Figure 1) (Djahra et al., 2013).



Figure 1-Photo originale du *Marrubium vulgare*

### I.1.2. Systématique

L'espèce *Marrubium vulgare* appartient à l'ordre des Lamiales, qui fait partie du vaste groupe des angiospermes, également connues sous le nom de plantes à fleurs (**Hennebelle et al., 2007**). Selon la classification systématique établie par l'APG III (**Angiosperm Phylogeny Group 2003**), cette plante est catégorisée de la manière suivante : elle appartient au règne des plantes (Plantae), plus précisément au sous-règne des plantes vasculaires (Tracheobionta) et à l'embranchement des plantes à graines (Spermatophyta). Au sein de la division Magnoliophyta (plantes à fleurs), elle est classée dans la classe Magnoliopsida (dicotylédones) et plus spécifiquement dans la sous-classe Asteridae. L'ordre auquel elle appartient est Lamiales, la famille est Lamiacées, le genre est *Marrubium*, et enfin, l'espèce est *Marrubium vulgare*.

Cette classification botanique permet de situer de manière précise *Marrubium vulgare* dans le règne végétal et de comprendre ses relations taxonomiques avec d'autres plantes. *Marrubium vulgare*, couramment appelé marrube commun, est ainsi intégré dans la grande diversité des angiospermes.

### I.1.3. Nom vernaculaire

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom Marriouth (**Quezel., 1963**), Merrîwt au Maroc (**Bellakhdar., 1997**), Marroubia en Tunisie (**Boukef., 1986**). En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. Selon (**Bonnier. ; 1909**),

### I.1.4. Description botanique

*M. vulgare* est une plante herbacée annuelle ou vivace des Lamiacées au port coriace, ligneux et ramifié, racine pivotante ou nombreuses racines latérales fibreuses et nombreuses tiges, quadrangulaires, dressées, très duveteux, de 20 à 100 cm de haut (**Yabrir, 2019**). Feuilles pétiolées, elliptiques ou arrondies, avec des bords dentés et une face inférieure blanchâtres et douce (**Figure 2**). Le fruit est de quatre akènes. Toute la plante a une odeur forte, piquante et un gout amer (**Aouadhi, 2010**). Elle porte de petites fleurs blanches de 12 à 15 mm de long en corolle à deux lèvres. La lèvre inférieure est trilobée, la lèvre supérieure est double et le calice a 10 dents, court et accroché (**Quezel, 1962**).



**Figure 2-Morphologie des fleurs et fruits de *M. vulgare* (Boullard, 2001).**

Le genre *Marrubium* compte 40 espèces dans le monde (Kharazian, 2017). En Algérie, il existe 6 espèces différentes : *Marrubium vulgare*, *Marrubium supinum*, *Marrubium peregrinum*, *Marrubium alysson*, *Marrubium alyssoides* Pommelet et *Marrubium deserti de Noé* (Quezel et Santa, 1963).

### **I.1.5. Composition chimique**

La partie aérienne du marrube blanc contient plusieurs métabolites secondaires. Le principal métabolite de cette plante a été identifié en tant que marrubiine, un diterpène labdane furanique, ainsi que la présence du pérégrinol, du vulgarol, du marrubénol et du marrubiol (Ghedabda et al., 2014)

D'autres composés sont présents dans la plante, parmi lesquels on peut citer les flavonoïdes (quercétine, l'apigénine, lutéoline...), les tanins (l'acide gallique), des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (acide chlorogénique, caféique, caféylquinique, ainsi que plusieurs phenylpropanoïdes esters tels que les forsytoside, arenarioside, ballotetoside, alyssonnoïde, verbascosides (acteosides), des huiles essentielles comportant différents composés monoterpéniques ( $\alpha$ -pinène, camphène, lomonène...) (Boudjelal et al., 2012). La plante est

aussi caractérisée par la présence d'autres composés tels que les alcaloïdes (stachydrine, bétonicine), les sels minéraux, et les stéroïdes (**Sahpaz et al., 2002**).

### **I.1.6. Propriétés thérapeutiques**

Marrube blanc possède nombreuses propriétés thérapeutiques. En général, son utilisation caractéristique et la plus courante dans la médecine populaire est de traiter les maladies respiratoires et gastro-intestinales. Cependant, dans l'usage traditionnel tunisien, la plante est aussi utilisée comme agent hypotenseur, hypoglycémiant et cardiotonique (**Kadri et al., 2011**). Il est considéré comme antitussif et utilisé au cours des infections bronchiques aiguës et bénignes, il donne des résultats satisfaisants dans le cas des inflammations de la gorge, en décoction les feuilles sont utilisées pour les soins de la vésicule biliaire (**Hseini et al., 2007**).

En infusion, le marrube est administré en cas d'asthme, fièvre, manque d'appétit, agitation, insomnie et soulage les gastralgies. En décoction, elle est conseillée en cas de diabète, diarrhée, et pour embellir les cheveux. En gouttes auriculaires, elle est employée contre les otites. En cataplasme sur les tempes, on l'utilise contre la fièvre et sur les abcès et furoncles crevés afin de les panser et les cicatriser (**Tahri et al., 2012**).

### **I.1.7. Toxicité**

C'est une plante amère à caractère salin et ne peut donc pas être tolérée s'il y'a une gastro-entérite ou des situations de nausées ou de vomissements ou encore en cas de dyspepsie (**Aouadhi, 2010**).

### **I.1.8. Métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées à partir de métabolites primaires, elles sont produites en très faibles quantités. Nous distinguons trois classes principales : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes, chacune de ces classes contient divers composés à large activité en biologie humaine. (**Krief, 2003**). Notre intérêt dans cette étude est essentiellement focalisé sur les polyphénols.

### I.1.8.1 Composés phénoliques

Appelés également les polyphénols, sont des molécules spécifiques naturelles largement répandues, avec plus de 8000 structures phénoliques connus dans le règne végétal qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**)

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside) ;

Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs, racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits (**Chopra et al.,1986**). Les principales classes de composants phénoliques sont : les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, acides phénoliques, tanins, coumarines.

## I.2. Activité anti-oxydante

### I.2.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique, rendant ainsi cette espèce chimique particulièrement instable. Lorsque cet électron célibataire est situé sur un atome d'oxygène, on parle alors « d'espèces réactives de l'oxygène » (ERO) (**Durand et al., 2013**). En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**Goudable et al., 1997**).

Les radicaux libres attaquent d'autres molécules afin de trouver des substituts à leurs électrons manquants. Après que l'électron d'une molécule a été volé par un radical libre, elle devient un nouveau radical libre et continue à attaquer d'autres molécules (**Figure I-3**) (**Valerie, 2019**).

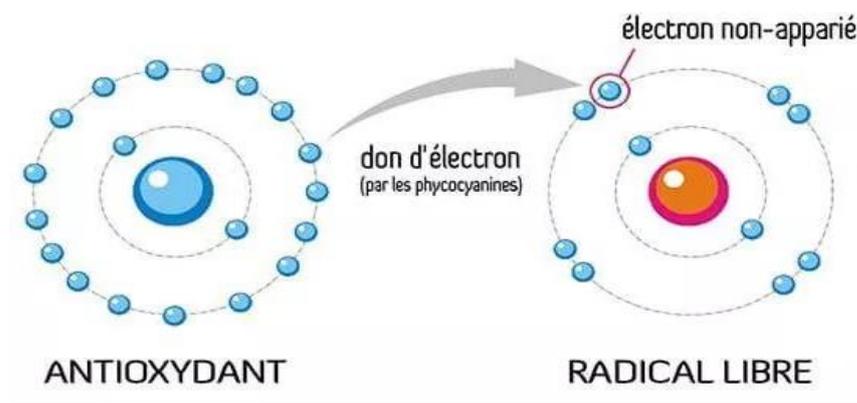


Figure 3- Neutralisation de RL par un antioxydant (Valerie, 2019)

### I.2.1.1 Origine des radicaux libres

Les radicaux libres, à la fois les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS), sont dérivés des deux sources : endogènes (mitochondries, peroxyosomes, réticulum endoplasmique, etc) (Phaniendra *et al.*, 2014) ; et de sources exogènes principalement des facteurs environnementaux dans notre mode de vie (l'exposition aux rayons UV, les radiations ionisantes, les métaux lourds, pollution atmosphérique, tabagisme, le contact avec des agents cancérogènes et l'alcool, des médicaments tels que Halothène, Paracétamol, etc) entraînant une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène dans notre corps (Figure 4) (Pham-huy *et al.*, 2008).



Figure 4: Origines des radicaux libres (Favier, 2006).

### I.2.1.2 Action des radicaux libres

Parmi tous les radicaux libres susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie (**Favier, 2003**)

- Les radicaux libres remplissent de nombreuses fonctions critiques dans le corps en contrôlant le flux sanguin dans les artères, en combattant les infections et en gardant le cerveau alerté et concentré.
- Les cellules phagocytaires impliquées dans la défense de l'organisme produisent et mobilisent des radicaux libres d'oxygène pour détruire les bactéries et autres cellules de corps étrangers qu'elles ingèrent.
- À l'instar des antioxydants, certains radicaux libres à de faibles niveaux sont des molécules de signalisation, c'est-à-dire qu'ils sont responsables de l'activation et de la désactivation des gènes.
- Certains radicaux libres tels que l'oxyde nitrique et le super oxyde sont produits en très grande quantité par les cellules immunitaires pour empoisonner les virus et les bactéries.
- Certains radicaux libres tuent les cellules cancéreuses. En fait, certains médicaments anticancéreux visent à augmenter la quantité de radicaux libres dans le corps (**Khan et al., 2018**).

### I.2.2. Différents types des ROS

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer trois groupes (**Favier, 2003**) :

Les radicaux primaires, qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires et dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$ . Ils jouent un rôle particulier en physiologie.

Les radicaux secondaires se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), ne

sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. **Tableau I.**

**Table I-Principaux radicaux libres (Haton, 2005).**

Oxygène	$O_2$
Oxygène singulet	$^1O_2$
Anion super oxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$OH$
Radical hydroperoxyde	$HOO$
Radical peroxyde	$ROO$
Hydroperoxyde	$ROOH$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogene	$H_2O_2$
Radical oxyde nitrique	$NO^{\cdot}$

### I.2.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre le système de défense antioxydant et la production des radicaux libres. Ce déséquilibre peut être causé par une nutrition insuffisante en antioxydants, une surproduction endogène ou une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants. Il peut infecter et endommager les macromolécules, les cellules, les tissus, les organes et tout le corps. Une fois ces macromolécules endommagées, leurs fonctions de base dans le métabolisme cellulaire changeront, entraînant diverses maladies (**Durackova et al., 2010**)

## I.2.4. Antioxydants

Un antioxydant est défini comme étant toute substance capable de neutraliser ou réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettant de maintenir, au niveau de la cellule, des concentrations non-cytotoxiques des EROs. En d'autres termes, un antioxydant retarde significativement ou prévient l'oxydation des substances comme les lipides, les protéines, les DNA et les carbohydrates. Les antioxydants exercent leur protection à différents stades de l'oxydation lipidique par l'intermédiaire de différents mécanismes.

### I.2.4.1 Antioxydants endogènes

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : la super oxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avissar *et al.*, 1989).

La SOD convertit l'anion superoxyde en eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), qui est un substrat pour la CAT et le GSH-Px. La catalase métabolise le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et oxygène. La GSH-Px réduit le  $H_2O_2$  et les hydro-peroxydes organiques en réagissant avec le glutathion (GSH).

### I.2.3.2 Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes, comme les vitamines E et C, peuvent exister dans l'organisme sur membrane cellulaire et dans le milieu intracellulaire et extracellulaire. Ils réagissent avec les ROS pour éliminer ou de les inhiber. L'intérieur lipidique hydrophobe des membranes exige un éventail différent d'antioxydants. La vitamine E liposoluble est l'antioxydant le plus important dans cet environnement, protégeant contre la perte d'intégrité de la membrane. Les antioxydants liposolubles jouent un rôle important dans la prévention de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les membranes biologiques. Les antioxydants hydrosolubles, comme la vitamine C, jouent un rôle clé dans la neutralisation des ROS dans la phase hydrophile (Munteanu *et al.*, 2021).

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

### **I.2.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante**

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante, pour tester la capacité de piégeage d'un radical libre par un extrait de plante, par exemple : DPPH<sup>•</sup> (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) ; FRAP (Ferric reducing antioxidant power) et ABTS<sup>•+</sup> (Acide 2, 2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

### **I.3. Activité antibactérienne**

L'être humain est exposé aux microbes dès la naissance, peu à peu, ces derniers colonisent son revêtement cutanéomuqueux et provoquent des infections (**Kaufmann, 1997**), ce sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter. Cependant, leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multi-résistance bactérienne (**Abdallah et al., 2019**).

Selon ce dernier auteur, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques, ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale. En plus, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Afin de mettre sous contrôle de nouvelles infections de nouveaux principes actifs à base de plante sont utilisés comme source de composés antimicrobiens (**Coolborn et al., 2010**).

#### **I.3.1. Antimicrobiens et résistance bactérienne**

Le terme agent antimicrobien fait référence à un groupe de composés ayant la capacité d'éliminer ou de réduire les infections bactériennes (**CCE., 2001**). Les antibiotiques font partie également des antimicrobiens, ils jouent un rôle important dans le traitement des maladies contagieuses, ce qui entraîne leur surutilisation et une utilisation sélective (**Levy, 1992**). L'abus d'antibiotiques est à l'origine de la résistance des bactéries aux agents antimicrobiens connus d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles molécules naturelles comme les extraits bruts des plantes qui ont commencé à attirer beaucoup d'attention en tant que source potentielle de molécules antimicrobiennes (**Ykhlef et al., 2011**).

### **I.3.1.1 Antibiotiques**

Du Grec anti signifiant « contre » et bios « la vie » (**Chardon et al., 2014**). Les antibiotiques sont des substances ou agents produits par des micro-organismes ou dérivés de ceux-ci, qui détruisent ou inhibent la croissance d'autres micro-organismes vivants (**Yala et al., 2001**).

### **I.3.2. Techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne**

Les techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne peuvent être mise en évidence en milieu solide qu'en milieu liquide (**Inouye, 2003**).

#### **I.3.3.1 Technique de diffusion sur disque de cellulose**

C'est la technique la plus connue et la plus utilisée actuellement, elle consiste à ensemencher une suspension bactérienne sur un milieu gélosé en boîte de pétri. La substance à tester est ensuite imprégnée sur un disque de cellulose ; ce dernier est déposé sur la boîte de pétri. Durant l'incubation, la substance est alors censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse), ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance (**Fontanay et al., 2015**).

#### **I.3.3.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)**

La méthode en milieu liquide peut se décliner en 2 techniques distinctes : soit en tube, appelée « macro-méthode en milieu liquide » ; soit en plaque à 96 puits (fond en « U »), appelée « micro-méthode en milieu liquide » ; cette dernière est une technique automatisable, à la différence de la macro-méthode.

Dans le cas de la technique dite en « micro-méthode », le plan des plaques est le suivant : la gamme de concentrations est réalisée par dilution sériée dans l'eau et/ou le dispersant, l'inoculum bactérien est ajouté dans les puits correspondants. Les microplaques ainsi préparées sont incubées 24 h à 37°C. La croissance bactérienne se traduit par l'apparition d'un trouble dans le puits (**Fontanay et al., 2015**).

### **I.3.3. Description des bactéries étudiées**

#### **I.3.3.1 Escherichia coli**

Est une bactérie Gram négatif, non sporulant, en forme de bâtonnet, anaérobie facultative et coliforme (**Campbell et al., 2002**), généralement mobiles grâce aux flagelles et de 2 à 6 Um de long. Tandis que sa largeur est de 1,1 à 1,5 um (**Steven et al., 2004**) ; elle représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës (**Guillou, 2016**).

#### **I.3.3.2 Staphylococcus aureus**

Ces espèces sont des Cocci à Gram positif sphérique et de 0,8 à 1 um de diamètre (**Steven et al., 2004**), anaérobie facultative formant un biofilm. C'est la principale cause d'infections de la peau et des tissus mous (**Malik et al., 2022**).

## CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel végétal

Notre étude a été portée sur une espèce de plante de la famille des lamiacées qui est le *Marrubium vulgare*, connue par sa richesse par les substances actives.

Seule la partie aérienne (feuilles) a été utilisée puisque à ce niveau se trouvent la majorité des principes actifs responsables des activités biologiques.

#### II.1.1.1 Récolte de la plante

Notre plante étudiée a été collectée au mois de février 2023 dans la région de Draa El Gaide Kherrata qui est caractérisée par un climat sec.

#### II.1.1.2 Séchage et broyage

Après la récolte, les feuilles de la plante sont soumises à un rinçage à l'eau de robinet pour éliminer les impuretés, le sol, la poussière et autres particules, ensuite elle a été coupée en petits morceaux pour accélérer le séchage qui a été réalisé dans un endroit obscur, sec et bien aéré pendant 15 jours (**Figure 5**).

Le matériel végétal destiné à l'extraction a été broyé en poudre fine pour permettre une meilleure extraction, à l'aide d'un moulin à café (M&D 220-240V, 50/60Hz, 120W).

La poudre obtenue suite au broyage a été tamisée à l'aide d'un tamis de plus petit diamètre disponible (125  $\mu\text{m}$ ), pour récupérer à la fin une poudre très fine. La poudre a été ensuite conservée dans des bocaux en verre hermétiquement fermés et stockés à l'abri de la lumière (**Figure 6**) ; qui va servir ensuite à la préparation des extraits et à la quantification des composés phénoliques ainsi qu'à l'évaluation de l'activité anti-oxydante et anti-bactérienne.



Figure 5- : Photo originale pour coupage et rinçage des feuilles du *Marrubium vulgare*



Figure 6- (1) Séchage - (2) Broyage - (3) Poudre (4) Conservation (photos originales )

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Extraction

L'extraction est effectuée par la méthode de macération qui est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire « solide », et un solvant d'extraction « liquide » à température ambiante (**Herzi, 2013**).

Afin d'extraire les composés actifs de la plante étudiée (feuilles de *Marrubium*) on a utilisé trois solvants de polarités différentes : l'éthanol, le méthanol et l'acétone (**Annexe 03**) . Nous avons opté pour le protocole décrit par **Romani et al., (2006)**. Une quantité de 10 g de la poudre de *Marrubium* est macérée à température ambiante pendant 24 heures avec 100 mL de solvants.

Cette macération est répétée cinq fois jusqu'à épuisement de la poudre avec filtration et renouvellement du solvant à chaque fois.

Les filtrats sont ensuite récupérés et évaporés dans la hotte pour éliminer le maximum du solvant, puis laissés se sécher à l'étuve (**Annexe 03**) à 40°C. Nous avons obtenu une série de trois extraits (EA, EM, EE) qui sont pesés afin de déterminer leurs rendements. Ce dernier est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement Ext \%} = [(P1 - P0) / E] \times 100$$

Sachant que :

**Rendement Ext %** : Rendement d'extraction en pourcentage ;

**P0** : Poids de cristalliseur vide en gramme ;

**P1** : Poids de cristalliseur après évaporation en gramme ;

**E** : Poids de l'échantillon en gramme.

## II.2.2. Analyses phytochimiques

Afin de vérifier la présence ou l'absence des composés chimiques les plus importants dans les extraits de la plante, on a effectué quelques tests sur les trois extraits : acétonique, éthanolique et méthanolique. Dans le but de rechercher des molécules responsables des activités biologiques intéressantes, il est préférable de déterminer la composition chimique des extraits végétaux. Une étude phytochimique sera menée afin de détecter les classes des composés que contient la plante étudiée. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité (**Bouterfas et al., 2014**).

### II.2.2.1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) (**Boizot et al., 2006**). Un volume de 200 µL d'extrait (échantillon) est mélangé avec 1 mL du réactif FC et 800 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 75 g/L dans l'eau distillée. Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant une heure et l'absorbance est mesurée à 765 nm par un spectrophotomètre UV. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/g

de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (25-100µg/mL).

**N.B :**

Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.

Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par 0.2 mL du méthanol + 1mL de Folin-Ciocalteu + 0.8 mL de carbonate de sodium.

### II.2.2.2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée par spectrophotométrie (**Annexe 03**) selon **Djeridane et al., (2006)**, en utilisant une méthode basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, ayant le maximum d'absorbance à 430 nm. La Quercétine a été utilisée comme standard pour construire la courbe d'étalonnage.

Un volume de 1 mL d'échantillon a été mélangé séparément avec 1 mL d'une solution éthanolique de chlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) à 2 %. Après incubation à température ambiante pendant 10 min, l'absorbance du mélange réactionnel a été mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis et la teneur en flavonoïdes a été exprimée en mg par g d'équivalent quercétine.

**N.B:**

Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.

Un blanc a été préparé en remplaçant le  $AlCl_3$  par 1 mL de méthanol +1mL d'extrait.

### II.2.2.3 Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère. Les quantités des tanins sont estimées en utilisant la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto 1985**.

Une concentration de 1000µg/mL a été testée pour les trois extraits.

Un volume de 500  $\mu\text{L}$  de l'extrait est ajouté à 3000  $\mu\text{L}$  de la solution vanilline/méthanol (4%, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 1500  $\mu\text{L}$  de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) à 37% est additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à la température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 500 nm.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif.

Trois essais ont été effectués pour chaque échantillon.

Le Blanc : est préparé dans les mêmes conditions que l'échantillon (500 $\mu\text{L}$  méthanol+ 3mL vanilline+1,5 mL HCl).

Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g) (**Price et al., 1978**).

### II.2.3. Évaluation de l'activité antioxydante

#### II.2.3.1 Méthode de réduction des radicaux libres DPPH\*

L'effet anti-radicalaire des échantillons est évalué *in vitro* par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle) décrite par **Ohinishi et al., (1994)**.

La solution du DPPH ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ ) est solubilisée dans le méthanol pour en obtenir une solution de 0.1 mM. (**Annexe 03**)

Dans des tubes secs, des volumes de 1 mL de chaque solution de notre échantillon à différents concentrations (0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sont ajoutés à 1 mL de la solution méthanoïque du DPPH\*.

Parallèlement, un contrôle positif est préparé en mélangeant 1 mL de méthanol avec 1 mL de la solution méthanoïque de DPPH\*. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement et ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est faite à 517 nm par un spectrophotomètre UV Visible. (**Annexe 03**)

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus par l'acide ascorbique et Butyl Hydroxy Anisol (BHA) pris comme antioxydants standards, et pour chaque concentration, le teste est répété 3 fois. (Ohinishi *et al.*, 1994).

L'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage été calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs blanc}} \times 100$$

Sachant que :

**Abs blanc** : Absorbance du contrôle (DPPH+méthanol).

**Abs échantillon** : Absorbance de l'échantillon

### II.2.3.2 Méthode de réduction des radicaux-cation ABTS<sup>•+</sup>

L'activité anti radicalaire est également évaluée par le test de décoloration du radical cation ABTS<sup>•+</sup>. Selon la technique utilisée par Harrouche *et al.*, (2019).

L'ABTS est dissous dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM. La solution du radical cation ABTS<sup>•+</sup> est obtenue en incubant (Annexe 03), pendant 16 h à l'obscurité et à la température ambiante, un mélange à volumes égaux de la solution mère d'ABTS avec une solution persulfate de potassium à 2,45mM (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) dissous dans l'eau distillée (Harrouche *et al.*, 2019).

La solution ABTS<sup>•+</sup> est diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de 0,700±0,02 à 734 nm avant l'utilisation. Ensuite, 1,9 mL de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> est mélangé avec 100 µL de chaque extrait ou du standard (acide ascorbique et le trolox) à différentes concentration (0-150 µg/mL). Les absorbances sont mesurées à 734 nm après une incubation de 10 min à l'obscurité et à la température ambiante. Trois essais sont effectués pour chaque concentration testée et les résultats exprimés en pourcentage d'inhibition (Harrouche *et al.*, 2019).

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs blanc}} \times 100$$

Sachant que :

**Abs blanc** : Absorbance du contrôle (ABTS + méthanol).

**Abs échantillon** : Absorbance de l'échantillon

### II.2.3.3 Méthode de réduction du fer FRAP

La détermination du pouvoir réducteur de produit est réalisée selon la méthode décrite par **Chew et al., (2009)**. Ce test est basé sur la réduction des ion ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) qui sont présents dans le composé  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en ions ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ), en présence d'un antioxydant qui possède le pouvoir de céder des électrons.

Le test FRAP a été réalisé selon la procédure de **Benzie et Strain., (1996)**. En bref, le réactif FRAP a été préparé à partir de tampon acétate de sodum à 300 mM (pH 3,6), solution TPTZ) à 10 mM dans 40 mM de HCl et 20 mM de solution de chlorure de fer (III) dans des proportions de 10 :1 :1 (v/v), respectivement. La solution de FRAP a été préparée par le Mélange de 25 mL du tampon + 2.5 mL de la solution TPTZ + 2.5 mL de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à l'obscurité (Agitation à 37°C).

Un volume de 150  $\mu\text{L}$  d'échantillon a été ajouté à 2850  $\mu\text{l}$  du réactif FRAP. L'absorbance du mélange réactionnel a ensuite été enregistrée à 593 nm après 30 min d'incubation. La courbe standard était construite avec une solution de l'acide ascorbique selon une série de concentrations **de 12,5 à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$** )

Les résultats sont exprimés par milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de l'échantillon (mg EAA/g E).

## II.2.4. Évaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait de *Marrubium vulgare* peut être réalisée en utilisant la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu liquide, également connue sous le nom de méthode de dilution par des microplaques.

### II.2.4.1 Souches bactériennes testées

Le matériel microbiologique utilisé dans cette étude constituée de 2 souches bactériennes. Ce sont des bactéries à Gram positif et à Gram négatif pathogènes pour l'Homme, dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques.

### II.2.4.2 Préparation des suspensions bactériennes

À partir de cultures jeunes des différentes souches, on prélève quelques colonies isolées et identifiées sur le milieu de culture à l'aide d'un écouvillon puis le décharger dans un tube de 10 ml de l'eau physiologique stérile (NaCl 0.9%). La suspension bactérienne a été bien agitée à l'aide d'un vortex. L'opacité de ces suspensions est équivalente à 0.5 Mc Farland.

### II.2.4.3 Préparation des solutions mères

#### Échantillon

Préparation d'une concentration de 10 mg/mL de l'extrait acétone dans 1 mL de diméthyle sulfoxyde (DMSO) et 4 mL d'eau distillée, et le solubiliser pour avoir une teneur de 20% de DMSO.

### II.2.4.4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible à l'œil nu, après un temps d'incubation de 18 à 24h (Martini, 1998). La méthode de micro-dilution en milieu liquide (BMH) (Annexe 02) a été utilisée dans des microplaques à 96 puits (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12).

- Préparation de la microplaque

Afin d'obtenir des concentrations décroissantes de l'extrait acétonique, Une série de dilution selon une progression géométrique  $\frac{1}{2}$  a été effectuée (1000-31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Un volume de 180  $\mu\text{L}$  de BMH (**Annexe 02**) a été placé dans le premier puits de la microplaque, 20  $\mu\text{L}$  d'une solution mère d'extrait acétone préparée (10  $\text{mg}/\text{mL}$  dans le DMSO 20%) ont été rajoutées. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  du contenu de la première cupule été prélevé puis déposé dans la cupule adjacente et ainsi de suite. À partir de l'inoculum standardisé à  $10^8$  UFC/mL, 50  $\mu\text{L}$  ont été déposés dans toutes les 96 cupules de la microplaque (sans dans celles correspondants aux témoins négatif). (**Annexe 03**)

Une rangée de cupules ne contenant que du MHB (sans bactéries) (**Annexe 02**) et une autre que de DMSO (2%) (Avec inoculum bactérien) sont utilisées comme étant des témoins négatifs.

Les microplaques sont ensuite incubées dans l'étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 h. Ensuite, La croissance bactérienne, si elle a lieu, se traduit par l'apparition d'un trouble dans le puits (croissance des germes étudiés).

Après la lecture de la CMI, et dans le but de déterminer la CMB, un écouvillon est imprégné dans les puits sans croissance visible à l'œil nu (extrait les plus actifs), ensuite l'ensemencement est fait en stries serrés de haut en bas sur une gélose des boites de pétri. Les boites sont incubées dans l'étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 h. Après l'incubation, la CMB correspond à la plus petite concentration qui ne donne aucune croissance bactérienne.

### II.3. Analyse statistique

Les courbes et les graphiques sont tracés par Microsoft Excel 2007. L'étude statistique est effectuée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 7.04. Les résultats des tests qui ont été effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. La signification statistique est déterminée par le test

ANOVA-oneway et les différences sont considérées statistiquement significatives au niveau de  $p \leq 0,05$ .

## CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans cette partie de notre travail, nous allons exposer tout d'abord l'ensemble des résultats obtenus dans les études phytochimiques, ensuite ceux relatifs aux activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Marrubium vulgare*

### III.1. Rendement d'extraction

On a obtenu, à partir des parties aériennes de la plante *M. vulgare*, trois extraits (acétone, méthanol et éthanol) en utilisant la technique de macération. À partir de 10 g de la poudre macérée dans chaque solvant, on a eu des résultats de rendements exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse initiale du matériel végétal.

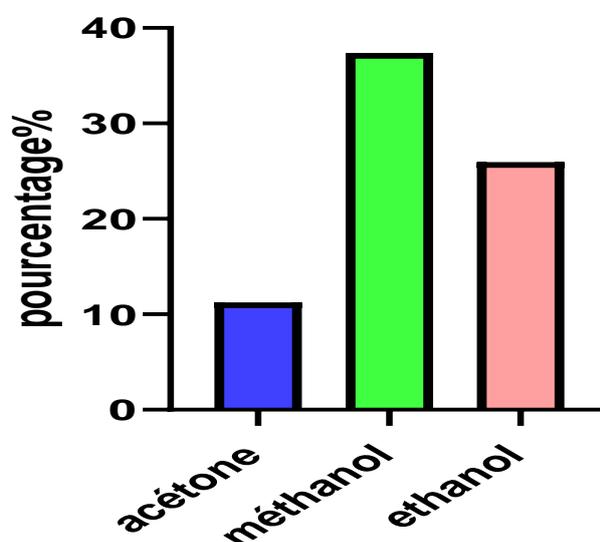


Figure 7-Rendement d'extraction.

Le rendement d'extraction est effectivement variable en fonction du solvant utilisé. À partir des résultats obtenus, l'extrait méthanolique a donné le rendement le plus élevé (37.82%) suivi par l'extrait éthanolique dont le rendement est égal à (25.96%) et enfin l'extrait acétonique qui a montré le rendement le plus faible (11.24%). Donc, la majeure partie des composés de l'extrait des feuilles de *Marrubium vulgare* se retrouvent dans l'extrait méthanolique.

Le rendement de l'extrait méthanolique obtenu dans notre étude est significativement supérieur à celui rapporté par **Shapaz et al., (2002)** qui était de 4,57%. D'autre part, l'étude de **Ghedadba et al., (2014)** a révélé un rendement d'extraction de 10,9% à partir d'échantillons de la région de Touffana, située à 52 km de la ville de Batna ; qui est inférieur à celui de la présente

étude. En outre, **Erdogan-Orhan et al., (2010)** ont réalisé une extraction par lixiviation à chaud en utilisant l'acétone comme solvant, résultant d'un rendement de 6,6%, également inférieur à celui obtenu dans notre étude (11,24%).

Notre extrait éthanolique présente une teneur plus élevée par rapport à celle rapportée par **Hameg et Taleb (2018)** dans la région Bouzeguene de la Wilaya de Tizi-Ouzou. Ces auteurs ont obtenu un rendement de 12% en utilisant une masse végétale de 10g. De plus, elle est également nettement supérieure à celle obtenue par **Boulila et al., (2015)** dans trois régions climatiques tunisiennes, qui ont enregistré un rendement de 8,9% en utilisant une masse végétale de 10g.

Il a été rapporté que l'utilisation de plusieurs solvants de polarités différentes permet d'obtenir le maximum de constituants chimiques des plantes (**Fleurentin et al., 1991**). Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux des autres études, car le rendement de l'extraction n'est que relatif et dépend de plusieurs facteurs à savoir les propriétés génétiques de la plante ainsi que l'origine géographique et les conditions de la récolte (**Lee et al., 2003**). Il est également influencé par la nature du solvant, la méthode d'extraction appliquée, la durée de macération, la vitesse d'agitation du matériel végétal dans le solvant, la température, la nature chimique de l'échantillon et la durée de séchage (**Koné et al., 2017**).

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

## III.2. Études phytochimiques

L'étude phytochimique vise à comprendre et avoir une idée de la quantité et de la qualité des composés secondaires que renferme la plante ou une partie de la plante ; dans notre cas, en s'est concentré sur la partie aérienne (feuilles) de plante de marrube blanc.

Afin d'analyser les extraits préparés à partir des feuilles de *Marrubium vulgare*, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes ainsi que des tanins condensés a été effectué.

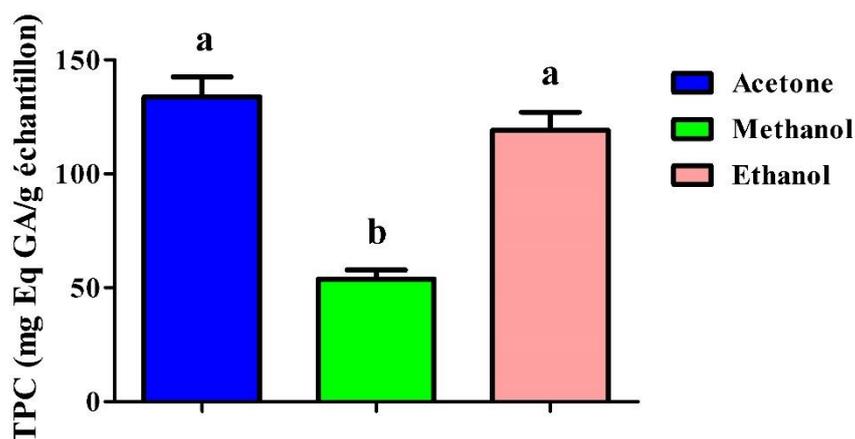
La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribuées (Li et al., 2007).

### III.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu a été utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols, qui est basée sur la réduction du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques en présence d'un milieu alcalin. Cette réaction conduit à la formation de produits de réduction de couleur bleue, permettant ainsi d'évaluer la quantité de polyphénols présents (Talbi et al., 2015).

Les teneurs en polyphénols qui correspondent à l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard (**Annexe 01**) et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait de la matière végétale sèche (mg EAG/gd'extrait), selon l'équation suivante :  $Abs = 0,0069 [AG] - 0,0174$  ;  $R^2 = 0,996$ . En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage présente une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisée dans la gamme d'étalonnage.

Après une heure d'incubation, une couleur bleue apparaît dans les trois extraits à des intensités variables et cela est dû à la présence des polyphénols. L'intensité de cette couleur, qui va du bleu clair au bleu foncé, est directement liée à la concentration en polyphénols et à leur capacité à réduire le réactif Folin-ciocalteu. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 8**.



**Figure 8-Teneur en polyphénols des extraits (EA, EM, EE)**

Pour chaque graphique, les valeurs suivies d'une lettre différente étaient significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type

Les résultats présentés dans la **Figure III-2** indiquent que les extraits acétonique et éthanolique de *Marrubium vulgare* sont les plus riches en polyphénols, avec  $133,72 \pm 8,86$  et  $119 \pm 8,08$  mg EAG/g ( $P > 0,05$ ), respectivement. Tandis que l'extrait méthanolique est le plus pauvre en polyphénols ( $P < 0,05$ ), avec une quantité de  $53,77 \pm 4,03$  mg EAG/g d'extrait.

L'étude menée par **Ghedadba et al., (2014)** a montré des résultats contradictoires par rapport à notre étude, indiquant que la concentration la plus élevée en polyphénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare*. Cette disparité de résultats peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que les variations climatiques régionales et les différences dans les méthodes d'extraction utilisées, qui peuvent influencer la composition chimique des extraits.

Dans une autre étude effectuée par **Mssillou et collaborateurs en 2021** sur la même plante récoltée au Maroc, les résultats ont indiqué que la teneur totale en polyphénols était plus élevée dans l'extrait acétonique ( $112,09$  mg EAG/g E) par rapport à l'extrait éthanolique qui a donné une valeur de  $98,77$  mg EAG/g E. Ces résultats concordent avec ceux de notre étude, notamment, avec des valeurs très proches. En effet, le contenu phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (environnement et stockage) (**Falleh et al., 2008**).

### III.2.2. Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) (Bosku *et al.*, 2004).

La teneur en flavonoïdes correspondant à l'extrait acétonique, éthanolique et méthanolique est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la Quercétine (Annexe 01) et les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent Quercétine par gramme d'extrait de la matière végétale sèche (mg EQ/gd'extrait), selon l'équation suivante :  $\text{Abs} = 0,0426 [\text{Q}] + 0,0263$  ;  $\text{R}^2=0,998$ .

Après l'addition de la solution de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). Une coloration jaunâtre se forme dans les trois extraits. Cette coloration indique la présence de flavonoïdes dans les extraits analysés, et son intensité varie en fonction de la concentration en flavonoïdes de chaque extrait. Cette coloration est le résultat de la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les flavonoïdes. Les résultats du dosage des flavonoïdes sont présentés dans la Figure 9.

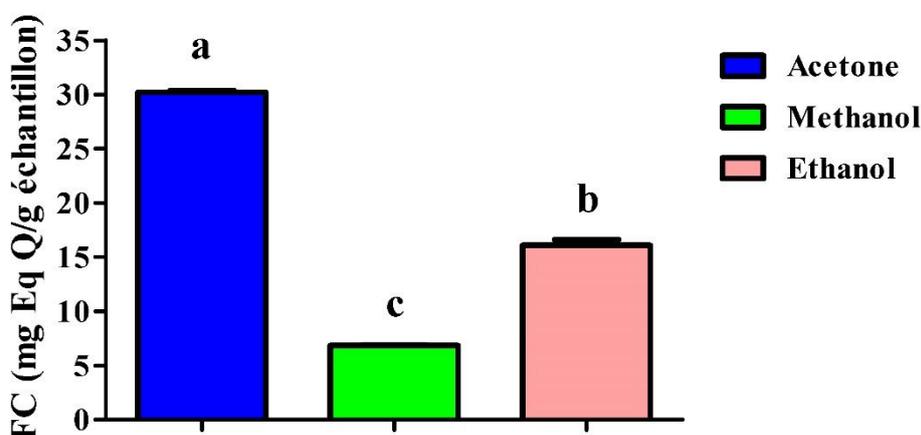


Figure 9-Teneur en flavonoïdes des extraits (EA, EM, EE).

Pour chaque graphique, les valeurs suivies d'une lettre différente étaient significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type

La teneur la plus élevée des flavonoïdes a été obtenue dans l'extrait acétonique ( $30.21 \pm 0.12$  mg EQ/g E), suivie de l'extrait éthanolique ( $16.83 \pm 0.50$  mg EQ/g E). Cependant, seulement  $6.83 \pm 0.04$  mg EQ/g E sont trouvés dans l'extrait méthanolique. Cela montre que la

teneur en flavonoïdes varie significativement selon les différents extraits utilisés. Les différences sont toutes significatives ( $p < 0.05$ ).

Dans leur étude **Ghedadba et al., (2014)**, ont trouvé la teneur en flavonoïdes de 18 mg EQ/g d'extraits pour les extraits méthanolique. Ces résultats sont supérieurs aux résultats qu'on a trouvés pour le même extrait ( $6.83 \pm 0.04$  mg EQ/g E). Ceci peut être attribué à plusieurs facteurs. Dans l'étude de **Mssillou et collaborateurs (2021)**, l'extrait acétonique a donné la concentration la plus élevée que l'extrait éthanolique avec des valeurs de 21.08 mg EQ/g extrait et 17.65 mg EQ/g d'extrait, respectivement. Ce qui est en accord avec nos résultats.

### III.2.3. Teneur en tanins condensés

La teneur des tanins condensés a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des concentrations croissantes de catéchine (**Annexe 01**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g) selon l'équation suivante :  $Abs = 0,0024 [C] + 0,0386$  ;  $R^2 = 0,992$ . Après l'addition de la solution de vanilline, une couleur rose qui se forme dans le mélange révèle la présence des tanins. Néanmoins, dans la présente étude, on n'a pas eu cette couleur ; ce qui indique l'absence de tanins dans les extraits testés. En l'occurrence, l'étude de **Ghedadba et al., (2014)** a rapporté des teneurs plus élevées dans l'extrait éthanolique par rapport à l'extrait méthanolique faiblement riche en tanins.

Nous pouvons alors conclure que l'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires. Et leurs teneurs 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, les conditions culturelles, climatiques, pédologiques ou le stress de prédation (**Mahmoudi et al., 2013**).

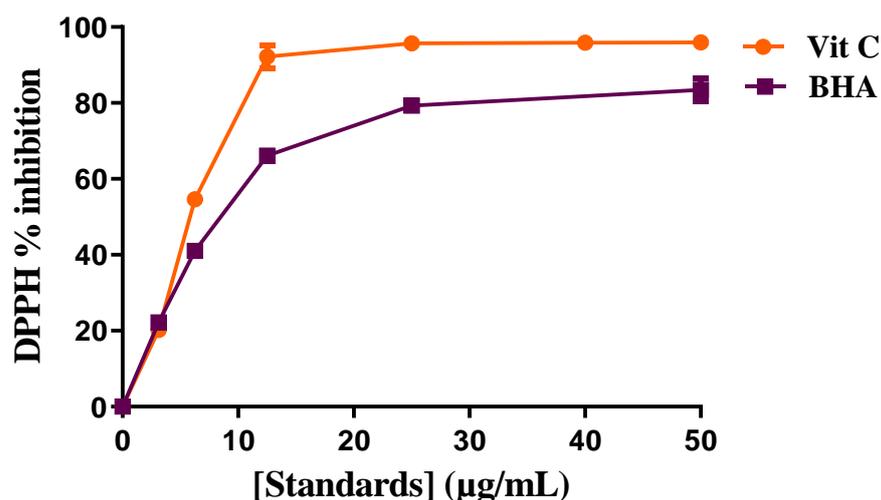
### III.3. Évaluation de l'activité antioxydante

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable évaluant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (**Cao et al., 1998**). Dans ce présent travail, l'activité antioxydante des extraits de *Marrubium vulgare* a été évaluée *in vitro* par différentes méthodes : le test du DPPH, ABTS et FRAP ; ce qui nous a permis de mieux étudier l'effet antioxydant.

### III.3.1. Inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup>

Le DPPH<sup>\*</sup> (diphényl picrylhydrazyl) est un radical libre organique, habituellement utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité anti-radicalaire des antioxydants (**Hidayat et al., 2017**). Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH<sup>\*</sup> en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène. La forme non radicalaire est ainsi formée (**Bortolomeazzi et al., 2007**). Au cours du dosage, une dégradation de la couleur de la solution DPPH<sup>\*</sup>, en présence de l'échantillon ou de la référence (acide ascorbique et la BHA), peut être suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à une longueur d'onde 517 nm.

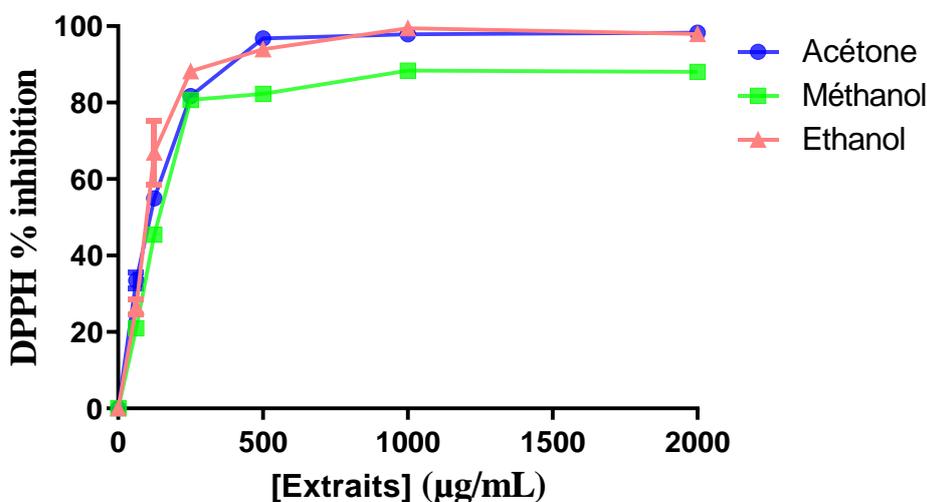
En calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant, on a tracé la courbe, qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait ou de standard, cela permet de déterminer l'IC<sub>50</sub>, qui est inversement lié à la capacité antioxydante, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Cela veut dire que plus l'IC<sub>50</sub> est faible, plus l'antioxydant est puissant. La **Figure 10** représente les pourcentages d'inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup> par les standards utilisés, l'acide ascorbique (Vit C) et la BHA.



**Figure 10-**Pourcentages d'inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup> par les standards, la Vit C et la BHA.

Les résultats indiquent que la vitamine C présente une activité antioxydante plus puissante que la BHA dans le test DPPH. À une concentration de 25 µg/mL, la vitamine C a montré un taux d'inhibition maximal d'environ ( $95.98 \pm 3.10\%$ ). En revanche, la BHA a atteint un taux d'inhibition maximal d'environ ( $83.49 \pm 2.29\%$ ). De plus, la concentration inhibitrice 50% (IC50), qui représente la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité du radical DPPH', était de l'ordre de  $5.47 \pm 0.16$  µg/mL pour la vitamine C et de  $6.03 \pm 0.13$  µg/mL pour la BHA. Cela indique que la vitamine C a une concentration inhibitrice (50%) plus faible ( $P < 0.05$ ), ce qui suggère une plus grande efficacité dans la neutralisation du radical DPPH' par rapport à la BHA.

Après 30 min d'incubation de la solution DPPH'-extrait (à différentes concentrations), la coloration violette vire vers une coloration jaune pour les 03 extraits, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH', ce qui montre que les échantillons ont un effet de piégeage du radical DPPH'. Les résultats du pouvoir anti-radicalaire par le DPPH' des différents extraits de *Marrubium vulgare* sont illustrés dans la **Figure 11**



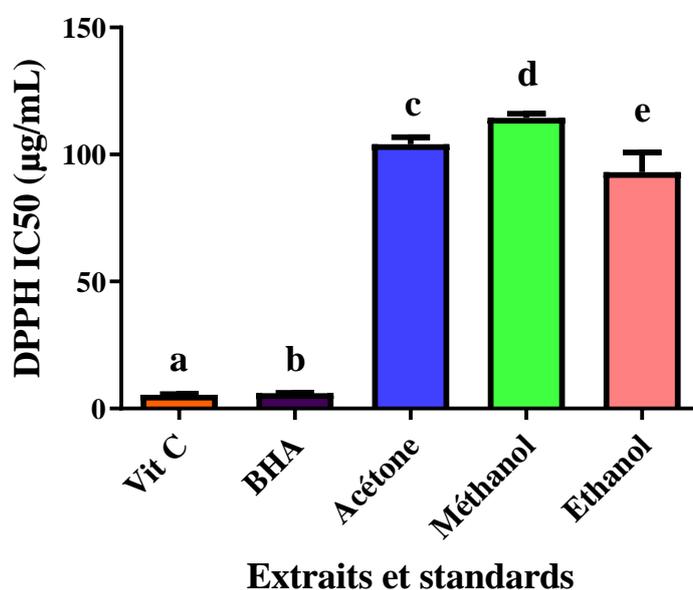
**Figure 11-Pourcentages d'inhibition du radical DPPH' par les extraits**

La **Figure 11** présente les pourcentages d'inhibition du radical DPPH' obtenus par les différents extraits du *Marrubium vulgare* à des concentrations allant de 62,5 à 2000 µg/mL. On peut observer que l'activité anti-radicalaire des extraits évolue en fonction de l'augmentation des concentrations, et que le pourcentage d'inhibition augmente progressivement. Les résultats indiquent qu'à concentration de 2 mg/mL l'extrait éthanolique présente le plus haut pourcentage

d'inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup>, avec un taux de  $97,93 \pm 1.13\%$ . Il est suivi par l'extrait acétonique avec un pourcentage d'inhibition de  $96,79 \pm 0.54\%$ , et enfin l'extrait méthanolique avec un pourcentage d'inhibition de  $88,03 \pm 0.23\%$ . Ces valeurs sont toutes statistiquement significatives ( $p < 0.05$ ).

Ces résultats démontrent que l'extrait éthanolique est le plus efficace parmi les extraits testés pour réduire le radical DPPH<sup>\*</sup>, suivi de près par l'extrait acétonique. L'extrait méthanolique présente également une activité antioxydante significative, bien que légèrement moins efficace que les deux autres extraits.

Les résultats d'IC<sub>50</sub> du radical de DPPH<sup>\*</sup> sont illustrés dans la **Figure 12**



**Figure 12-Valeurs des IC<sub>50</sub> de Vit C, BHA et les extraits EA, EE, EM**

Pour chaque graphique, les valeurs suivies d'une lettre différente étaient significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type

D'après la **Figure 12**, les IC<sub>50</sub> de l'extrait éthanolique, acétonique et méthanolique sont de l'ordre de :  $94.10 \pm 7.43$ ,  $111.4 \pm 2.62$  et  $115.7 \pm 1.50$  µg/mL ; respectivement. En comparant les IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique et de la BHA avec ceux des extraits, on constate que les IC<sub>50</sub> des extraits sont nettement plus élevés. Cela signifie que les extraits nécessitent des concentrations plus importantes pour inhiber 50% du radical DPPH<sup>\*</sup> par rapport à l'acide

ascorbique et à la BHA. Par conséquent, cela suggère que les extraits ont une activité anti-radicalaire relativement faible.

L'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* présente une activité antioxydante faible en ce qui concerne le piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>, avec un IC50 de  $115,7 \pm 1.50 \mu\text{g/mL}$  ( $P < 0.05$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude **d'Orhan et al., 2010**, qui affirme que l'extrait méthanolique est moins actif que l'extrait acétonique de la même plante. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec l'étude de **Pukalskas et al., 2012**, qui a démontré que l'extrait méthanolique de *Marrubium vulgare* de Pologne présentait une activité antioxydante remarquable dans la neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup>.

L'extrait éthanolique présente une meilleure activité antioxydante dans la neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup> ( $P < 0.05$ ) avec un IC50 de  $94.10 \pm 7.43 \mu\text{g/mL}$ , ce qui est en parfaite concordance avec les résultats de **Hayat et al., (2020)** qui ont prouvé que cet extrait de *Marrubium vulgare* de deux différentes localités du nord-est du Maroc s'est avéré avoir une activité antioxydante remarquable dans la neutralisation du radical DPPH<sup>•</sup>.

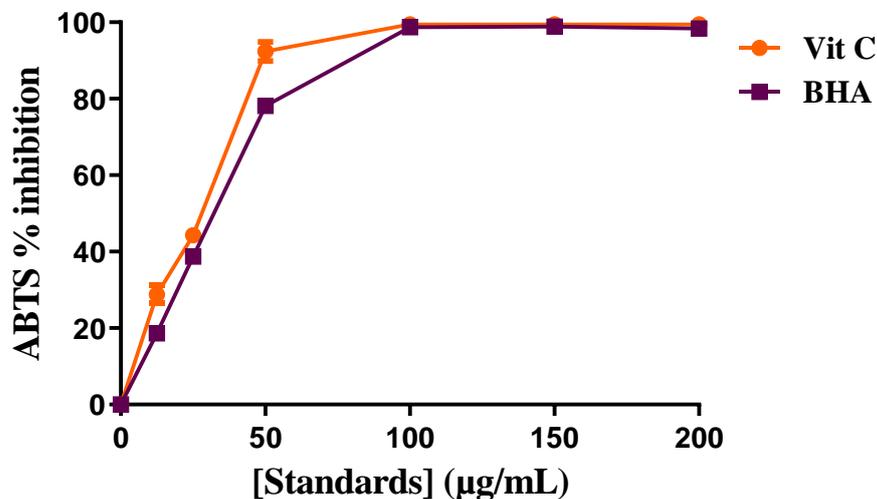
On pourrait conclure que la différence de l'activité antioxydante observée entre ces différentes études peut être expliquée par la variabilité des emplacements (**Boulila et al., 2015**), le moment de récolte des feuilles et la composition en différents composés phénoliques (La réduction du DPPH<sup>•</sup> n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais à l'interaction entre plusieurs composés) (**Hayat et al., 2020**).

### III.3.2. Réduction du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>

L'inhibition du radical cationique ABTS<sup>•+</sup> a été évaluée pour tester l'activité antioxydante des extraits de la plante. L'ABTS<sup>•+</sup> réagit avec l'antioxydant et passe de la couleur bleu-vert à un état incolore. Cette transformation est suivie par la mesure de l'absorbance à 734 nm et la détermination de la concentration inhibitrice des trois extraits (EA, EE, EM) en comparaison avec un antioxydant standard.

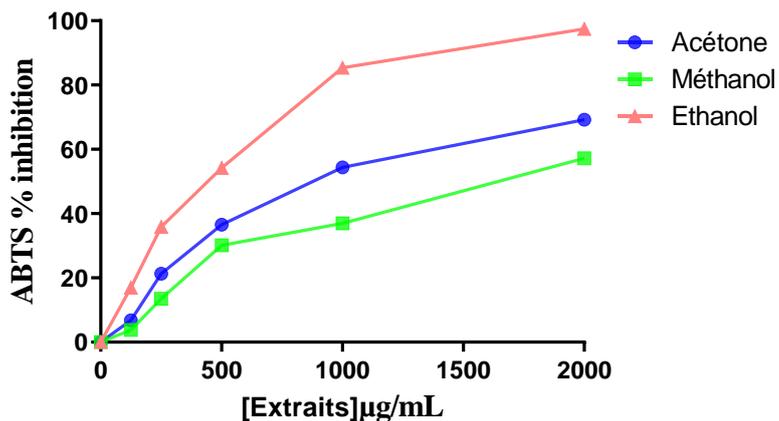
La courbe d'étalonnage obtenue par le Trolox traduit le pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> en fonction des différentes concentrations allant de 0,025 à 0,3mM présenté dans **l'annexe 01**.

Le pourcentage d'inhibition maximal du radical  $ABTS^{\bullet+}$  par la vit C est de  $99.49 \pm 5.32\%$  et par la BHA est de  $98.38 \pm 1.38$  à une concentration de  $150 \mu\text{g/mL}$ , représenté dans la **Figure 13**.



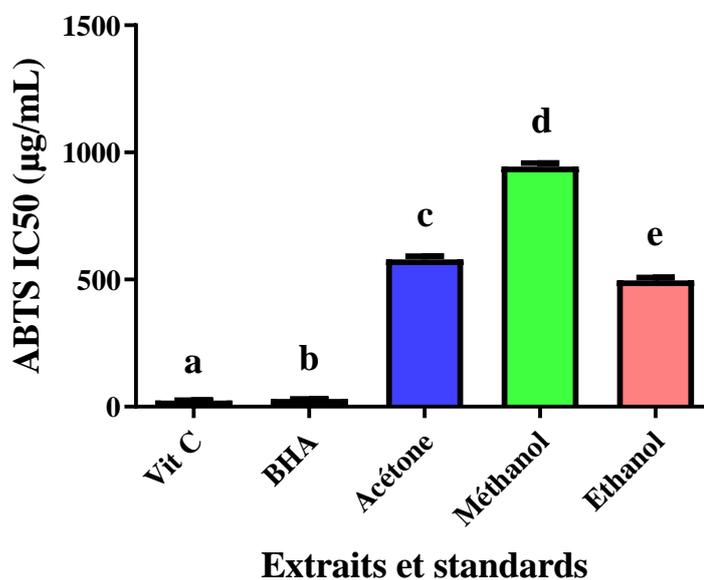
**Figure 13-Pourcentage d'inhibition de radical  $ABTS^{\bullet+}$  en présence de Vit C et BHA**

D'après les données expérimentales obtenues, on remarque que le taux d'inhibition du radical  $ABTS^{\bullet+}$  augmente en fonction de la concentration des extraits. Pour la concentration de  $2 \text{ mg/mL}$  d'extrait, le pourcentage d'inhibition est de  $97,44 \pm 0.22\%$  pour l'extrait éthanolique,  $50,20 \pm 0.10\%$  pour l'extrait acétonique et  $45,22 \pm 0.26\%$  pour l'extrait méthanolique et sont statistiquement significatifs ( $P < 0,05$ ).



**Figure 14-**Pourcentage d'inhibition du radical ABTS•+ des extraits EA, EE et EM.

D'après la **Figure 14**, l'IC<sub>50</sub> obtenu avec la Vit C est de  $24.92 \pm 1.32$  µg/mL et par la BHA est de  $30.23 \pm 0.54$  µg/mL. Et celles obtenues avec les extraits de *M. vulgare* sont de  $496,9 \pm 11.56$  µg/mL pour l'extrait éthanolique,  $578,4 \pm 12.34$  µg/mL pour l'extrait acétonique et de  $944,5 \pm 14.22$  µg/mL pour l'extrait méthanolique



**Figure 15-**Valeurs des IC<sub>50</sub> des standards et des extraits EA, EE et EM.

Pour chaque graphique, les valeurs suivies d'une lettre différente étaient significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type.

En comparant avec l'IC50 de l'acide ascorbique et la BHA, on remarque qu'elles sont nettement très inférieures par rapport à celles des extraits, ce qui indique que la capacité de piégeage des radicaux libres affiché par ces extraits est très faible que les standards.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Hayat et al., (2020)**, qui ont montré que l'extrait éthanolique est le plus actif par rapport à l'extrait méthanolique.

### III.3.3. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

C'est un test rapide, reproductible et facile à exécuter pour évaluer l'activité antioxydante. Il exprime la capacité d'un composé à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$ . Cette réaction se manifeste par le changement de la couleur du milieu réactionnel du jaune au bleu mesurable à 593 nm. Donc, une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (**Bentabet et al., 2014**). Dans cette étude, l'acide ascorbique est servi pour obtenir la courbe d'étalonnage (**Annexe 01**), qui a l'équation suivante :  $Abs = 0,0156 [Vit C] - 0,0375$  ;  $R^2 = 0,995$

Les résultats des composés réducteurs (antioxydants) dans nos échantillons sont exprimés en mg EAA/g E, illustrés dans la **Figure 16**.

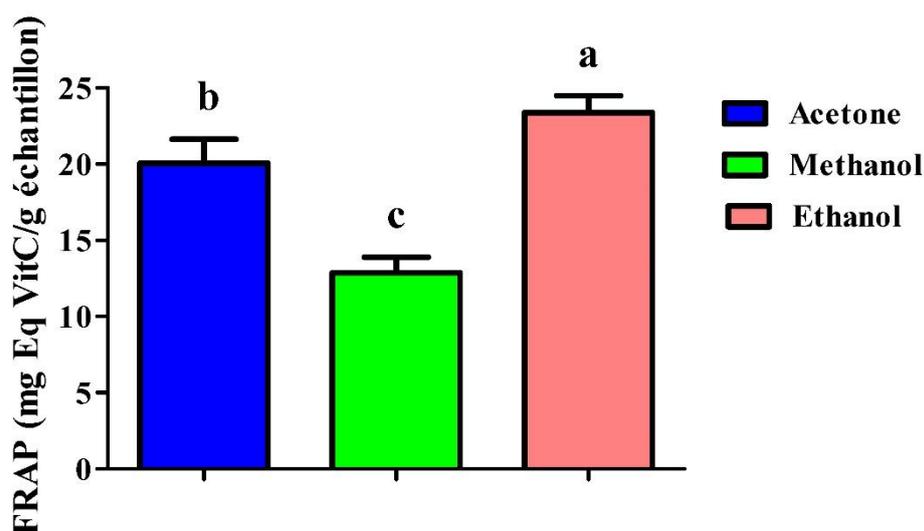


Figure 16-Pouvoir réducteur de EE, EA, EM comparativement au vit C

Pour chaque graphique, les valeurs suivies d'une lettre différente étaient significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type

Les résultats obtenus nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits et des standards utilisés. D'après la **Figure 16**, le pouvoir réducteur des extraits EE, EA et EM sont de l'ordre de :  $23,37 \pm 1,11$ ,  $20,05 \pm 1,57$  et  $12,86 \pm 1,02$  mg EAA/gE, respectivement ; dont la différence est statistiquement significative ( $P < 0,05$ ). Ces valeurs sont toutefois, nettement loin de celles obtenues avec le standard, la Vit C.

Dans l'étude de **Mssillou et collaborateurs (2021)**, l'extrait éthanolique a donné un pouvoir réducteur plus élevé que l'extrait d'acétone ce qui est en accord avec nos résultats. La différence du pouvoir réducteur de fer d'un extrait à l'autre peut être due à la différence de composition chimique et de teneur en composé phénoliques (**Sudan et al., 2014**).

### III.4. Activité antibactérienne

Le pouvoir antibactérien de l'extrait acétonique de *Marrubium vulgare* a été déterminé par la méthode de dilution sur microplaques et la méthode d'ensemencement sur un milieu gélosé en utilisant deux souches bactériennes à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et négatif (*Escherichia coli*). Le solvant dilué (DMSO 1%) a été utilisé comme témoin négatif.

#### III.4.1. Résultats des CMI

Les résultats obtenus indiquent la présence d'un trouble dans tous les puits, ce qui suggère une croissance des germes étudiés. Cela signifie que l'extrait de la plante n'a montré aucune activité inhibitrice contre les souches utilisées à une concentration maximale de 1 mg/mL. De même, le control négatif (DMSO 2%) n'a pas eu un effet sur les bactéries.

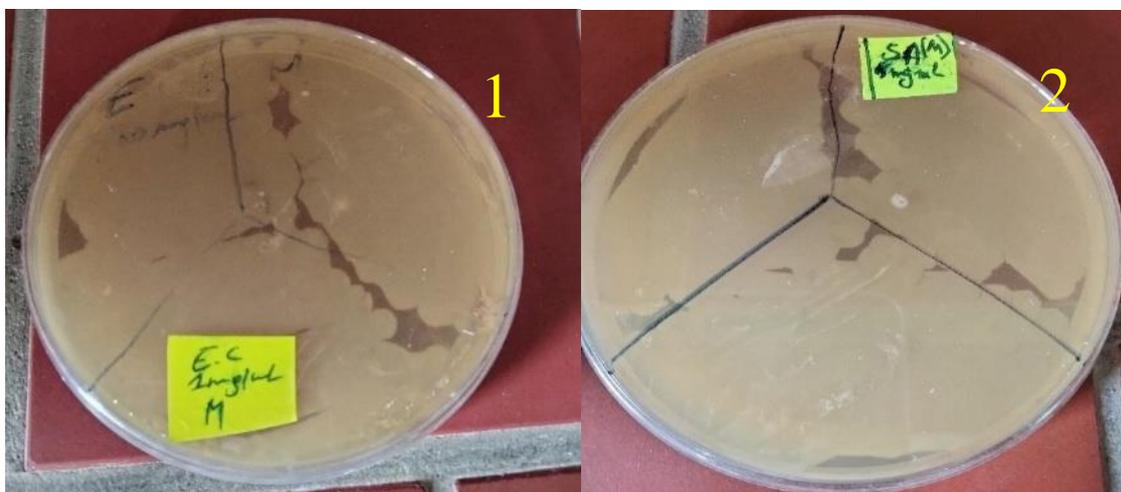
Cette observation confirme l'absence d'activité antibactérienne de l'extrait de la plante. Toutefois, des tests de sensibilité aux antibiotiques n'ont pas été réalisés dans la présente étude pour déterminer si les souches sont sensibles ou résistantes aux antibiotiques.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ghedadba et al., (2014)**, où l'extrait acétonique de *Marrubium vulgare* n'a montré aucune activité contre les mêmes deux souches utilisées dans notre étude, à une concentration allant jusqu'à 1000  $\mu\text{g/mL}$ . De même, dans

l'étude de **Mssillou et al., (2021)**, l'extrait acétonique de cette plante n'a montré aucun effet inhibiteur contre *S. aureus*.

On pourrait conclure alors que l'extrait acétonique de *Marrubium vulgare* ne possède pas d'activité inhibitrice contre les souches testées.

Afin de confirmer les résultats et mettre en évidence la croissance bactérienne, nous avons choisi de réaliser un ensemencement à partir du premier puits où un léger trouble était observé par rapport aux puits à concentrations les plus faibles, où la turbidité était plus évidente. Les résultats sont exprimés dans la **Figure 17**.



**Figure 17-Résultats d'ensemencement pour chaque souche bactérienne. (1 : *E. coli*, 2 : *S. aureus***

En effet, l'extrait acétonique ne présente pas d'effet bactéricide avec la concentration testée sur l'ensemble des souches. Cette observation confirme l'absence d'activité antimicrobienne dans l'extrait testé, ce qui indique peut-être qu'il faut tester des entités chimiques isolées de l'extrait pour avoir un effet antibactérien.

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

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales sont la source idéale de composés actifs, c'est pourquoi elles sont largement utilisées dans l'industrie pharmaceutique. Parmi ces composés les plus intéressants et les plus étudiés: les polyphénols. Dans cette étude, le profil en polyphénols, ainsi que les activités antioxydante et antibactérienne des extraits de la plante *Marrubium vulgare*, récoltée de la région de Draa El Gaide Kherrata sont évolués.

L'étude phytochimique de cette plante a révélé la présence de flavonoïdes et l'absence des tanins, dans les extraits de la plante. L'évaluation des polyphénols totaux par la méthode Folin-ciocalteu a exhibé la présence de la plus grande quantité dans l'extrait acétonique et le même extrait a montré la teneur la plus élevée en flavonoïdes, tandis que les trois extraits éthanolique, acétonique et méthanolique sont dépourvus en tanins. Par contre, la capacité antioxydante a montré que l'extrait éthanolique a été le plus actif quel que soit le test utilisé (DPPH/ ABTS/ FRAP). En outre, l'extrait acétonique n'a montré aucun effet contre les différentes souches bactériennes testées.

En perspective. Cette étude n'est qu'une ébauche d'un travail qu'il faut poursuivre, étendre et approfondir afin de :

- Connaitre tous les biens faits que cette plante peut nous apporter.
- Identifier les constituants actifs, responsables de l'activité antioxydante de *M. vulgare*
- Refaire l'activité antibactérienne en effectuant des tests sur les fractions ou composés isolés, et approfondir les recherches sur une large gamme de souches microbiennes.
- Faire l'étude de toxicité *in vivo*.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Références Bibliographiques

### A

- Abdallah R, Frikha D, Sassi Sm. évaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines in vitro evaluation of the antibacterial and antifungal activities of marine algae. Journal de l'Information Médicale de Sfax. 2019 Feb :38.
- Abu-Lafi S, Al-Natsheh MS, Yaghmoor R, Al-Rimawi F. Enrichment of phenolic compounds from olive mill wastewater and in vitro evaluation of their antimicrobial activities. Evidence-Based Complementary and Alternative medicine. 2017 Dec 28.
- Amessis-Ouchemoukh N, Abu-Reidah IM, Quirantes-Piné R, Madani K, Segura-Carretero A. Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of Marrubium vulgare (horehound) leaves of plants growing in Algeria. Industrial Crops and Products. 2014 Nov 1; 61:120-9.
- Aouadhi S. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle. Étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Thèse magistère : toxicologie. TUNIS : Faculté de médecine.2010 : 196.
- APG III, An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants, botanical journal of the linnean society, 2009,161: 105-21.
- Aquaron M. Relation entre l'homme et les plantes médicinales, 2005.
- Avissar N, Whitin C, Allen P Z. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*; 1989, 2: 15850-55.

### B

- Bellakhdar J. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. 1997.
- Bentabet N., Boucherit-Otmani Z. & Boucherit K., 2014: Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de béchar en algérie. *Phytothérapie* 12, 364 – 71.

- Benzie I F F. & Strain J J. 1996. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996,239 : 70–76.
- Blockbuster Phytomedicine; Marrubium vulgare L. Herb. More of a myth than a reality?” *Phytotherapy Research* 2016, vol. 30, no. 10, pp. 1551–58.
- Bortolomeazzi R, Sebastianutto N, Toniolo R, Pizzariello A. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry*. 2007 Jan 1;100(4):1481-9.
- Boskou G, Fotini NS, Stavroula C, Anastasia M, Antonia C, Nikolaos KA. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Lab Food Chem-Biochem-Phys Chem, Dep Sci Diet-Nutr, Harokopio Univ*. 2004 Jul 16 ;14(12) :17-22.
- Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*. 2006 :79-82.
- Bonnier G. La grande flore en couleur. Édition Belin. Tomes 1-2-3-4, Paris, France, 1 401 p; 1990.
- 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*. 2012 Mar 1;83(2):286-92.
- Boudjelal A. *Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (Ajuga iva, Artemisia herba alba et Marrubium vulgare) de la région de M'Sila, Algérie* (Doctoral dissertation, Université de Annaba-Badji Mokhtar).
- Boukef MK. Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Agence de coopération culturelle et technique ; 1986.
- Boulila A, Sanaa A, Salem IB, Rokbeni N, M'rabet Y, Hosni K, Fernandez X. Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of Marrubium vulgare L. (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*. 2015 Dec 15; 76:616-22.
- Boullard, B. (2001). Plantes médicinales du monde. *Editions Estem*, pp 340-341.
- Bourgou S, Ksouri R, Bellila A, Skandrani I, Falleh H, Marzouk B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian Nigella sativa L. shoots and roots. *Comptes Rendus Biologies*. 2008 Jan 1 ;331(1) :48-55.

- Bouterfas K, Mehdadi Z, Benmansour D, Khaled MB, Bouterfas M, Latreche A. Optimization of extraction conditions of some phenolic compounds from white horehound (*Marrubium vulgare* L.) leaves. *International Journal of Organic Chemistry*. 2014 Dec 13;4(05):292-308.
- Bouzourene S, Bourkache S. *Etude phytochimique du marrube blanc (Marrubium Vulgare. L)* (Doctoral dissertation, UMMTO).
- Brand-Williams W., Cuvelier M E., Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. (28) : 25-30.
- Bruneton J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3ème éd. Lavoisier, Paris. 1999 ;1120.

## Ƨ

- Campbell NA, Reece JB. *La biologie*. San Francisco: Pearson Education Inc. 2002.
- Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical chemistry*. 1998 Jun 1 ;44(6) :1309-15.
- Carnat A, Lamaison JL, Boudrie M. Intérêt taxonomique de la composition polyphénolique chez deux hybrides de prêles, *Equisetum x litorale* et *E. x moorei*, mise en évidence par chromatographie sur couche mince. *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*. 1991 Jan 1 ;138(2) :235-7.
- CCE., 2001 : Commission des Communautés Européennes : propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne. Bruxelles, vol 885.
- Chardon, H., Brugere, H. Usages des antibiotiques en élevage et filières viande. *Cahiers SÉCURITÉ SANITAIRE SANTÉ ANIMALE*. 2014.
- Chopra, R.N., Nayar, S.L. and Chopra, I.C., “Glossary of Indian medicinal plants (Including the supplement)”, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi 1986.
- Coolborn AF, Bolatito B. Antibacterial and phytochemical evaluation of three medicinal plants. *J Nat Prod*. 2010; 3 :27-34.

## Ƨ

- Djahra AB, Bordjiba O, Benkherara S. Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube. *Phytothérapie*. 2013 ;11 :348-52.
- Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiological research*. 2010 Aug 1;59(4).
- Durand D, Damon M, Gobert M. Le stress oxydant chez les animaux de rente : Principes généraux. *Cahiers de nutrition et de diététique* ; 2013,48 : 218-24.

*E*

- Elqaj M, Ahami A, Belghyti D. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique" ressources naturelles et antibiotiques". Maroc. 2007.

*F*

- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes rendus biologies*. 2008 May 1;331(5):372-79.
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Place des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin of the World Health Organization*. 1986 ;64(2) :159.
- Favier, A. Le Stress Oxydant. *L'actualité chimique* ; 2003 ,108.
- Filane E. Toumi H. Rôle des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'exercice Physique sur le métabolisme osseux. *Revue de rhumatisme* ; 2012 ,79 : 387-92.
- Fleurentin J., Cabalion P., Mazars G., Dos Santos J. & Younos C., *Ethnopharmacologie : Sources, Méthodes et Objectifs* 1991 : 201.
- Fontanay S, Mougenot ME, Duval RE. Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*. 2015 ;5(2) :109-18.

*G*

- 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*. 2014 ;12(1) :15-24.

- Ghedadba N, Hambaba L, Aberkane MC, Oueld-Mokhtar SM, Fercha N, Bousselsela H. Évaluation de l'activité hémostatique in vitro de l'extrait aqueux des feuilles de *Marrubium vulgare* L. *Algerian Journal of Natural Products*. 2014 ;2(2) :64-74.
- Goudable J. Favier, A. *Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme* ; 1997, 11(2) : 115–120.
- Guillou ML. *Escherichia coli* revisité, ami ou ennemi ? *Revue Francophone des Laboratoires*. 2016 Nov 1 ;2016(486) :27-33.



- Haton C. Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Physiologie Physiopathologie*. 2005 Jun 29.
- Harrouche K, Lahouel A, Belghobsi M, Pirotte B, Khelili S. Synthesis, characterization, and investigation of the antioxidant activity of some 1, 2, 4-benzothiadiazine-1, 1-dioxides bearing sulfonylthioureas moieties. *Canadian Journal of Chemistry*. 2019;97(12):824-32.
- Hayat J, Akodad M, Moumen A, Baghour M, Skalli A, Ezrari S, Belmalha S. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco. *Heliyon*. 2020 Nov 1;6(11): e05609.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Skaltsounis AL, Bailleul F. Phenolic compounds and diterpenoids from *Marrubium peregrinum*. *Biochemical systematics and ecology*. 2007 ;9(35) :624-6.
- Hennebelle T. *Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiacées productrices d'antioxydants : Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbenacées)*. 2006 : 37-114
- Herzi N, Bouajila J, Camy S, Romdhane M, Condoret JS. Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: Yield, chemical composition and antioxidant activity. *Food chemistry*. 2013 Dec 15 ;141(4) :3537-45.
- Hseini S, Kahouadji A. Étude ethnobotanique de la flore médicinale dans la région de Rabat (Maroc occidental). *Lazaroa*. 2007 Dec ;28 :79-93.



- Inouye S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). *International Journal of Aromatherapy*. 2003 Jan 1 ;13(2-3) :95-107.
- Iserin P, Masson M, Restellini JP, Ybert E, De Laage de Meux A, Moulard F, Zha E, De la Roque R, De la Roque O, Vican P, Deelesalle–Féat T. *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins*. Editions Larousse, Paris. 2001 ;15.



- Julkunen-Titto R. Phenolic constituents in the levels of northern willows: methods for precursors of clarified apple juice sediment. *J. Food Sci.* 1985; 33:254-7.



- Kadri A, Zarai Z, Békir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. Composition Chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare L.* de Tunisie. *Revue Africaine de Biotechnologie*. 2011. (11) : 19.
- Kaufmann, S. H. E. Host response to intracellular pathogens. New York 1997: 345.
- Khan F, Garg V K, Singh A K, Kumar T. Role of free radicals and certain antioxidants in the management of Huntington's disease: a review. *J Anal Pharm Res*; 2018, 7(4): 386-92.
- Kharazian N, Hashemi M. Chemotaxonomy and morphological studies in five *Marrubium L.* species in Iran. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 2017 Mar; 41:17-31.
- Koechlin-Ramonatxo C. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2006 Dec 1 ;20(4) :165-77.
- Koné KP, Soro Y, Siaka S. Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* linn (Asteraceae). *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. 2017 Dec 1 ;44 :15-22.
- Krief S. *Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (Pan troglodytes schweinfurthii) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes*

*consommées* (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS). 2003 : 32.

## *I*

- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003 Dec 3 ;51(25) :7292-5.
- Levy SB. The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle in KHCHATOURIANS GG 1998: Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic resistant bacteria. *JAMC*. 1992 ; 159 :112-36.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. 2007 Jan 1 ;102(3) :771-6.

## *M*

- Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*. 2013 Jun 1(9) :35.
- Malik A, Chittams-Miles AE, Muratori C, Purcell EB. Study of Glucose supplementation on Antibiotic Efficacy against *Staphylococcus aureus* 2022.
- Martini, N., & Eloff, J. N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (combretaceae). *Journal of ethnopharmacology*. 1998 ;62(3): 255–63.
- Miguel O. Le CBD agit-il comme un antioxydant ? *ROYAL QUEEN SEEDS* ;2018.
- Moon JK, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009 Mar 11;57(5):1655-66.
- Mssillou I, Agour A, Hamamouch N, Lyoussi B, Derwich E. Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Marrubium vulgare* L. *The Scientific World Journal*. 2021 Oct 31 ;2021.
- Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Mar 25 ;22(7) :3380.

- Muylaert A, Mainil JG. Bacterial antimicrobial resistances: the mechanisms and their contagiousness. In *Annales de Médecine Vétérinaire* 2012 Vol. 156, No. 2, pp. 109-123.

*N*

- Nawaz H, Shi J, Mittal GS, Kakuda Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*. 2006 Mar 1 ;48(2) :176-81.

*O*

- Ohinishi M, Morishita H, wahashi H I. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis, *Phytochemistry*. 1994, Vol. 36, P: 579-583.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé), Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002.1, Genève, Suisse. 2002 :135.
- Orhan IE, Belhatab R, Şenol FS, Gülpinar AR, Hoşbaş S, Kartal MU. Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*. 2010 Nov 1 ;32(3) :566-71.

*P*

- Pham-Huy La, Hua He, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*; 2008, 4(2): 89–96.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*. 2015 Jan ;30 :11-26.
- Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1978 May ;26(5) :1214-8.

## Q

- Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, Cazin M, Cazin JC, Bailleul F, Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of ethnopharmacology*. 2000 Sep 1;72(1-2):35-42.
- Quézel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales 1962.
- Quezel. F et Santa. S. Nouvelle Flore de L'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Ed. CNRS, Paris France .1963, 1-2 : 801-802.

## R

- Raynaud J. Prescription et conseil en phytothérapie. Ed : Tec & Doc. Paris 2007 : 149.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology and medicine*. 2010 Dec 1 ;49(11) :1603-16.
- Rodriguez Villanueva J, Martin Esteban J. An insight into a blockbuster phytomedicine; *Marrubium vulgare* L. herb. More of a myth than a reality? *Phytotherapy Research*. 2016 Oct;30(10):1551-8.
- Romani A, Pinelli P, Cantini C, Cimato A, Heimler D. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*. 2006 Mar 1 ;95(2) :221-5.

## S

- Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *Journal of ethnopharmacology*. 2002 Mar 1 ;79(3) :389-92.
- Sarni-Manchado, P. Cheynier, V., "Les polyphénols en agroalimentaire", Lavoisier, Editions TEC&DOC 2006 :398.

- Steven, P., Rachel, Martha, E., Paul, H., Jane, S. et Peter, W. J. Microbiologie of waterborne Diseases. *Academic Press. Elsevier 2004: 71-132.*
- Sudan R, Bhagat M, Gupta S, Singh J, Koul A. Iron (FeII) chelation, ferric reducing antioxidant power, and immune modulating potential of *Arisaema jacquemontii* (Himalayan Cobra Lily). *BioMed Research International. 2014 Oct ;2014 :7.*

*T*

- Tahri N, El Basti A, Zidane L, Rochdi A, Douira A. Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la province de Settat (Maroc). *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty. 2012 ;12(2) :192-208.*
- Talbi H, Boumaza A, El-Mostafa K, Talbi J, Hilali A. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. *Journal of Materials and Environmental Science. 2015 ;6(4) :1111-7.*
- Toro J. Rodrigo R. Oxidative Stress: Basic Overview. In R. RODRIGO (Ed.), *Oxidative Stress and antioxidants: their role in human disease* New York. Nova Science Publishers; 2009: 1-17.

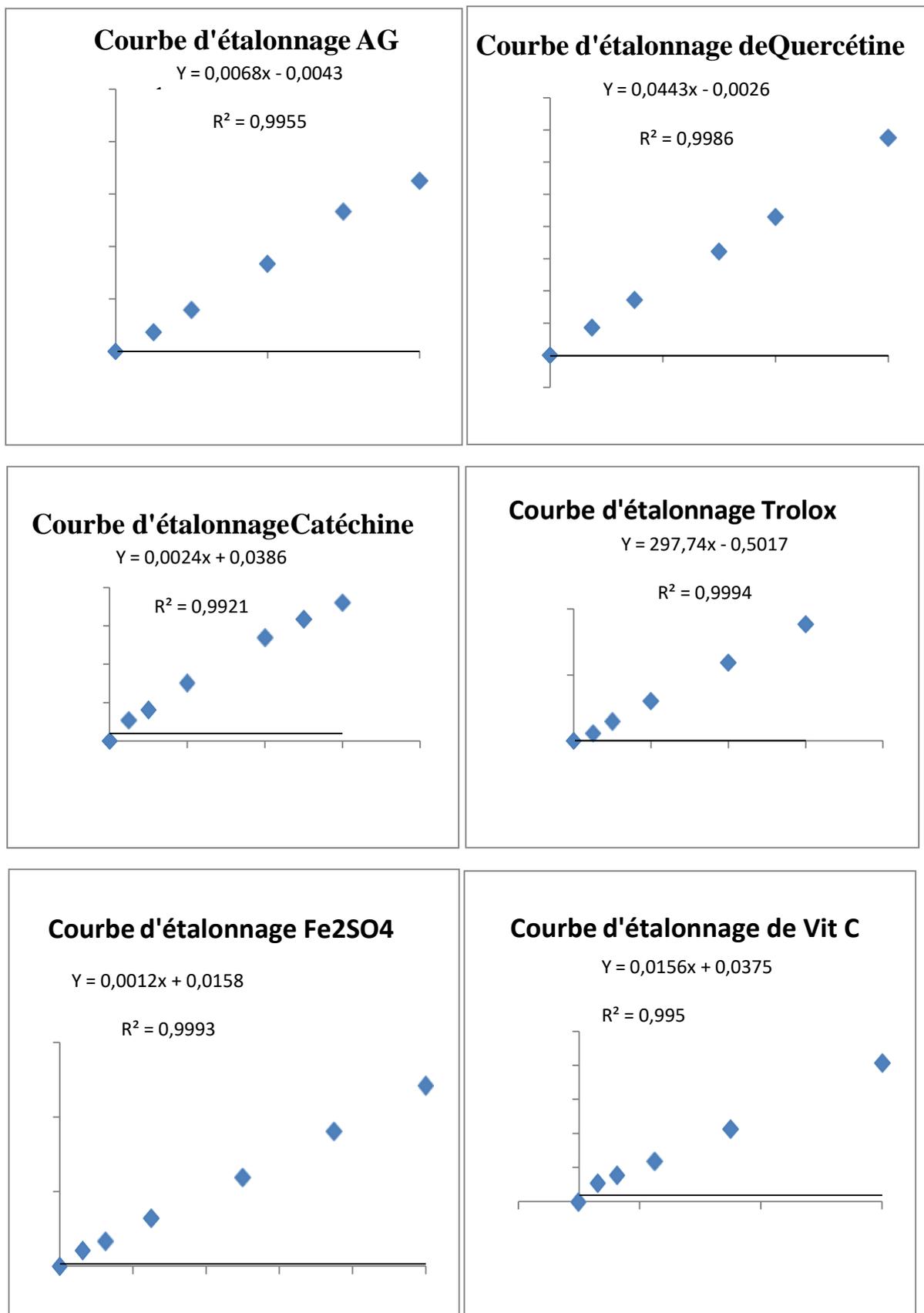
*T*

- Valerie F. Petite guide des antioxydants. [remedes-de-grand-mere.com](http://remedes-de-grand-mere.com) ; 2019.

*L*

- Yabrir, B. Huile essentielle de *Marrubium vulgare* : Composition chimique et activités biologiques. Une critique. *Nat. Prod. Sci.* en 2019,25 : 81–91.
- Yakhlef G, Laroui S, Hambaba L, Aberkane MC, Ayachi A. Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle. *Phytothérapie. 2011 Aug 1 ;9(4) :209-18.*
- Yala D, Merad AS, Mohamedi D, Ouar Korich MN. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb. 2001 ;91(1) :5-12.*

## Annexe 01 : Les courbes d'étalonnage.



---

## Annexe 02

### ✓ Composition des milieux de culture

**Gélose Muller Hinton** : 19 g de GMH (poudre) dissout dans 500 ml d'eau distillé.

**Bouillon Muller Hinton** : 5.25 g de BMH (poudre) dissout dans 250 ml d'eau distillé.

### ✓ Préparation de l'étalon 0.5 Mc Farland

Un étalon standard a été préparé composé de 50  $\mu$ L de chlorure de baryum anhydre ( $\text{BaCl}_2$  1,175%) ajouté à 9,95 mL d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1%). Le mélange avait une densité optique comprise entre 0,08 et 0,13 à 625 nm (**Abu-Lafi *et al.*, 2017**).

**Annexe 03 : réactif, matériel et produit utiliser**

<i>Produits et réactifs utilisés</i>	<i>Matériel</i>	<i>Appareillages</i>
▪ ABTS	▪ Barreau magnétique	▪ Balance
▪ Acétone	▪ Bec benzène	▪ électrique
▪ Acide ascorbique	▪ Béchers	▪ Plaque
▪ Acide chlorhydrique	▪ Boite de pétrie	▪ agitatrice
▪ Acide gallique	▪ Cristalliseur	▪ Moulin
▪ Acide sulfurique	▪ Cuve	▪ électrique
▪ Bouillon	▪ Éprouvettes graduées	▪ Spectrophoto
▪ Butyl Hydroxy Anisol	▪ Embout	▪ mètre
▪ Carbonate de sodium	▪ Erlenmeyer	▪ PH-mètre
▪ Chlorure de barymanhydre	▪ Flacons en verre	▪ Étuve
▪ Chlorure de fer	▪ Micropipette	▪ Haute
▪ Diméthyle sulfoxyde	▪ Microplaque	▪ Vortex
▪ DPPH	▪ Papier absorbant	▪ Bain marie
▪ Eau distillée	▪ Papier aluminium	
▪ Eau physiologique stérile	▪ Papier filtre	
▪ Éthanol	▪ Pense stérile	
▪ Folin-Ciocalteu	▪ Porte tubes	
▪ FRAP	▪ spatule	
▪ Gélose	▪ Tubes à essais	
▪ Méthanol		
▪ Persulfate de potassium		
▪ Quercétine		
▪ Tampon acétate de sodium		
▪ TPTZ		
▪ Trichlorure d'aluminium		
▪ Trolox		
▪ vanilline		

## Résumé

L'étude porte sur *Marrubium vulgare*, une plante médicinale courante en Algérie (famille des Lamiaceae). Les extraits ont été préparés avec trois solvants différents, donnant des rendements d'extraction de 37,82% (méthanol), 25,96% (éthanol) et 11,24% (acétone). L'extrait acétonique présente les concentrations les plus élevées en polyphénols (133,72 mg EAG/gE) et en flavonoïdes (30,21 mg EQ/gE), tandis que l'extrait éthanolique affiche la meilleure capacité réductrice (23,37 mg EAA/gE). Les valeurs IC<sub>50</sub> pour les radicaux DPPH- et ABTS-+ sont respectivement de  $94,10 \pm 7,43 \mu\text{g/mL}$  et  $496,9 \pm 11,56 \mu\text{g/mL}$ . Cependant, aucune activité antibactérienne n'a été enregistrée contre *S. aureus* et *E. coli*, même à une concentration maximale de 1 mg/mL. Cette étude souligne la nécessité de recherches futures pour explorer davantage les bénéfices potentiels, identifier les composants actifs, réaliser des tests antibactériens sur des fractions isolées et évaluer l'influence in vivo des composés actifs de cette plante.

**Mots clés :** *Marrubium vulgare*, extrait éthanolique, polyphénols, antioxydants, activité antibactérienne.

## Summary

The study focuses on *Marrubium vulgare*, a medicinal plant common in Algeria (Lamiaceae family). Extracts were prepared using three different solvents, giving extraction yields of 37.82% (methanol), 25.96% (ethanol) and 11.24% (acetone). The acetone extract showed the highest concentrations of polyphenols (133.72 mg EAG/gE) and flavonoids (30.21 mg EQ/gE), while the ethanol extract showed the best reducing capacity (23.37 mg EAA/gE). IC<sub>50</sub> values for DPPH- and ABTS-+ radicals were  $94.10 \pm 7.43 \mu\text{g/mL}$  and  $496.9 \pm 11.56 \mu\text{g/mL}$  respectively. However, no antibacterial activity was recorded against *S. aureus* and *E. coli*, even at a maximum concentration of 1 mg/mL. This study highlights the need for future research to further explore potential benefits, identify active components, perform antibacterial tests on isolated fractions and assess the in vivo influence of this plant's active compounds.

**Key words:** *Marrubium vulgare*, ethanol extract, polyphenols, antioxidants, antibacterial activity.

## ملخص

تركز الدراسة على الماروبيوم الشائع، وهو نبات طبي شائع في الجزائر (عائلة Lamiaceae). تم تحضير المستخلصات بثلاثة مذيبات مختلفة، مما أعطى عوائد استخلاص 37.82% (ميثانول)، 25.96% (إيثانول)، و11.24% (أسيتون). أظهر مستخلص الأسيتون أعلى تركيزات من البوليفينول (133.72 مجم EAG/gE) والفلافونويدات (30.21 مجم EQ/gE)، بينما أظهر المستخلص الإيثانولي أفضل قدرة اختزال (23.37 مجم EAA/gE). قيم IC<sub>50</sub> لجذور DPPH- و ABTS-+ هي  $94.10 \pm 7.43$  ميكروغرام/مل و  $496.9 \pm 11.56$  ميكروغرام/مل، على التوالي. ومع ذلك، لم يتم تسجيل أي نشاط مضاد للجراثيم ضد المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية، حتى عند التركيز الأقصى 1 ملغم/مل. تسلط هذه الدراسة الضوء على الحاجة إلى أبحاث مستقبلية لمواصلة استكشاف الفوائد المحتملة، وتحديد المكونات النشطة، وإجراء اختبارات مضادة للبكتيريا على الكسور المعزولة وتقييم التأثير الحي للمركبات النشطة لهذا النبات.

**الكلمات المفتاحية:** الماروبيوم الشائع، المستخلص الإيثانول، البوليفينول، مضادات الأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا